



Tesis - SK 142502

Pengaruh Penambahan Bakteri Terhadap Degradasi DDT Oleh *Pleurotus eryngii*

DIANA MAULIANAWATI
NRP 1414 201 025

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

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



THESIS - SK 142502

Effect of Bacteria Addition on Degradation of DDT by *Pleurotus eryngii*

DIANA MAULIANAWATI
NRP 1414 201 025

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

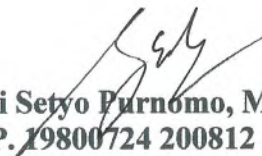
MAGISTER PROGRAM
EXPERTISE FIELD OF BIOCHEMISTRY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016


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


**Oleh :
DIANA MAULIANAWATI
NRP. 1414 201 025**


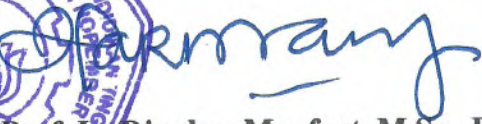
**Tanggal Ujian: 28 Juli 2016
Periode Wisuda: September 2016**

Disetujui oleh:


1. **Adi Setyo Furnomo, M.Sc., Ph.D.** (Pembimbing)
NIP. 19800724 200812 1 002


2. **Suprpto, M.Si., Ph.D.** (Penguji)
NIP. 19720919 199802 1 002


3. **Prof. Mardi Santoso., Ph.D.** (Penguji)
NIP. 19650131 198910 1 001


Direktur Program Pascasarjana,

Prof. H. Djauhar Manfaat, M.Sc., Ph.D.
NIP. 19601202 198701 1 001

PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI TERHADAP DEGRADASI DDT OLEH *Pleurotus eryngii*

Nama : Diana Maulianawati
NRP : 1414201025
Pembimbing : Adi Setyo Purnomo, M.Sc, PhD

ABSTRAK

Optimalisasi biodegradasi DDT oleh *Pleurotus eryngii* dengan penambahan bakteri telah dilakukan, dimana bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* dan *Ralstonia picketti*. Screening dilakukan dengan menambahkan masing-masing bakteri (7 ml) ke dalam kultur *P. eryngii* dan konfrontasi assay jamur dan bakteri. *R. picketti* menunjukkan sinergitas dengan *P. eryngii* dan digunakan dalam proses degradasi selanjutnya. *R. pickettii* ditambahkan sebesar 1, 3, 5, 7 dan 10 ml ($1 \text{ ml} \approx 1,44 \times 10^{13} \text{ R. pickettii}$ sel/ml kultur) kedalam 20 ml kultur *P. eryngii*. Degradasi DDT tertinggi ditunjukkan pada penambahan bakteri 7 ml dengan jumlah degradasi sebesar 78,34 %. Degradasi DDT pada waktu penambahan bakteri hari ke-0, 1, 3 dan 5 secara berurutan adalah sebesar 78%, 70%, 80%, dan 38%. Produk metabolit yang dihasilkan selama proses degradasi adalah DDD, DDE dan DDMU.

Kata kunci: Biodegradasi, DDT, *Pleurotus eryngii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia pickettii*.

EFFECT OF BACTERIA ADDITION ON DEGRADATION OF DDT BY *Pleurotus eryngii*

Name : Diana Maulianawati
Student Identify Number : 1414201025
Supervisor : Adi Setyo Purnomo, M.Sc, PhD

ABSTRACT

Optimization of biodegradation of DDT by *Pleurotus eryngii* with the addition of bacteria, had been investigated. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Ralstonia picketti* were screened by adding each of them (7 mL) in *P. eryngii* culture and also based on fungi and bacteria confrontation assay. *R. picketti* showed synergism with *P. eryngii*, which used for further experiment by adding to *P. eryngii* culture at 1, 3, 5, 7 and 10 ml (1 ml \approx 1.44×10^{13} *R pickettii* cell/ mL culture). The addition of 7 mL of *R. pickettii* showed the highest DDT degradation about 78.34%. The addition of 7 ml of *R. pickettii* on days 0, 1, 3, and 5 showed DDT degradation approximately 78%, 70%, 80% and 38%, respectively. DDD, DDE and DDMU were detected as metabolite products from DDT degradation by *P. eryngii* and *R. pickettii*.

Keywords: Biodegradation, DDT, *Pleurotus eryngii*, *Pseudomonas aerugisa*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia pickettii*.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1. 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 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Pestisida	5
2.1.1. Sejarah Pestisida	5
2.1.2. Klasifikasi Pestisida.....	6
2.2. Dikloro Difenil Trikloroetana (DDT)	7
2.3. Jamur Pelapuk Putih	8
2.4. Sistem Enzim Ligninolitik dari Jamur Pelapuk Putih.....	10
2.5. <i>Pleurotus eryngii</i>	11
2.6. Bioremediasi	12
2.7. Biodegradasi	13
2.8. Mekanisme Degradasi DDT oleh Jamur Pelapuk Putih	14
2.8.1. Degradasi DDT menggunakan <i>T. versicolor</i> U97	15
2.8.2. Jalur degradasi DDT oleh <i>T. versicolor</i>	16
2.8.3. Degradasi DDT menggunakan <i>P. ostreatus</i>	18

2.9. Degradasi DDT oleh Bakteri	18
2.10. Peranan Biosurfaktan	19
2.10.1. Tipe Biosurfaktan.....	20
2.11. Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.12. Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.13. Bakteri <i>Ralstonia pickettii</i>	22
2.14. Metode Analisis	23
2.14.1. HPLC	23
2.14.1.1. Kolom HPLC.....	24
2.14.1.2. Dektektor	25
2.14.1.3. Proses Elusi.....	25
2.14.2. GC-MS.....	26
2.14.3. Spektrofotometer UV-Vis.....	28
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	29
3.1. Alat dan Bahan.....	29
3.1.1. Alat.....	29
3.1.2. Bahan	29
3.2. Regenerasi Jamur <i>P. eryngii</i>	29
3.3. Persiapan Kultur Cair Jamur	30
3.4. Regenerasi Bakteri	30
3.5. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	30
3.6. Persiapan Kultur Cair Bakteri	30
3.7. Biodegradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i>	30
3.8. Biodegradasi DDT oleh Bakteri.....	31
3.9. Konfrontasi Assay Jamur dan Bakteri	31
3.10. Screening Bakteri Biodegradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i>	31
3.11. Analisa Hasil Screening Bakteri	31
3.12. Pengaruh Konsentrasi Penambahan Bakteri Terhadap Biodegradasi DDT Oleh <i>P. Eryngii</i> (Variasi Konsentrasi Bakteri)	33
3.13. Pengaruh Waktu Penambahan Bakteri Terhadap Biodegradasi DDT Oleh <i>P. Eryngii</i> (Variasi Waktu Penambahan Bakteri)	33
3.14. Pembuatan Kurva Standard DDT	33

3.15. Perolehan Ulang (<i>Recovery</i>) DDT Dan Identifikasi Metabolit Produk	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1. Kultur <i>Pleurotus eryngii</i>	35
4.1.1. Regenerasi Jamur <i>P. eryngii</i>	35
4.1.2. Persiapan Kultur Cair <i>P. eryngii</i>	36
4.2. Regenerasi Bakteri	36
4.3. Kurva Pertumbuhan Bakteri	37
4.3.1. Kurva Pertumbuhan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
4.3.2. Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i>	39
4.3.3. Kurva Pertumbuhan <i>Ralstonia pickettii</i>	40
4.4. Persiapan Kultur Bakteri.....	41
4.5. Kurva Standar DDT	41
4.6. Proses dan Hasil Biodegradasi DDT.....	43
4.6.1. Biodegradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i>	43
4.6.2. Biodegradasi DDT oleh Bakteri (<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , dan <i>R. pickettii</i>).....	52
4.7. Konfrontasi Assay Jamur dan Bakteri.....	54
4.8. Screening Bakteri.....	58
4.9. Pengaruh Penambahan <i>R. pickettii</i> Terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> (Variasi Konsentrasi Bakteri)	59
4.10. Pengaruh Penambahan <i>R. pickettii</i> Terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> (Variasi Waktu Penambahan Bakteri)	63
4.11. Jalur Degradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> dengan Penambahan <i>R. pickettii</i> Konsentrasi 7 ml	64
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	67
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN.....	83
BIODATA PENULIS	95

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	JUDUL GAMBAR	HALAMAN
2.1.	Struktur DDT	8
2.2.	Siklus katalisis peroksida. Besi dalam bentuk protoporfirin XI.....	11
2.3.	Jalur degradasi utama metabolisme DDT oleh <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	14
2.4.	Kurva pertumbuhan <i>T. versicolor</i> dengan dan tanpa penambahan DDT.....	15
2.5.	Total ion kromatogram produk metabolit dari degradasi DDT oleh <i>T. versicolor</i> U97	16
2.6.	Dugaan jalur metabolisme DDT dalam mikroorganisme.....	17
2.7.	Reaksi dehidroklorinasi DDT menjadi DDE	18
2.8.	Reaksi reduksi deklorinasi DDT menjadi DDD.....	19
2.9.	Kurva standar DDT	23
2.10.	Kromatogram DDT dan metabolit produk yang dianalisa menggunakan HPLC	23
2.11.	Diagram kotak instrument HPLC.....	25
2.12.	Kromatogram GC pada sampel.....	25
2.13.	Diagram Kotak Komponen Kromatografi Gas	26
2.14.	Kurva Pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i>	27
2.15.	Diagram Kotak Spektrofotometer UV-Vis	28
3.1.	Contoh perlakuan konfrontasi assay jamur dan bakteri.....	32
4.1.	Kultur <i>P. eryngii</i> dalam media PDA	36
4.2.	Koloni bakteri dalam media NA	37
4.3.	Kurva Pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i>	39
4.4.	Kurva pertumbuhan <i>B. subtilis</i>	40
4.5.	Kurva pertumbuhan <i>R. pickettii</i>	40

4.6.	Kurva larutan standar DDT	42
4.7.	Kromatogram GC produk metabolit yang dihasilkan dari degradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i>	47
4.8.	Spektra MS piren dalam database	48
4.9.	Spektra MS piren hasil analisis sampel <i>P. eryngii</i> .	48
4.10.	Spektra MS DDT dalam database	49
4.11.	Spektra MS DDT hasil analisis sampel <i>P. eryngii</i> .	49
4.12.	Spektra MS DDE dalam database	50
4.13.	Spektra MS DDE hasil analisis sampel <i>P. eryngii</i> .	50
4.14.	Spektra MS DDMU dalam database	51
4.15.	Spektra MS DDMU hasil analisis sampel <i>P. eryngii</i>	51
4.16.	Jumlah DDT terdegradasi oleh bakteri dengan variasi konsentrasi yang diinkubasi selama 7 hari .	53
4.17.	Pertumbuhan miselium <i>P. eryngii</i> dalam konfrontasi assay	55
4.18.	Perbandingan pertumbuhan miselium <i>P. eryngii</i> dalam konfrontasi assay	56
4.19.	Miselium <i>P. eryngii</i> dalam Konfrontasi assay setelah 12 hari masa inkubasi.....	57
4.20.	Degradasi DDT oleh mixed kultur konsentrasi 7 ml	59
4.21.	Pengaruh penambahan <i>R. pickettii</i> terhadap biodegradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> dengan variasi konsentrasi bakteri	61
4.22.	Kromatogram GC hasil analisa degradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> dan <i>R. pickettii</i> Konsentrasi 7 ml...	62
4.23.	Pengaruh penambahan <i>R. pickettii</i> terhadap biodegradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> dengan variasi waktu penambahan bakteri.....	64

4.24.	Dugaan jalur degradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> dengan penambahan <i>R. pickettii</i>	66
-------	--	----

DAFTAR TABEL

TABEL	JUDUL TABEL	HALAMAN
2.16.	Penelitian mengenai biodegradasi polutan organik menggunakan jamur pelapuk putih.....	9
4.1.	Data kurva standar DDT	42
4.2.	Produk metabolit yang dihasilkan pada proses degradasi DDT oleh bakteri	54
4.3.	Metabolit produk yang dihasilkan pada proses degradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> , Bakteri dan mix kultur	59
4.4.	Jumlah degradasi DDT oleh <i>P.eryngii</i> dengan penambahan bakteri <i>R. pickettii</i> dengan waktu inkubasi selama 7 hari	60
4.5.	Jumlah degradasi DDT oleh <i>P. eryngii</i> dengan penambahan <i>R. pickettii</i> dengan waktu berbeda	63
4.6.	<i>Recovery</i> dan produk metabolit DDT oleh <i>P. eryngii</i> dengan penambahan <i>R. pickettii</i>	65

DAFTAR LAMPIRAN

	HALAMAN
Lampiran 1. Skema Kerja	83
Lampiran 2. Perhitungan.....	84
Lampiran 3. Data Analisis Sampel	86
Lampiran 4. Kromatogram GC Hasil Analisa	88
Lampiran 5. Fragmentasi Molekul.....	90

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

1,1,1-Trikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etana atau yang lebih dikenal dengan DDT (Dikloro Difenil Trikloroetana) merupakan pestisida yang banyak digunakan di seluruh dunia terutama dalam sektor pertanian (Schenker dkk., 2009; Eggen dan Majcherczyk, 2006). DDT juga masih digunakan secara luas di berbagai negara di Afrika dan juga di Indonesia untuk memberantas nyamuk malaria, dikarenakan sangat efektif dan murah (Kinuthia dkk., 2010). Adanya efek negatif dari DDT terhadap lingkungan dan makhluk hidup secara global, maka DDT telah dilarang penggunaannya pada tahun 2004 dibawah konvensi Stockholm (UNEP, 2004). Di Indonesia, DDT telah dilarang penggunaannya berdasarkan SK Menteri Pertanian RI No. 434.1/Kpts/TP.270/ 7/2001. Namun hingga kini masih terdapat residu DDT yang tertinggal di lingkungan terutama di sekitar aliran air daerah pertanian (Ramadhani dkk., 2010). Sudaryanto dkk. (2007) memberikan data level residu DDT dalam tanah, air, sedimen dan udara dari beberapa lokasi di Indonesia. Data tersebut menunjukkan, bahwa residu DDT lebih tinggi dibandingkan dengan jenis pestisida lainnya yang berada dalam lingkungan. DDT merupakan bahan pencemar organik yang hidrofobik, seiring keberadaannya yang dapat bertahan lama, bersifat bioakumulasi di alam dan memberikan efek merugikan pada manusia dan hewan. Keberadaan DDT telah teridentifikasi dalam udara, tanah, ikan, burung dan bahkan dalam susu manusia (Qiu dkk., 2004). Permasalahan yang dihadapi saat ini adalah sangat sulit untuk menghilangkan residu DDT di lingkungan disebabkan daya hambatnya yang kuat terhadap proses degradasi.

Berbagai metode telah banyak di aplikasikan pada proses deklorinasi DDT, baik dengan cara perlakuan biologi (Morrison dkk., 2000), degradasi fotokimia (Chu, 1999), proses elektrokimia (Matsunaga dan Yasuhara, 2005) dan reaksi logam-katalis (Sayles dkk., 1997). Metode kimia maupun fisika dapat menghasilkan proses degradasi yang baik, akan tetapi penggunaan metode

tersebut sangat mahal dan menghasilkan residu yang juga masih berbahaya terhadap lingkungan. Pada banyak kasus, DDT sangat sulit untuk di deklorinasi dikarenakan kestabilan struktur kimianya.

Penggunaan bakteri dan jamur merupakan salah satu metode perlakuan biologi dalam degradasi DDT, keduanya telah berhasil diaplikasikan pada proses degradasi DDT dan biaya yang dibutuhkan relatif rendah (Aislabie dkk., 1997).

Spesies jamur *Pleurotus* yang merupakan jenis jamur pelapuk putih telah diketahui memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa-senyawa hidrokarbon, maupun senyawa xenobiotik lainnya. *Pleurotus eryngii* telah digunakan untuk mendegradasi senyawa fenol (Ntougias dkk., 2012), fluorine (Hadibarata dan Kristanti, 2014), bisofenol-A (BPA), bisofenol-F (BPF), nonifenol (NP), tetrabromobisfenol-A(TBBPA) (Chang dan Chang, 2014), dan DDT (Arisoy, 1997). Arisoy (1997) melaporkan bahwa *P. eryngii* mampu mendegradasi DDT sekitar 46% dan 66% dalam waktu 10 dan 20 hari dalam media *malt agar*. Hasil degradasi tersebut relatif rendah dan lama, sehingga perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan hasil degradasi DDT yang lebih efektif.

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu mendegradasi senyawa-senyawa xenobiotik baik dalam kondisi aerob maupun anaerob. Beberapa bakteri diketahui memiliki kemampuan untuk mendegradasi DDT seperti *Alcaligenes eutrophus* A5, *Serratia Marcescens* DT-1P, *Micrococcus varians*, *Lactobacillus plantarum*, dan *Pseudomonas* sp. (Nadeau dkk., 1994; Abou-Arab, 2002; Bidlan dan Manonmani, 2002; Chandrappa dan Harichandra, 2004). Bidlan (2003) melaporkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* mampu untuk mendegradasi DDT 80-100% dalam waktu 5 hari, dengan konsentrasi DDT rendah. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Ralstonia pickettii* mampu untuk mendegradasi senyawa-senyawa organoklorin seperti 2,4,6-triklorofenol (Hatta dkk., 2012) dan klorobenzen (Zhang, 2011). Bakteri *Bacillus subtilis*, sebagaimana dilaporkan Johnson dkk. (1967) mampu mendegradasi DDT (10 µg/ml) sebesar 65,14% selama 14 hari masa inkubasi.

Jamur diketahui lebih toleran terhadap konsentrasi DDT yang tinggi dibandingkan dengan bakteri, tetapi jamur membutuhkan waktu degradasi yang lebih lama dibandingkan dengan bakteri. Hasil degradasi yang lebih optimum,

dapat diperoleh berdasarkan waktu proses degradasi yang lebih pendek, hasil degradasi yang lebih besar serta produk metabolit yang dihasilkan lebih sederhana, sehingga jamur dan bakteri dikombinasikan dalam proses degradasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ashari (2014) Jamur *P. ostreatus* yang dikombinasikan dengan bakteri *P. aeruginosa* dapat meningkatkan degradasi DDT dengan hasil 85% dalam waktu 7 hari.

Dalam penelitian ini, penggunaan salah satu jenis jamur pelapuk putih yaitu *P. eryngii* dengan penambahan bakteri yaitu *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* untuk mendegradasi DDT telah diuji. Penggunaan ketiga jenis bakteri didasarkan kepada kemampuan bakteri *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dalam degradasi senyawa DDT, serta kemampuan *R. Picketti* untuk mendegradasi senyawa yang mengandung klor. Selain itu *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. Pickettii* merupakan bakteri penghasil biosurfaktan dimana dapat digunakan untuk menurunkan tegangan permukaan atau tegangan antar muka 2 fasa dan meningkatkan kelarutan. Karena sifat dari DDT yang non-polar (hidrofobik), maka dengan adanya penambahan biosurfaktan hidrofobitasnya akan menurun, sehingga kelarutan antara DDT sebagai substrat dengan enzim meningkat yang dimungkinkan dapat mengoptimasi proses degradasi DDT oleh *P. eryngii*.

1.2. Rumusan Masalah

Arisoy (1997) telah melaporkan bahwa *P. eryngii* mampu mendegradasi DDT, akan tetapi hasil degradasi tersebut relatif rendah dan lama, sehingga perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan hasil degradasi DDT yang lebih efektif. Salah satu metode optimasi yang dapat dilakukan yaitu penambahan bakteri. Pada penelitian ini pengaruh kombinasi jamur *P. eryngii* dengan *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* dan hubungan sinergitasnya perlu diuji termasuk identifikasi produk metabolit yang dihasilkan dalam proses degradasi tersebut.

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Jenis Bakteri yang digunakan adalah *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii*.

2. Variasi konsentrasi penambahan bakteri pada 1, 3, 5, 7 dan 10 ml pada 10 ml kultur *P. eryngii* yang telah ditambahkan DDT.
3. Variasi waktu penambahan bakteri ke dalam kultur *P. eryngii* yang telah ditambahkan DDT pada hari ke-0, ke-1, ke-3, dan ke-5.
4. Variabel yang diamati adalah jumlah DDT yang terdegradasi, sinergitas antara *P. eryngii* dengan *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* serta produk metabolit yang dihasilkan.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan nilai degradasi DDT oleh Jamur *P. eryngii* dengan menggunakan media agar kentang, investigasi mengenai interaksi yang terjadi antara *P. eryngii* dan bakteri, serta meningkatkan kemampuan *P. eryngii* dalam mendegradasi DDT dengan menambahkan bakteri ke dalam kultur *P. eryngii* dan mengidentifikasi produk metabolit yang dihasilkan selama proses degradasi DDT.

1.5. Manfaat Penelitian

1. Memberikan data ilmiah mengenai pengaruh penambahan bakteri *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* terhadap laju degradasi DDT oleh jamur *P. eryngii*.
2. Memberikan referensi terkini untuk menangani masalah pencemaran DDT di lingkungan.
3. Memberikan alternatif penanganan masalah nasional khususnya limbah DDT dengan menggunakan jamur pelapuk putih sebagai metode yang murah, aman, cepat dan efektif.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pestisida

Pestisida berasal dari kata pest yang berarti *hama* dan sida berasal dari kata *caedo* berarti pembunuh. Pestisida dapat diartikan secara sederhana sebagai pembunuh hama. Menurut peraturan pemerintah RI No. 7 tahun 1973. Pestisida adalah campuran bahan kimia yang digunakan untuk mencegah, membasmi dan mengendalikan hewan seperti binatang pengerat, tumbuhan pengganggu seperti gulma, termasuk serangga penyebar penyakit, dengan tujuan kesejahteraan dan kesehatan manusia.

Berdasarkan PP RI No. 6 Tahun 1995 pestisida didefinisikan sebagai zat atau senyawa kimia, zat pengatur tubuh atau perangsang tumbuh, bahan lain, serta mikroorganisme atau virus yang digunakan untuk perlindungan tanaman. Pestisida sebagai zat atau campuran zat yang digunakan untuk mencegah, memusnahkan, menolak, atau memusuhi hama baik hewan, tanaman, dan mikroorganisme pengganggu (Soemirat, 2003).

2.1.1. Sejarah Pestisida

Penggunaan pestisida kimia pertama kali diketahui sekitar 4.500 tahun yang lalu (2.500 SM) yaitu pemanfaatan asap sulfur untuk mengendalikan tungau di Sumeria. Penggunaan bahan kimia beracun seperti arsenik, merkuri dan serbuk timah diketahui mulai digunakan untuk memberantas serangga pada abad ke-15. Pada abad ke-17 nikotin sulfat yang diekstrak dari tembakau mulai digunakan sebagai insektisida. Pada abad ke-19 dihasilkan dua jenis pestisida alami yaitu, piretrum yang diekstrak dari crisantimum dan rotenon yang diekstrak dari akar tuba *Derris elliptica* (Sastroutomo, 1992).

Othmar Zeidler adalah orang yang pertama kali mensintesis DDT (Dikloro Diphenyl Trichloroethane) pada tahun 1874, tetapi fungsinya sebagai insektisida baru ditemukan oleh ahli kimia Swiss, Paul Hermann Muller pada tahun 1939 dengan penemuannya ini dianugerahi hadiah nobel dalam bidang Physiology atau

Medicine pada tahun 1948 (NobelPrize.org). Pada tahun 1940an mulai dilakukan produksi pestisida sintetik dalam jumlah besar dan diaplikasikan secara luas (Weir, 1998).

Penggunaan pestisida terus meningkat lebih dari 50 kali lipat semenjak tahun 1950, dan sekarang sekitar 2,5 juta ton digunakan setiap tahunnya. Dari seluruh pestisida yang diproduksi di seluruh dunia saat ini, 75% digunakan di negara-negara berkembang (Sudarmo, 1987).

Di Indonesia, pestisida yang paling banyak digunakan sejak tahun 1950-an sampai akhir tahun 1960-an adalah pestisida dari golongan hidrokarbon berklor seperti DDT, endrin, aldrin, dieldrin, heptaklor. Penggunaan pestisida-pestisida fosfat organik seperti paration, OMPA, TEPP pada masa lampau tidak perlu dikhawatirkan, karena walaupun bahan-bahan ini sangat beracun (racun akut), akan tetapi pestisida-pestisida tersebut sangat mudah terurai dan tidak mempunyai efek residu yang menahun. Hal penting yang masih perlu diperhatikan masa kini ialah dampak penggunaan hidrokarbon berklor pada masa lampau khususnya terhadap aplikasi derivat-derivat DDT, endrin dan dieldrin.

2.1.2. Klasifikasi Pestisida

Pestisida dapat diklasifikasikan berdasarkan pengaruh fisiologisnya, yang disebut farmakologis atau klinis, sebagai berikut:

1. Senyawa Organofosfat

Organofosfat adalah insektisida yang paling toksik diantara jenis pestisida lainnya dan sering menyebabkan keracunan pada manusia. Organofosfat menghambat aksi pseudokholinesterase dalam plasma dan kholinesterase dalam sel.

2. Senyawa Organoklorin

Dari golongan ini paling jelas pengaruh fisiologisnya seperti yang ditunjukkan pada susunan syaraf pusat, senyawa ini berakumulasi pada jaringan lemak.

3. Senyawa Arsenat

Pada keadaan keracunan akut menimbulkan gastroenteritis dan diare yang menyebabkan kekejangan yang hebat sebelum menimbulkan kematian. Pada keadaan kronis menyebabkan pendarahan pada ginjal dan hati.

4. Senyawa Karbamat

Pengaruh fisiologis yang primer dari racun golongan karbamat yang menghambat aktifitas enzim kolinesterase darah.

5. Piretroid

Piretroid merupakan senyawa kimia yang meniru struktur kimia (analog) dari piretrin. Piretrin sendiri merupakan zat kimia yang bersifat insektisida yang terdapat dalam piretrum, kumpulan senyawa yang diekstrak dari bunga semacam krisan. Piretroid memiliki beberapa keunggulan, diantaranya diaplikasikan dengan takaran relatif sedikit, spektrum pengendaliannya luas, tidak persisten, dan memiliki efek melumpuhkan yang sangat baik. Namun karena sifatnya yang kurang atau tidak selektif, banyak piretroid yang tidak cocok untuk program pengendalian hama terpadu (Djojoseumarto, 1998)

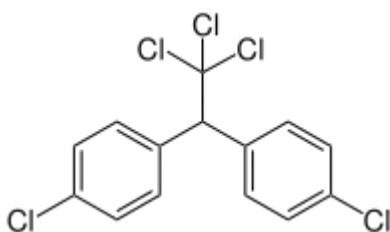
2.2. Dikloro Difenil Trikloroetana (DDT)

Selama beberapa tahun, 1,1,1-trikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etana (DDT) telah menyita banyak perhatian, terkait kontrol penggunaan dan pelarangan terhadap proses produksi, penggunaan dalam budidaya pertanian dan penggunaan praktis di banyak negara. Sejak DDT diperkenalkan pada tahun 1940, DDT telah digunakan hingga saat ini untuk mengontrol jumlah hama, mengatasi serangan malaria, dan berbagai penyakit lain yang disebabkan oleh serangga (Wong dkk., 2005). Di beberapa Negara seperti China dan Afrika Selatan, DDT masih digunakan bukan hanya pada sektor pertanian, juga digunakan untuk mengontrol malaria dan anti-pembusukan pada luka (Feng dan Turnbull., 2011).

Waktu paruh yang lama, bioakumulasi dan biomagnifikasi dalam rantai makanan menyebabkan DDT sangat berbahaya. DDT dan turunan utamanya 1,1-dikloro-2,2-bis-(4-klorofenil)etana (DDD) dan 1,1-dikloro-2,2-bis-(4-klorofenil)etilen (DDE) telah ditemukan di udara, air, tanah, sedimen sungai, ikan, darah dan air susu (Bouwman dkk., 2012). Beberapa studi menemukan dalam

tubuh hewan terdapat sejumlah kecil DDT (20-50 mg/kg berat badan setiap hari) yang dapat memberikan efek pada hati, organ reproduksi dan kelenjar adrenalin.

Wang (2011) melaporkan bahwa telah banyak metode yang diaplikasikan pada proses deklorinasi DDT, baik dengan cara perlakuan biologi (Morrison dkk., 2000), degradasi fotokimia (Chu, 1999), proses elektrokimia (Matsunaga dan Yasuhara, 2005) dan reaksi logam-katalis (Sayles dkk., 1997). Penggunaan katalis dilakukan pada temperatur yang rendah agar terjadi proses deklorinasi dari senyawa organoklorin, katalis yang banyak digunakan adalah CaO, MgO, Fe₂O₃, V₂O₅, Co₃O₄ dan beberapa komposit oksida (Koper dan Klabunde, 1997; Mishakov dkk., 2002; Weber dkk., 2002; Lomnicki and Dellinger, 2003; Matsuda dkk., 2009; Khaleel dan Nayli, 2008). Penelitian lain yang menghasilkan deklorinasi DDT adalah penggunaan katalis yang terdiri dari gabungan dua logam antara lain Pt/Pd, Mg/Pd dan Fe/Pd (Monguchi dkk., 2006; Ukisu, 2008; Engelmann dkk., 2003). Tetapi, di karenakan tingginya biaya dan juga efek beracun dari logam mulia, menghambat pengembangan aplikasi penggunaan katalis dalam proses deklorinasi DDT. Struktur kimia DDT dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur DDT

2.3. Jamur Pelapuk Putih

Jamur pelapuk putih merupakan jenis jamur dari group Basidiomisetes yang memiliki karakterisasi khusus yaitu kemampuan mereka untuk mendegradasi lignin dalam kayu. Kemampuan unik ini membuat jamur pelapuk putih sangat efektif dalam mendegradasi berbagai jenis polusi lingkungan yang berbahaya. Tabel 2.1 menunjukkan hasil penelitian terkait dengan penggunaan jenis jamur pelapuk putih dalam mendegradasi senyawa organik polutan. Struktur-struktur polutan berbeda yang telah mampu di degradasi oleh jamur pelapuk putih

menunjukkan potensinya yang luar biasa. Barr dan Aust (1994) juga memberikan data mengenai polutan yang berhasil didegradasi oleh jamur pelapuk putih. Polutan yang tergolong sulit untuk di degradasi, seperti pestisida jenis DDT (Kennedy dkk., 1990), senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon (Bumpus 1989), bifenil poliklorin dan aromatik nitrogen (Fernando dkk., 1990).

Tabel 2.1. Penelitian mengenai biodegradasi polutan organik menggunakan jamur pelapuk putih.

Organisme	Jenis Polutan atau Limbah	Referensi
<i>Bjerkandera adusta</i>	PAHs (dibenzotiopen, fluoranten, pyrin dan krisin) TNT Daunomisin	Valentin dkk., 2007 Eilers dkk., 1999 Kornilowicz-Kowalska dkk., 2006
<i>Irpex lacteus</i>	PAHs (phenantrin, antrasin, fluorontin dan pyrin) Pewarna buatan	Baborova dkk., 2008 Svobodova dkk., 2006
<i>Lentinus tigrinus</i>	PAHs	Valentine dkk., 2006
<i>Trametes versicolor</i>	Trikloroetilen (TCE) Pentaklorofenol (PCP) Pewarna buatan (Amaranth) Polisakarida	Marco-Urrea dkk., 2008 Ruttiman-Johnson dkk., 1997 Gavril dan Hodson, 2007 Zhu, Sun dan Cao, 2005
<i>Phlebia radiata</i>	TNT	Aken dkk., 1999
<i>Pleorotus ostreatus</i>	PAHs	Lamar dkk., 2002
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PAHs (antrasin) Limbah air Molasses Limbah cair tekstil	Mohammad dkk., 2009 Vahabzadeh, Mehranian, dan Saatari, 2004 Gomaa dkk., 2008

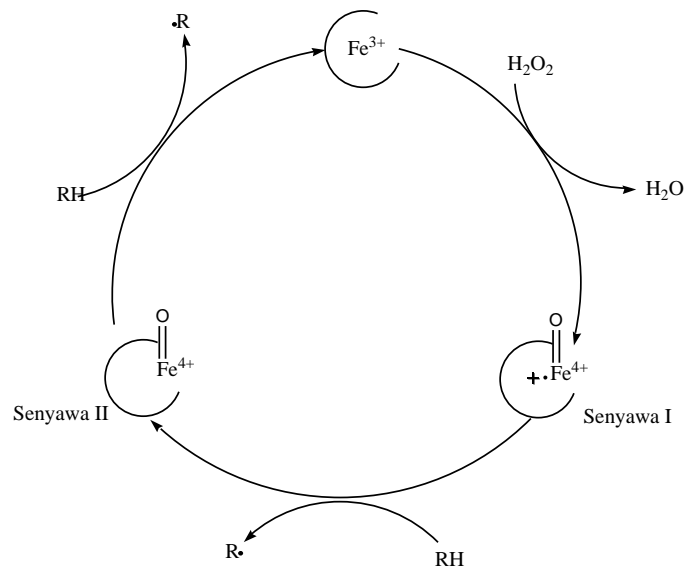
(Gao dkk., 2009)

Proses degradasi polutan merupakan proses ekstraseluler. Mekanisme reaksi dalam mendegradasi senyawa polutan didasarkan pada reaksi radikal bebas. Radikal bebas yang dihasilkan oleh jamur pelapuk putih akan terlibat dalam rantai reaksi (Barr dan Aust, 1994). Proses degradasi oleh jamur pelapuk putih tergantung pada produksi dan sekresi dari beberapa enzim. Enzim yang diproduksi oleh jamur pelapuk putih merupakan respon dari terbatasnya nutrien inti seperti amoniak, karbohidrat, sulfur termasuk H₂O₂ (Kersten, 1990; Tien dan Kirk, 1984). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa enzim laktase (Kirk dan

Shimada 1985), reuktase (Westemark dan Eriksson, 1974), dan metilase (Coulter dkk., 1993) dapat di produksi oleh jamur pelapuk putih pada suatu kondisi terbatasnya nutrient, yang disebut enzim ligninolitik.

2.4. Sistem Enzim Ligninolitik dari Jamur Pelapuk Putih

Jamur pelapuk putih, dalam proses metabolisme menghasilkan satu hingga lebih dari tiga enzim ekstraseluler yang sangat esensial untuk degradasi lignin maupun senyawa polutan, dan apabila di kombinasi dengan proses yang lain akan memberikan efek terhadap mineralisasi lignin dan senyawa polutan. Enzim-enzim itu sering disebut *lignin-modifying enzymes* atau LMEs. Ketiga enzim tersebut terdiri atas 2 glikosilat heme yang mengandung peroksidase, yaitu lignin peroksidase (LiP, E.C.1.11.1.14) dan Mn-dependent Peroksidase (MnP, E.C.1.11.1.13) (Gao dkk., 2009) dan tembaga yang mengandung fenoloksidase, lakase (Lac, E.C.1.10.3.2) (Thurston, 1994). Lignin peroksidase dan mangan peroksidase diproduksi oleh jamur pelapuk putih sebagai respon terhadap keterbatasan nutrisi dan diaktivasi oleh H₂O₂ (Tien, 1987). Besi heme dalam LiP dan MnP berada pada keadaan *ferric*. Hidrogen peroksida mengoksidasi heme dengan dua elektron untuk membentuk enzim yang diketahui sebagai senyawa I, dua elektron yang dioksidasi oleh heme dari senyawa I merupakan kation radikal ferril-z porfirin dan sangat reaktif terhadap berbagai bahan kimia dan mereduksinya. Senyawa I mengoksidasi bahan kimia dengan mereduksinya menjadi radikal bebas, yang menghasilkan bentuk senyawa II. Senyawa II bereaksi dengan bahan kimia lain dan mereduksinya kembali ke keadaan *ferric*. Siklus katalitik dari LiP diunjukkan pada Gambar. 2.2. Siklus katalitik dari mangan peroksidase berbeda dari LiP, dalam MnP, Mn⁺² berfungsi sebagai zat pereduksi untuk senyawa I dan senyawa II. Mn⁺³ yang dihasilkan selama siklus terdifusi dan mempromosikan oksidasi bahan kimia lainnya. Proses ini dianggap sebagai suatu kondisi dimana jamur mulai mengoksidasi, mendegradasi lignin dan beberapa polutan lingkungan (Tien 1987; Kirk dan Farrell 1987; Cai dan Tien 1993).



Gambar 2.2. Siklus katalisis peroksida. Besi dalam bentuk protoporfirin XI (Barr dan Aust 1994).

2.5. *Pleurotus eryngii*

P. eryngii atau yang lebih sering disebut Jamur Tiram Raja, merupakan salah satu jenis jamur pelapuk putih yang sangat di gemari di Asia, Eropa, dan Amerika Utara, dikarenakan rasa, tekstur dan proses pertumbuhannya (Estrada and Royse, 2007). *P. eryngii* merupakan spesies yang terbesar dari genus jamur tiram. Bentuknya padat, dengan batang yang berwarna putih. Kedudukan jamur *P. eryngii* dalam dunia fungi adalah sebagai berikut:

- Kerajaan : Fungi
- Filum : Basidiomycota
- Kelas : Agaricomycetes
- Ordo : Agaricales
- Famili : Pleurotaceae
- Marga : Pleurotus
- Spesies : *P. eryngii*

P. eryngii merupakan jamur saprofitik. Jamur ini dapat menghasilkan enzim lignolitik seperti lakase, mangan peroksida (MnP), dan enzim aril-alkohol oksidase (AAO) (Munoz dkk., 1997). *P. eryngii* memanfaatkan lignin sebagai sumber makanan yang di metabolisme oleh lakase, yaitu enzim yang memiliki

kemampuan untuk mendegradasi lignin. Lakase merupakan glikosilasi dari polifenoloksidase, yang memiliki peranan penting dalam proses biodegradasi (Mayer dan Staples 2002). Lakase juga merupakan enzim yang menghasilkan banyak isoenzim (Eggert dkk., 1996; Lyczak dkk., 2000; Mayer & Staples 2002).

2.6. Bioremediasi

Bioremediasi didefinisikan sebagai penggunaan mikroorganisme untuk proses detoksifikasi atau menghilangkan polutan, yang mengandalkan pada aktivitas enzimatik mikroba untuk merubah ataupun mendegradasi kontaminan, dengan cara menyingkirkan dan menghancurkan polutan lingkungan tersebut. Bioremediasi merupakan metode yang murah dalam menyingkirkan banyak polutan kimia yang memiliki efek tidak baik pada kesehatan manusia ataupun kualitas lingkungan. Bioremediasi merupakan akselerasi dari proses alami dalam biodegradasi polutan dan karenanya merupakan solusi yang alami untuk permasalahan polutan lingkungan, yang memiliki sedikit efek ekologi. Produk akhir dari bioremediasi yang efektif, seperti air dan karbondioksida yang bersifat non toksik dan dapat di akomodir tanpa membahayakan lingkungan dan organisme hidup (Philp dkk., 2005).

Beberapa alasan utama mengapa proses bioremediasi sangat dibutuhkan adalah pertama, terkait dengan kesehatan masyarakat; kedua, konservasi lingkungan dan terakhir, biaya dari dekontaminasi. Air bersih sangat esensial untuk pertanian dan industri. Begitu juga dengan tanah yang bersih, meskipun suatu negara memiliki tanah yang luas, tetapi tidak akan dapat dikembangkan ketika terdapat kontaminan pada area tersebut (Philp dkk., 2005).

Teknik bioremediasi secara luas dibagi dalam dua kategori yaitu didasarkan pada apakah biodegradasi di stimulasi *in-situ* ataukah di bawah keluar *ex-situ* dengan *composting* atau menggunakan *bioreactor*. Teknik *in-situ* melibatkan peningkatan laju degradasi dari kontaminan yang berpengaruh terhadap tanah, sedimen, air permukaan atau pun air tanah. Teknik *ex-situ* membutuhkan pemindahan material kontaminan (biasanya tanah atau sedimen) yang dilanjutkan dengan perlakuan di dalam bioreaktor, *biopile*, *composting*, kolam ataupun laguna.

Bioremediasi terhadap kontaminan organik di pengaruhi oleh banyak faktor lingkungan, antara lain pH, suhu, kandungan air, karakter geologi, ketersediaan nutrien, ketersediaan kontaminan dalam populasi mikroba (*bioavailibilty*), kometabolisme, akseptor elektron dan lainnya (Colleran dkk., 1997).

2.7. Biodegradasi

Biodegradasi merupakan salah satu proses dalam bioremediasi atau dapat diartikan sebagai proses penguraian senyawa polutan oleh aktivitas mikroba (jamur, bakteri, yis dan alga) yang mengakibatkan adanya transformasi struktur suatu senyawa, sehingga terjadi perubahan integritas molekular dan toksisitasnya. Biodegradasi dapat berlangsung efektif apabila didukung oleh kondisi lingkungan yang cocok untuk menunjang pertumbuhan dan perkembangan mikroba (Colleran, 1997).

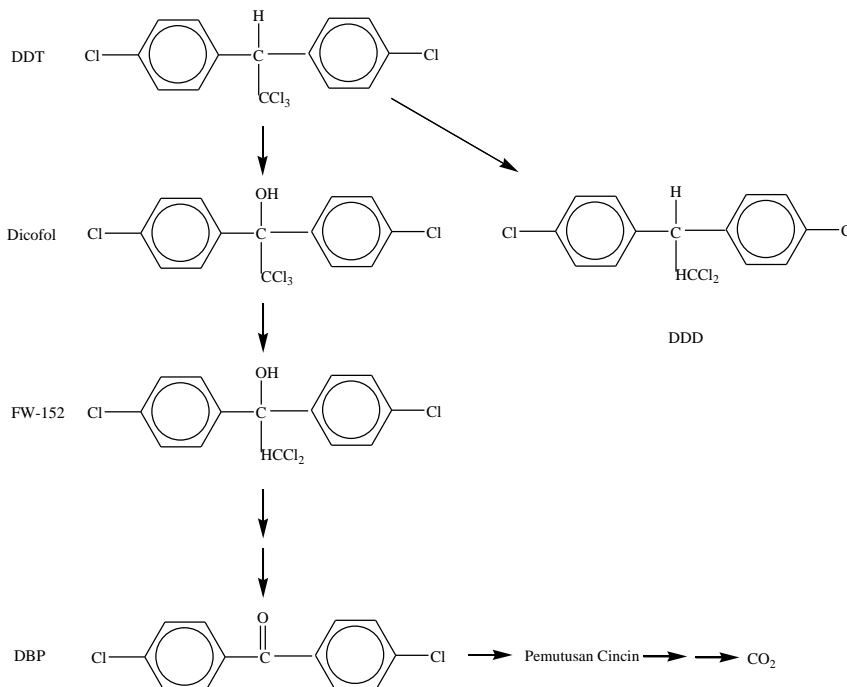
Dalam prosesnya, biodegradasi tergantung pada produksi mikroba atau enzim yang mampu mengkatalisis reaksi kimia yang akan mengubah polutan menjadi bentuk paling sederhana (proses mineralisasi). Jika dikaitkan dengan teknologi bioremediasi, biodegradasi dapat ditingkatkan dalam beberapa cara, tetapi kemampuan biokimia dari organisme juga harus ditinjau untuk mengantisipasi adanya perubahan genetik. Cara yang paling sering digunakan untuk menstimulasi biodegradasi meliputi:

1. Modifikasi kimia lingkungan, meliputi penambahan bahan kimia yang bertindak sebagai akseptor elektron atau tambahan donor elektron atau disebut dengan meningkatkan bioavailabilitas.
2. Modifikasi fisika di lokasi tercemar, dapat dihubungkan dengan metode *ex-situ* ataupun *in-situ*. Metode tersebut umumnya mengatasi keterbatasan pasokan akseptor elektron.
3. Modifikasi biologi (bioaugmentasi) yang merupakan penambahan mikroba ke lokasi yang tercemar untuk mempercepat degradasi. Bioaugmentasi merupakan satu-satunya cara penggunaan genetik untuk mengubah suatu mikroba.

4. Modifikasi kimia dan fisika (biostimulasi) sudah cukup untuk mencapai hasil biodegradasi apabila populasi mikro organisme indigen telah mampu menghancurkan polutan.

2.8. Mekanisme Degradasi DDT oleh Jamur Pelapuk Putih

Meskipun DDT sangat sulit untuk terdegradasi, tetapi pada dasarnya DDT dapat terdegradasi secara perlahan di lingkungan melalui proses yang alami. Bumpus dan Aust (1987) dalam studinya menggunakan tiga strain dari *Phanerochaete chrysosporium* ditambah dengan *Pleurotus ostreatus*, *Phenllinus weirii* dan *Polyporus versicolor* dengan parameter perolehan ulang DDT, identifikasi metabolit, analisis masa dan mineralisasi [^{14}C] DDT. Perolehan DDT selama 30 hari inkubasi sebesar 30%, metabolit yang terbentuk adalah 2,2,2-trikloro-1,1-bis(4-klorofenil)etanol (dicofol), 1,1-dikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etana (DDD), 2,2-trikloro-1,1-bis(4-klorofenil)etanol (FW-152) dan 4,4'-diklorobenzofenon (DBP), mineralisasi [^{14}C]DDT sebesar 5,3 – 13,5% selama 30 hari inkubasi.

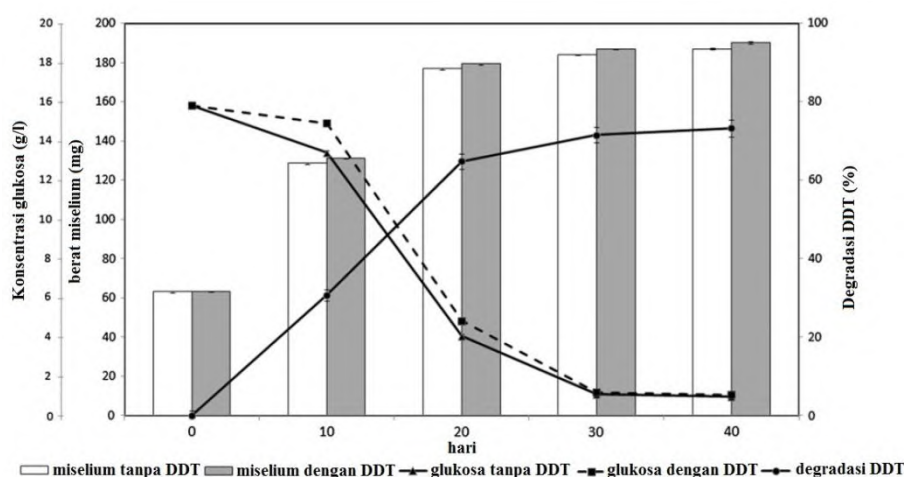


Gambar 2.3. Jalur degradasi utama metabolisme DDT oleh *P. chrysosporium* (Bumpus dan Aust, 1987)

Dugaan jalur degeradasi DDT oleh *P. chrysosporium* ditunjukkan oleh Gambar 2.3. DDT dioksidasi menjadi dicofol dan DDD, kemudian kedua senyawa tersebut dideklorinasi membentuk senyawa FW-152. Reaksi oksidasi menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan karbon-karbon sehingga terbentuk DBP, setelah itu terjadi reaksi reduksi deklorinasi yang menyebabkan terjadinya pemutusan cincin aromatik membentuk karbondioksida (CO₂).

2.8.1. Degradasi DDT menggunakan *Trameter versicolor* U97

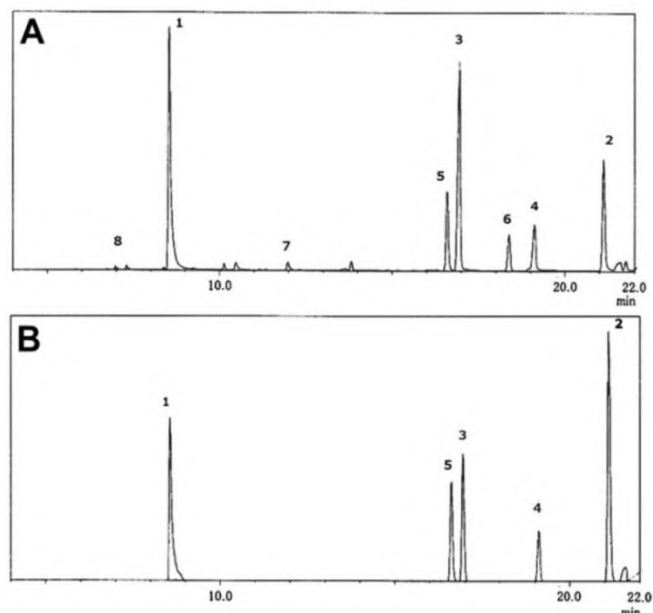
Kemampuan *T. versicolor* U97 untuk mendegradasi DDT ditentukan dengan menggunakan medium ekstrak gandum. Sebagaimana yang ditunjukkan pada Gambar 2.4 DDT mampu dihilangkan sekitar 65% selama 20 hari periode inkubasi. Setelah 40 hari inkubasi, rata-rata degradasi adalah 73%. Gambar 2.4 juga menunjukkan pertumbuhan kinetik dari *T. versicolor* U97 yang di kultivasi dengan penambahan ataupun tanpa penambahan DDT ke dalam media kultur. Hasil menunjukkan bahwa *T. versicolor* tidak menggunakan DDT sebagai substrat pertumbuhan ataupun sebagai sumber karbon, karena pertumbuhan miselium tidak berpengaruh dengan ada atau tidak adanya penambahan DDT ke dalam media. Adanya Metabolisme DDT ditunjukkan dengan adanya peningkatan massa miselium dan peningkatan konsumsi glukosa, semakin besar massa miselium, proses degradasi semakin cepat (Sari dkk., 2012).



Gambar 2.4. Kurva pertumbuhan *T. versicolor* dengan dan tanpa penambahan DDT (Sari dkk., 2012)

2.8.2. Jalur degradasi DDT oleh *T. versicolor*

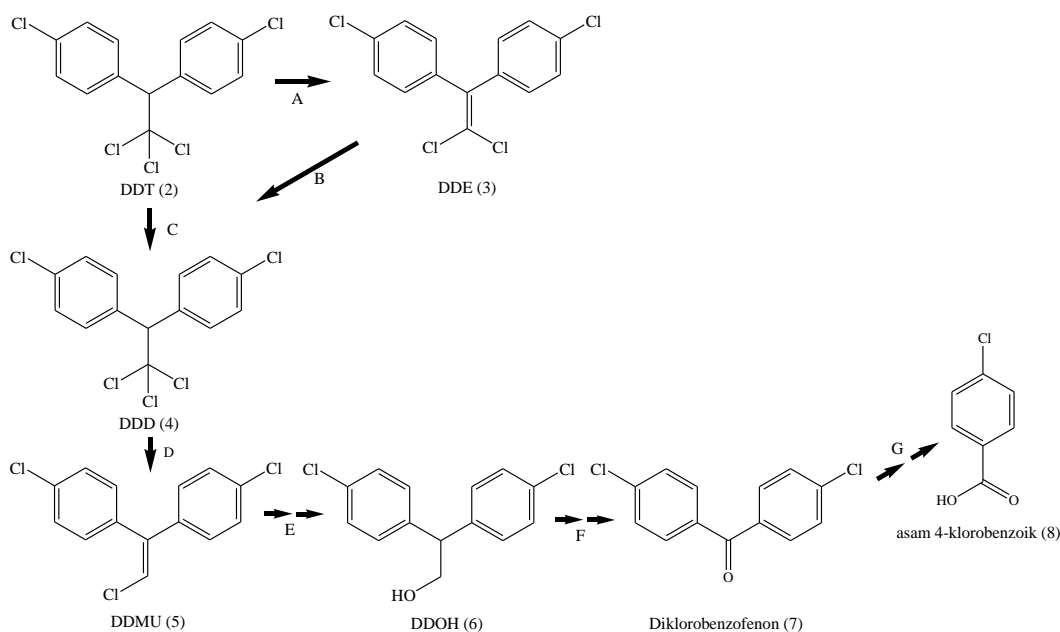
Produk metabolit yang dihasilkan oleh *T. versicolor* U97 yang diinkubasi dengan 0,1 mM DDT selama 30 hari dianalisa menggunakan GC-MS.



Gambar 2.5. Total ion kromatogram produk metabolit dari degradasi DDT oleh *T. versicolor* U97; (A) tanpa inhibitor; (B) dengan inhibitor; Antrasin standard internal (1), DDT (2), DDE (3), DDD (4), DDMU (5), DDOH (6), DBP (puncak 7), asam 4-klorobenzoat (8) (Sari dkk., 2012).

Gambar 2.5A menunjukkan produk metabolit yang diperoleh dari degradasi DDT oleh *T. versicolor* U97 setelah di ekstraksi dan di analisa menggunakan GC-MS. DDE merupakan produk metabolit utama dan sejumlah DDD, 1-kloro-2,2-bis(4-klorofenil)etilen (DDMU), 2,2-bis(4-klorofenil) etanol (DDOH), bis(4-klorofenil)ketone (DBP), dan asam 4-klorobenzoat. DDT menjadi DDE dibentuk melalui proses dehidrohalogenasi yang selanjutnya menjadi DDD melalui hidrogenasi. Gambar 2.5 menunjukkan bahwa residu dari DDE paling tinggi dibandingkan dengan residu lain, hal ini berarti degradasi DDE lebih lambat dari DDT dan DDD. Gambar 2.5B menunjukkan bahwa hanya DDE, DDD dan DDMU yang dihasilkan selama penambahan EDTA sebagai inhibitor. Maka dapat di simpulkan bahwa LiP berperana dalam degradasi DDT. DDD mengalami reaksi deklorinasi menghasilkan DDMU, lalu reaksi hidroksilasi menghasilkan

DDOH. Senyawa ini kemungkinan dioksidasi menjadi DBP dan menjadi senyawa cincin aromatik tunggal, asam 4-klorobenzoat (Gambar 2.6).



Gambar 2.6. Dugaan jalur metabolisme DDT dalam mikroorganisme; (A) dehidrohalogenasi, (B) hidrogenasi, (C) deklorinasi, (D) deklorinasi, (E) hidroksilasi, (F) oksidasi, (G) pembelahan cincin meta (Sari dkk., 2012)

2.8.3. Degradasi DDT oleh *Pleurotus ostreatus*

P. ostreatus merupakan salah satu jenis jamur pelapuk putih. Sistem enzim ligninolitik *P. ostreatus* menghasilkan enzim mangan peroksidase dan lakase. Jamur ini memproduksi lakase dalam jumlah banyak, namun tidak menghasilkan enzim lignin peroksidase (Santoyo, 2008). Purnomo dkk. (2008) melaporkan bahwa *P. ostreatus* dapat mendegradasi DDT sekitar 45% dalam media PDB, yang diinkubasi selama 14 hari, pada suhu 30°C. *P. ostreatus* mampu mendegradasi DDT menjadi beberapa produk metabolit diantaranya DDA, DDD, DDMU, dan DDMS.

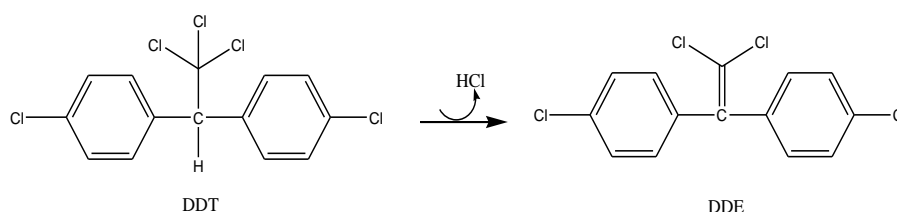
2.9. Degradasi DDT oleh Bakteri

Degradasi pestisida organoklorin telah diobservasi di bawah 2 kondisi, yaitu kondisi aerob dan anaerob. Degradasi DDT secara aerob dilakukan oleh beberapa tipe bakteri seperti *Alcaligenes eutrophus* A5, *Serratia Marcescens* DT-

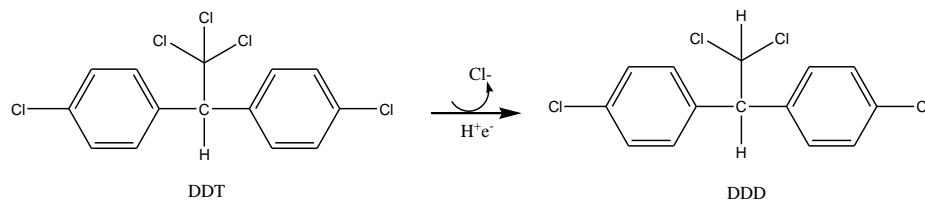
1P, *Micrococcus varians*, *Lactobacillus plantarum* dan *Pseudomonas sp.* (Nadeau dkk., 1994; Abou-Arab, 2002; Bidlan and Manonmani, 2002; Chandrappa dan Harichandra, 2004). Degradasi DDT secara anaerob, dimana DDT di konversi menjadi dikloro difenil dikloroetana (DDD) melalui reaksi reduksi deklorinasi (Hägglom dan Valo, 1992).

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

Reaksi dehidroklorinasi DDT merupakan suatu proses reaksi dimana terjadi pemindahan atom hidrogen dari karbon dan klorin dari karbon terklorinasi jenuh yang membentuk sebuah ikatan rangkap karbon-karbon pada substrat (Gambar 2.7.). Reaksi ini dikatalisis oleh enzim dehidrohalogenase. Pada reaksi reduktif deklorinasi DDT terjadi reaksi penggantian atom klorin pada karbon non-aromatik dengan atom hidrogen. Dalam reaksi ini diperlukan donor elektron atau reduktan dapat berupa substrat organik ataupun gas hidrogen dan aseptor elektron, dalam hal ini maka DDT berperan sebagai aseptor elektron, reaksi ini dikatalisis oleh enzim dehalogenase (Bidlan, 2003). Reaksi reduktif deklorinasi terjadi ketika bakteri anaerob mengalami kekurangan aseptor elektron alami seperti NO_3^- , SO_4^{2-} , sehingga bakteri akan menggunakan senyawa aromatik terklorinasi tertentu sebagai aseptor elektron, proses ini disebut halo-respirasi. Reaksi reduktif deklorinasi secara umum terjadi dibawah kondisi anaerob, namun dapat juga terjadi pada proses degradasi secara aerob terhadap senyawa terklorinasi tinggi tertentu (Gambar 2.8.).



Gambar 2.7. Reaksi dehidroklorinasi DDT menjadi DDE



Gambar 2.8. Reaksi reduksi deklorinasi DDT menjadi DDD

2.10. Peranan biosurfaktan

Biosurfaktan dihasilkan sebagai bentuk respon terhadap rendahnya tingkat kelarutan dari n-alkana sebagai substrat pertumbuhan. Oksigen lebih mudah larut dalam fase minyak dari pada fase air, dan kelarutan alkana yang rendah memberikan tekanan pada pertumbuhan mikroba (Hafeburg dkk., 1986 dalam Atlas, 2005). Biosurfaktan dapat mendesorpsi polutan dari tanah dalam proses biodegradasi (Mata-Sandoval dkk., 2002) ataupun digunakan untuk pencucian air tanah yang terkontaminasi (Singh dkk., 2007). Urum dan Pekdemir (2004) juga menyatakan bahwa biosurfaktan dapat diaplikasikan untuk pencucian tanah yang terkontaminasi oleh minyak mentah, dimana biosurfaktan mampu untuk menghilangkan kontaminasi minyak mentah dari tanah dengan hasil yang signifikan. Rhamnolipid mampu menghilangkan 80% minyak dan lecithin sekitar 42%. Kang dkk. (2010) juga melakukan investigasi terkait dengan efektivitas dari soforolipid dalam proses biodegradasi hidrokarbon dan minyak mentah dalam tanah melalui skala laboratorium. Hasilnya menunjukkan penambahan biosurfaktan meningkatkan efektifitas dari biodegradasi

Biosurfaktan memberikan keuntungan yang lebih banyak dibanding surfaktan sintetis. Biosurfaktan memiliki toksisitas rendah dan lebih mudah mendegradasi (Hafeburg dkk., 1986 dalam Atlas, 2005). Biosurfaktan juga dapat dihasilkan pada kondisi suhu, pH dan salinitas yang ekstrim, serta aman secara ekologis (Kosaric (1992); Desai dan Banat (1997)).

2.10.1. Tipe biosurfaktan

Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme, baik eukariotik maupun prokariotik memiliki jenis yang beraneka macam, tapi secara sederhana dapat dibagi ke beberapa group berdasarkan struktur, yaitu: glikolipid, lipopetida

dan biopolymer (Sullivan, 1998 dalam Atlas, 2005). Glikolipid merupakan biosurfaktan yang paling sering dikaitkan dengan proses degradasi minyak, kepala hidrofiliknya adalah rhamnosa atau trehalosa.

Beberapa bakteri penghasil biosurfaktan diantaranya *P. aeruginosa* yang menghasilkan rhamnolipid, *B. subtilis* yang menghasilkan lipopeptida yang disebut surfaktin (Ron dan Rosenberg, 2001; Mata-Sandoval dkk., 2002; Mulligan, 2005), *Nocardia amarae* (Moussa dkk., 2006), *Saccharomyces lipolytica* CCT0913 (Lima dan Alegre, 2009) dan *R. pickettii* menghasilkan rhamnolipid (Plaza dkk., 2007). Secara struktural, biosurfaktan biasanya merupakan anion atau netral, hanya sedikit yang berupa kation, serta mengandung grup amina. Bagian hidrofobiknya dibentuk oleh rantai asam lemak yang panjang, asam lemak hidroksil atau asam lemak α -alkil- β -hidroksi. Bagian hidrofiliknya terdiri dari karbohidrat, asam amino, peptida siklik, fosfat, asam karboksilat dan alkohol (Mulligan dkk., 2001).

2.11. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa termasuk bakteri gram-negatif, hidup secara aerob obligat. Kedudukan *P. aeruginosa* dalam dunia bakteri adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonadaceae
Marga	: Pseudomonas
Spesies	: <i>P. aeruginosa</i> (Todar, 2008).

P. aeruginosa dapat diisolasi dari berbagai macam habitat, baik tanah, air dan tanaman. *P. aeruginosa* juga merupakan patogen oportunistik yang dapat menyebabkan infeksi serius pada manusia (Costerton 1980; Lyczak dkk. 2000). Jarvis dan Johnson (1949) menyatakan bahwa *P. aeruginosa* menghasilkan biosurfaktan yang disebut rhamnolipid, yang merupakan molekul amfifilik.

Rhamnolipid telah dimanfaatkan baik untuk industry maupun untuk proses bioremediasi lingkungan (Lang and Wullbrandt 1999; Maier and Soberón-Chávez

2000). Penggunaan senyawa ini termasuk dalam produksi bahan kimia yang aman, untuk pelapis, sebagai aditif untuk remediasi lingkungan dan juga sebagai *biological control agent* (Stanghellini and Miller, 1997).

Rhamnolipid yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa* merupakan senyawa aktif permukaan. Aktivitas permukaannya berhubungan dengan glikolipid moiety (Itoh dkk., 1971). Terdapat 2 jenis rhamnolipid yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa*, yaitu R-1 yang terdiri dari 2 molekul rhamnosa dan 2 molekul asam β -hidroksidekanoat dan R-2 yang hanya terdiri dari 1 unit rhamnosa (Guerra dkk., 1984).

Bakteri *P. aeruginosa* mampu untuk mendegradasi senyawa polutan dilingkungan termasuk DDT, hasil penelitian yang dilakukan oleh Bidlan (2003) menunjukkan bahwa *P. aeruginosa* mampu mendegradasi DDT sebesar 80-100% dengan masa inkubasi 5 hari, yang tergantung pada perbandingan konsentrasi DDT dan bakteri dalam media kultur.

2.12. Bakteri *Bacillus subtilis*

B. subtilis termasuk bakteri gram-positif, dan berbentuk batang, kedudukan *B. subtilis* dalam dunia bakteri adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Marga	: Bacillus
Spesies	: <i>B. subtilis</i>

B. subtilis merupakan bakteri penghasil biosurfaktan. Biosurfaktan yang paling umum dihasilkan adalah lipopetida yang biasa disebut surfaktin. Surfaktin terdiri dari rantai panjang asam lemak β -hidroksi, dimana 2 gugus fungsinya tersusun dari residu 7 asam amino (Dufuor dkk., 2005; Seydlova, 2008). Jean-Marc dkk. (2003) menyatakan bahwa surfaktin mampu untuk meningkatkan proses remediasi terhadap lingkungan yang tercemar minyak. Hermansyah (2014)

melaporkan bahwa bakteri *B. subtilis* mampu mendegradasi DDT sebesar 43% dengan masa inkubasi selama 7 hari.

2.13. Bakteri *Ralstonia pickettii*

R. pickettii termasuk bakteri gram-negatif, berbentuk batang, dan banyak ditemukan di lingkungan yang lembab seperti tanah, sungai dan danau. *R. pickettii* merupakan organisme oligotrofik, sehingga mampu untuk hidup pada media dengan konsentrasi nutrisi yang rendah. Beberapa strain dari bakteri ini menunjukkan kemampuan untuk dapat hidup pada lingkungan yang terkontaminasi logam dalam jumlah besar. Kemampuan tersebut menjadikan *R. pickettii* dapat digunakan untuk proses bioremediasi. Kedudukan *R. pickettii* dalam dunia bakteri adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Beta Proteobacteri
Ordo	: Burkholderiales
Famili	: Ralstoniaceae
Marga	: Ralstonia
Spesies	: <i>R. pickettii</i>

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Hundt dkk. (1998) menunjukkan *R. pickettii* mampu mendegradasi 4-chlorobiphenyl, lebih dari 90% dengan masa inkubasi 7-10 hari dalam sistem tanah inokulasi.

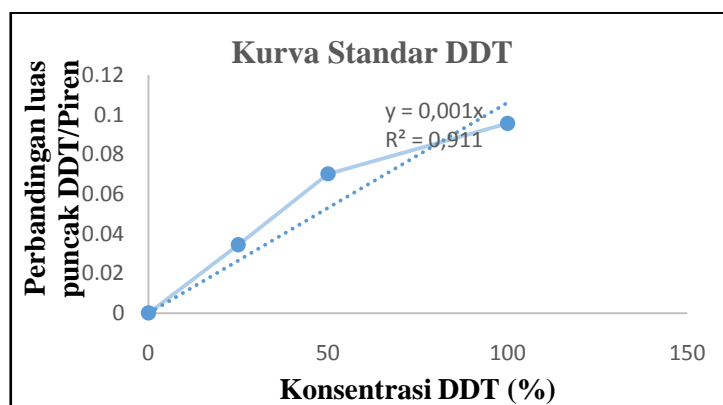
2.14. Metode Analisis

2.14.1. HPLC

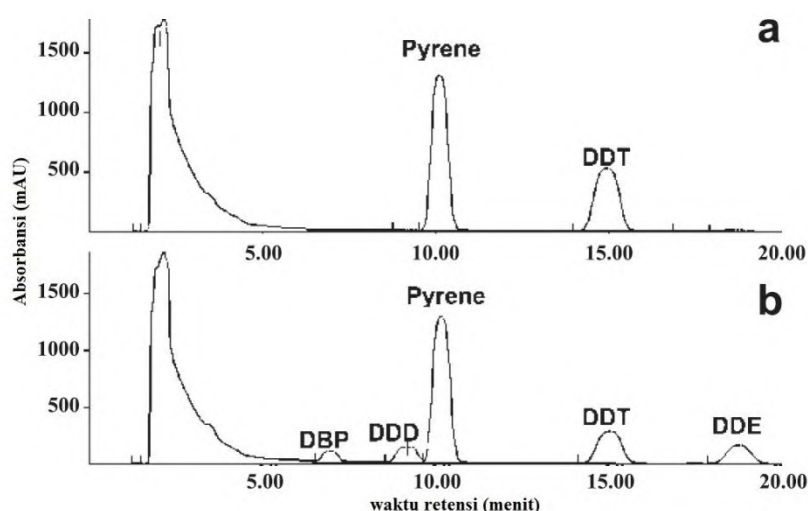
Pada penelitian ini, HPLC digunakan untuk membuat kurva standar DDT dan menentukan nilai perolehan kembali dari DDT yang diinkubasi dengan jamur dan bakteri.

Gambar 2.9 menunjukkan penggunaan HPLC untuk membuat kurva standar DDT, dari kurva standar ini akan ditentukan nilai perolehan ulang DDT, setelah dilakukan analisa perbandingan luas puncak DDT dan pirena dihitung

sebagai fungsi $y = ax + b$, dengan x sebagai konsentrasi dan y adalah luas puncak DDT banding luas puncak pirena. Hasil kromatogram DDT dan produk metabolit ditunjukkan pada Gambar 2.10.



Gambar. 2.9 Kurva standar DDT (Hermanysah, 2014)



Gambar 2.10. Kromatogram DDT dan produk metabolit yang dianalisa menggunakan HPLC. (a) Kontrol, (b) Perlakuan. Pirena merupakan standar internal (Purnomo dkk., 2008)

HPLC adalah salah satu tipe kromatografi elusi yang paling serbaguna dan digunakan secara luas. HPLC digunakan untuk memisahkan dan menentukan jenis dari senyawa-senyawa organik, anorganik dan material biologi. HPLC pada umumnya diklasifikasikan berdasarkan mekanisme pemisahan atau tipe dari fase diam (Skoog dkk, 2004). HPLC menerapkan hasil optimasi kolom sebagaimana yang dijabarkan oleh van Deemter dengan mengatur laju alir fase geraknya

sehingga pemisahan menjadi sempurna, serta mengatur temperatur sehingga masalah difusi longitudinal dapat diatasi. Dengan demikian, laju migrasi akan meningkat walaupun difusi diperkecil dengan menurunkan kolom serta partikel fase diamnya (Wonorahardjo, 2013).

2.14.1.1. Kolom HPLC

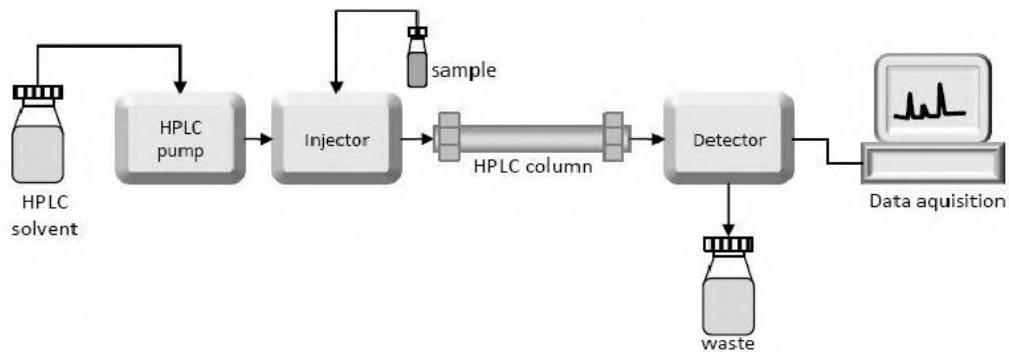
Terdapat banyak tipe kolom yang tersedia secara komersial untuk HPLC, yaitu dengan membuat permukaan fase diam permanen dengan berbagai gugus fungsi yang terikat di permukaan kolom (Wohorahardjo, 2013). fase diam pada HPLC berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. Oktadesil silika (ODS atau C18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi.

2.14.1.2. Detektor

Detektor yang paling sering digunakan untuk HPLC berdasarkan penyerapan ultraviolet atau radiasi tampak, bentuknya adalah sebuah sel kecil dalam sebuah spektrofotometer ultraviolet. Senyawa organik akan menyerap pada wilayah ultraviolet, sinyalnya akan ditangkap dan diolah lebih lanjut (Skoog dkk., 2003)

2.14.1.3. Proses Elusi

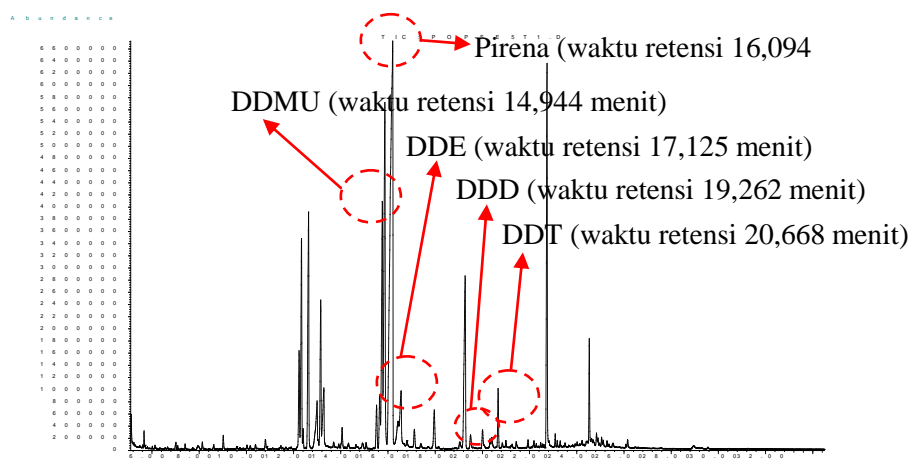
Pada HPLC, molekul pelarut akan bersaing dengan molekul solute untuk menempati fase diam. Elusi terjadi ketika pelarut menggantikan solute pada fase diam. Semakin polar sebuah pelarut maka semakin besar kemampuannya untuk terelusi pada fase diam. Semakin besar kekuatan elusinya maka semakin cepat laju elusi pelarut dalam kolom. Terdapat dua jenis HPLC, yaitu HPLC fase normal (*normal phase*) dan HPLC fase terbalik (*reversed phase*). Pada HPLC fase normal fase diamnya bersifat polar dan pelarut yang digunakan relatif non polar. Pada HPLC fase terbalik, fase diamnya bersifat non polar dan pelarut yang digunakan bersifat polar (Harris, 2007).



Gambar 2.11. Diagram Kotak Instrumen HPLC

2.14.2. GC-MS

Pada penelitian ini, GC-MS digunakan untuk menentukan produk metabolit yang dihasilkan selama proses inkubasi DDT dengan jamur dan bakteri. Gambar 2.11 menunjukkan kromatogram GC pada sampel. Fase gerak berupa gas yang inert sehingga hanya berfungsi sebagai pembawa. Gas yang digunakan adalah He, N₂, H₂, Ar. Aliran gas diatur dalam program yang disesuaikan dengan keadaan sampel. Seluruh rancangan alat harus dalam sistem tertutup karena fase gerakanya adalah gas. Seluruh sistem GC dikendalikan oleh computer.



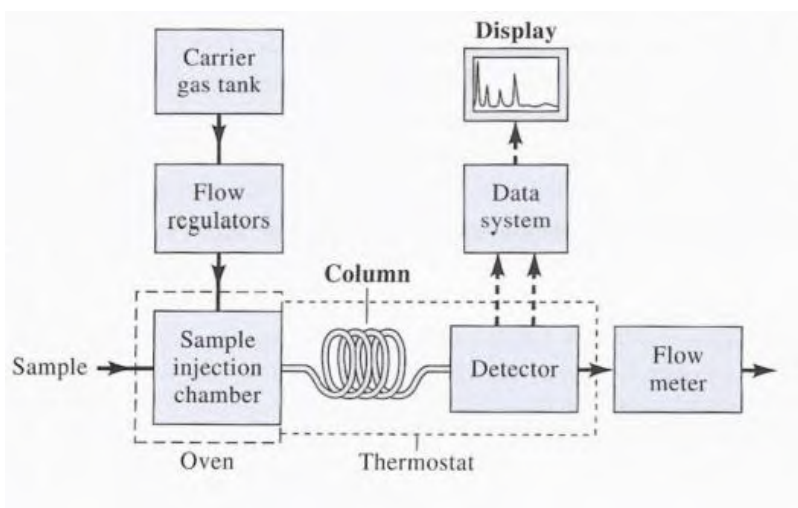
Gambar 2.12 Kromatogram GC pada sampel (Hermansyah, 2014)

Fase diam kromatografi gas biasanya terdiri dari lapisan tipis cairan yang dilekatkan pada padatan penyangga (solid support). Penyangga ini harus berupa material dengan ukuran butiran kurang lebih seragam, berpori, dan mempunyai

luas permukaan besar ($\approx 1 \text{ m}^2/\text{g}$), tidak mudah bereaksi (*inert*) namun cukup polar untuk segera dibasahi oleh cairan yang akan menjadi fase diam. Permukaan padatan penyangga ini dapat mempunyai beberapa gugus fungsi sehingga sifatnya dapat dimodifikasi.

Adapun fase diam untuk kromatografi gas cair biasanya adalah senyawa-senyawa *nonvolatile* yang stabil terhadap panas, tidak mudah bereaksi, dan mempunyai harga K yang stabil sehingga tidak berubah sepanjang kolom. Interaksi senyawa sampel yang dibawa fase gerak dengan fase diam dimungkinkan karena adanya gaya van der Waals.

Mekanisme kerja kromatografi gas yaitu, gas yang merupakan fase gerak dialirkan melalui kolom yang berisi fasa diam dan larutan sampel disuntikkan ke dalam septum. Cuplikan sampel yang telah berubah menjadi gas dibawa oleh gas pembawa ke dalam kolom dan di dalam kolom terjadi proses pemisahan, kemudian komponen-komponen sampel yang telah terpisah satu-persatu meninggalkan kolom. Detektor akan mendeteksi jenis maupun jumlah tiap komponen campuran yang kemudian direkam oleh rekorder dan menghasilkan data berupa puncak-puncak yang disebut kromatogram. Jumlah puncak menyatakan jumlah komponen yang terdapat di dalam sampel, sedangkan lebar puncak bergantung kepada kuantitas suatu komponen dalam sampel (Harris, 2007).



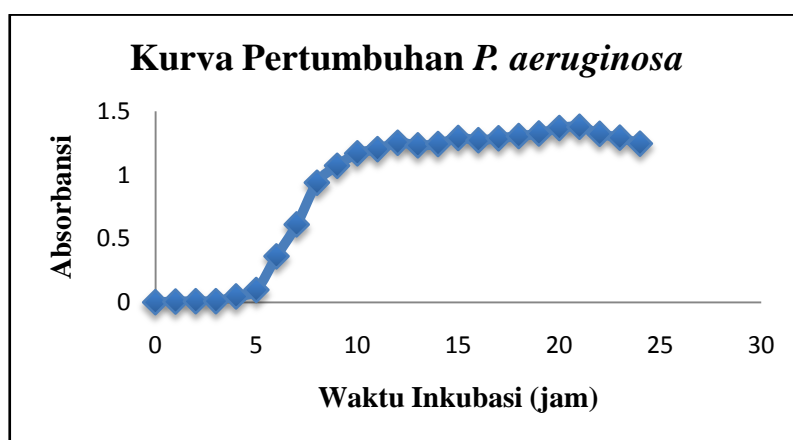
Gambar 2.13. Diagram Kotak Komponen Kromatografi Gas

2.14.3. Spektrofotometer UV-Vis

Pada penelitian ini spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengukur menghitung pertumbuhan sel dari bakteri yang akan digunakan dalam proses degradasi. Metodenya berdasarkan pada terjadinya peningkatan *optical density* (OD) dalam kultur bakteri dikarenakan meningkatnya jumlah sel dan ukuran sel dari bakteri. Jika cahaya dari spektrofotometer mengenai sel, maka sebagian cahaya akan dihamburkan dan sebagian diteruskan. Jumlah cahaya yang dihamburkan berbanding lurus dengan jumlah sel bakteri. Semakin banyak jumlah sel bakteri, semakin sedikit cahaya yang diteruskan (Waluyo, 2010)

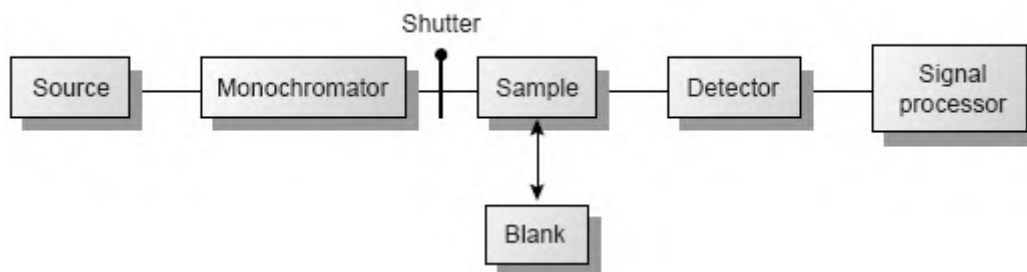
Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 600nm, dikarenakan media kultur yang digunakan berwarna kuning. Nilai absorbansi yang didapatkan dari hasil pengukuran digunakan untuk menghitung jumlah bakteri yang ada didalam kultur. Nilai absorbansi juga digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan bakteri (Gambar 2.12), sehingga dapat diketahui pada fase stationer dari bakteri.

Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrofotometer dengan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Spektrofotometer tersusun dari sumber spektrum tampak yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blangko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blangko.



Gambar 2.14 Kurva Pertumbuhan *P. aeruginosa* (Ashari, 2014)

Prinsip kerja spektrofotometer adalah adanya sumber radiasi untuk spektroskopi UV-Vis yaitu lampu tungsten. Sumber radiasi akan memancarkan cahaya polikromatik. Cahaya polikromatik UV akan melewati monokromator yaitu suatu alat menghasilkan berkas radiasi dengan satu panjang gelombang (monokromator). Monokromator radiasi UV, sinar tampak dan infra merah adalah serupa yaitu mempunyai celah (slit), lensa, cermin dan perisai atau grating. Berkas-berkas cahaya dengan panjang tertentu kemudian akan dilewatkan pada sampel yang mengandung suatu zat dalam konsentrasi tertentu. Oleh karena itu, terdapat cahaya yang diserap (diabsorpsi) dan ada pula yang diteruskan. Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang diteruskan diukur sebagai transmitansi (T). Radiasi yang melewati sampel akan ditangkap oleh detektor yang berguna untuk mendeteksi cahaya yang melewati sampel tersebut. Cahaya yang melewati detektor diubah menjadi arus listrik yang dapat dibaca melalui recorder dalam bentuk transmitansi, absorbansi atau konsentrasi. (Skoog dkk., 2004).



Gambar 2.15. Diagram Kotak Spektrofotometer UV-Vis

BAB III

METODOLOGI

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Peralatan dan instrumentasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Erlenmeyer berpenutup, gelas beker, neraca analitik (OHAUS), corong pisah, labu bundar, corong kaca, jarum ose, cawan steril, botol ampul, suntikan, vacuum pump (GAST), *ultrasonic cleaner*, *rotary evaporator* (EYELA, N-10001), *autoclave* (TOMY, ES-315), *shaker inkubator* (Gerhardt), filter Whatman 0,2 μm diameter 110 mm, HPLC (Jasco, Japan) dengan intelligent pump PU-1580 (Jasco, Japan), UV-Vis multiwavelength detector LG 1580-02 (Jasco, Japan), auto sampler AS-950 (Jasco, Japan), kolom inertsil ODS-3 (150 mm) diameter 4,6 mm (GL Sciences, Japan), tabung gas oksigen, GC-MS (Agilent Technologies 7890A), Inkubator, spektrofotometer (SP-300 Optima), kuvet kuarsa, homogenizer, sentrifuge (IEC CL40R).

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: DDT, DDD, DDE, DDMU, pirena (5mM dalam DMSO), potato dextrose agar (PDA), potato dextrose broth (PDB), nutrient broth (NB), nutrient agar (NA), aseton, aqua DM, Na_2SO_4 , n-heksana, methanol, jamur *P. eryngii*, bakteri *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Ralstonia pickettii* NBRC 102503.

3.2. Regenerasi Jamur *P. eryngii*

Pada penelitian ini menggunakan Jamur pelapuk putih dari spesies *P. eryngii* (Jamur Tiram Raja). Jamur diinokulasi ke dalam cawan petri dengan diameter 9 cm yang telah berisi medium agar steril PDA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama kurang lebih 7 hari sampai seluruh permukaan medium agar tertutupi miselium.

3.3. Persiapan Kultur Cair Jamur

Miselium jamur hasil regenerasi dengan diameter 1 cm diinokulasikan ke dalam 10 ml media PDB dalam labu erlenmeyer 100 mL dan diinkubasi kembali pada suhu 30°C selama 7 hari.

3.4. Regenerasi Bakteri

Bakteri penghasil biosurfaktan dari spesies *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. picketti* digunakan pada penelitian ini. Masing-masing 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 Bakteri

Sebanyak satu koloni dari masing-masing jenis bakteri hasil regenerasi diinokulasi ke dalam 450 mL PDB, hasil inokulasi ini merupakan kultur cair dari bakteri. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C dan dikocok dengan kecepatan 180 rpm. Absorbansi kultur cair diukur pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) menggunakan spektrofotometri UV-Vis tiap 1 jam sekali. Dari data hasil pengukuran OD, dibuat kurva pertumbuhan dengan absorbansi sebagai fungsi waktu.

3.6. Persiapan Kultur Cair Bakteri

Sebanyak satu koloni dari masing-masing bakteri yang terbentuk dari hasil regenerasi diinokulasikan ke dalam 40 mL medium NB dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 21 jam untuk *P. aeruginosa*, 20 jam untuk *B. subtilis*, 30 jam untuk *R. pickettii*. Kultur dikocok dengan kecepatan 180 rpm. Bakteri dalam media cair akan digunakan dalam proses biodegradasi DDT.

3.7. Biodegradasi DDT oleh *P. eryngii*

Kultur cair *P. eryngii* yang telah di pre-inkubasi selama 7 hari, masing-masing ditambah 50 µL DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 µmol DDT/labu). Tiap labu diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip untuk mencegah kontaminasi. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu

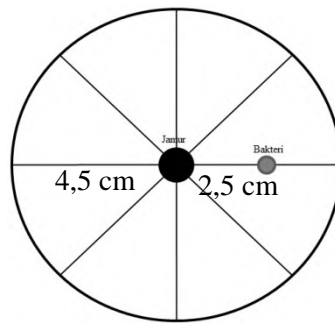
30°C. Sebagai kontrol, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT.

3.8. Biodegradasi DDT oleh Bakteri

Erlenmeyer yang berisi 10 mL media PDB ditambahkan bakteri hasil pre-inkubasi (21 jam untuk *P. aeruginosa*, 201 jam untuk *B. subtilis*, 30 jam untuk *R. pickettii*) masing-masing sebanyak 1, 3, 5, 7 dan 10 mL. Tiap labu ditambahkan 50 µL DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 µmol DDT/labu), kemudian ditambahkan 10 mL media PDB. Tiap labu diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip untuk mencegah kontaminasi. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT.

3.9. Konfrontasi Assay Jamur dan Bakteri

Sel bakteri hasil pre-inkubasi (20 jam untuk *P. aeruginosa*, 21 jam untuk *B. subtilis*, 30 jam untuk *R. pickettii*), di ambil sebanyak 20 ml dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm, setelah itu dipisahkan antara biomasa dan filtrat. 20 mL H₂O steril ditambahkan kedalam valcon, dihomogenkan dengan homogeniser, lalu disentrifugasi kembali selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Perlakuan ini diulang sebanyak tiga kali untuk memastikan kultur bakteri terbebas dari media tumbuhnya. Jamur *P. eryngii* dengan diameter 0,5 cm diinokulasikan menggunakan loop pada bagian tengah cawan petri yang berisi medium agar steril (PDA), kemudian ditambahkan 10 µL bakteri dengan jarak ±2,5 cm dari jamur, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C. Pada hari ke-3 masa inkubasi, miselium jamur yang telah tumbuh di beri tanda. Pertumbuhan miselium diukur mulai hari ke-4 sampai seluruh permukaan medium tertutupi miselium. Jamur dan bakteri yang menunjukkan hubungan sinergitas, digunakan pada proses degradasi DDT dalam mix kultur.



Gambar 3.1 Contoh perlakuan konfrontasi assay jamur dan bakteri

3.10. Screening Bakteri Biodegradasi DDT oleh *P. eryngii*

Screening bakteri bertujuan untuk memilih hasil terbaik dari biodegradasi DDT menggunakan jamur dengan penambahan bakteri. Kultur cair *P. eryngii* hasil pre-inkubasi selama 7 hari, masing-masing ditambah 50 μ L DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μ mol DDT/labu). Tiap labu ditambahkan bakteri *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* masing-masing sebanyak 7 ml, diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip untuk mencegah penguapan DDT. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai kontrol positif. Mix kultur dengan kemampuan degradasi optimal digunakan pada proses degradasi DDT selanjutnya.

3.11. Analisa Hasil Screening Bakteri

Kultur yang telah diinkubasi selama 7 hari, masing-masing ditambah 30 mL metanol dan 50 μ L pirena 5 mM. Sisa sampel dicuci dengan 50 ml aseton, setelah itu dihomogenizer dan disentrifuge. Supernatan yang terbentuk diambil, dan dianalisis menggunakan HPLC. Sebagai kontrol adalah degradasi hanya dengan menggunakan jamur dan masing-masing jenis bakteri.

3.12. Pengaruh Konsentrasi Penambahan Bakteri Terhadap Biodegradasi DDT oleh *P. eryngii* (Variasi Konsentrasi Bakteri)

Kultur cair *P. eryngii* hasil pre-inkubasi, ditambah dengan kultur cair *R. pickettii* dengan konsentrasi sebanyak 1, 3, 5, 7 dan 10 mL. Masing-masing kultur ditambah 50 μ L dari DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μ mol DDT/labu). Tiap labu diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan dipanaskan pada suhu 121°C selama 10 menit menggunakan autoclave sebelum ditambahkan DDT. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai kontrol positif.

3.13. Pengaruh Waktu Penambahan Bakteri Terhadap Biodegradasi DDT oleh *P. eryngii* (Variasi Waktu Penambahan Bakteri)

Kultur cair *P. eryngii* hasil pre-inkubasi, ditambah 50 μ L dari DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 μ mol DDT/labu). Kultur kemudian ditambahkan kultur cair bakteri hasil pre-inkubasi sebanyak 7 mL dengan variasi waktu penambahan hari ke-0, ke-1, ke-3, dan ke-5 setelah penambahan DDT. Tiap labu diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol, kultur dinonaktifkan dengan dipanaskan pada suhu 121°C selama 10 menit menggunakan *autoclave* sebelum ditambahkan DDT.

3.14. Pembuatan Kurva Standar DDT

Larutan standar DDT disiapkan dengan konsentrasi 25, 50, 75 dan 100 % (100 % = 0,25 μ mol DDT yang berasal dari 50 μ L DDT 5 mM). Masing-masing konsentrasi DDT ditambah dengan 50 μ L pirena 5 mM sebagai standar internal. Sampel dianalisa menggunakan HPLC dengan fasa gerak metanol 82 %. Dari hasil analisa dibuat kurva dengan nilai perbandingan luas area puncak DDT/pirena sebagai fungsi konsentrasi DDT.

3.15. Perolehan Ulang (Recovery) DDT dan Identifikasi Produk Metabolit

Masing-masing kultur hasil inkubasi ditambah 30 mL metanol dan 50 μ L pirena 5 mM. Sisa sampel dicuci dengan 5 ml aseton. Kultur disaring menggunakan filter 0,2 μ m diameter 110 mm. Filtrat dievaporasi pada suhu 40°C hingga aseton dan metanol menguap semua. Filtrat yang tidak menguap dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu ditambahkan 50 mL aquades dan 100 mL n-heksana dan dikocok selama 10 menit. Fasa organik dipisahkan sedangkan fasa air diekstrak kembali sebanyak 2 kali. Fasa organik yang terkumpul dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi Na₂SO₄ kemudian disaring. Sampel dievaporasi pada suhu 60°C hingga tersisa sekitar 1 mL. Sampel dianalisis menggunakan GC/MS. Sisa sampel dievaporasi kembali hingga kering dan ditambah 1 mL metanol. Residu (sampel) dihomogenkan dengan *ultrasonic cleaner*. Sampel dianalisis menggunakan HPLC, sampel dilusi dengan 82% methanol dan 18 ml air (1% TFA) dengan laju alir 1 ml/min. Aliran diatur pada kondisi isokratik.

GC dengan detektor MS yang digunakan dalam pengukuran ini mempunyai karakteristik sebagai berikut:

- Kolom: Kapiler HP-5MS (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane), panjang 30 m, diameter 250 μ m
- Gas pembawa: Helium
- Pengontrol aliran: Tekanan= 72,553 kPa, aliran= 1 mL/menit
- Volume injeksi: 1 μ L
- Aliran split: 54 mL/menit
- Program suhu (Isothermal): Suhu oven diatur pada 80°C selama 3 menit, dinaikkan hingga mencapai 320°C dan ditahan selama 2 menit dengan kenaikan konstan 20°C per menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 300°C dan ditahan selama 5 menit.

BAB IV

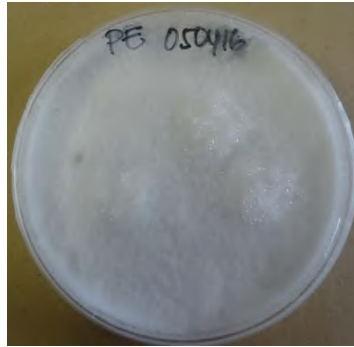
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kultur *Pleurotus eryngii*

4.1.1. Regenerasi Jamur *P. eryngii*

Jamur yang digunakan pada penelitian ini adalah *Pleurotus eryngii* (jamur tiram raja) yang diperoleh dari Universitas Kyushu, Fukuoka, Jepang. *P. eryngii* diinokulasi menggunakan penjepit aluminium ke dalam cawan petri yang berisi media agar steril *potato dextrose agar* (PDA). Pemilihan PDA sebagai media inokulasi karena PDA memiliki kandungan nutrisi yang lengkap dan sesuai untuk pertumbuhan jamur dimana PDA terdiri dari ekstrak kentang, dekstrosa dan agar. Ekstrak kentang yang kaya akan nutrisi, seperti karbohidrat, protein, vitamin, dan mineral dapat menstimulasi pertumbuhan spora jamur. Dekstrosa berfungsi sebagai sumber karbon yang mampu menghasilkan energi untuk digunakan sel jamur dalam metabolismenya. Protein digunakan sebagai sumber nitrogen yang berfungsi untuk mensintesis asam amino yang selanjutnya digunakan untuk sintesis protein. Vitamin B kompleks digunakan sebagai katalisator sekaligus sebagai koenzim. Unsur-unsur mineral meliputi unsur makro (K, P, Ca, Mg, dll.) dan unsur mikro (Cu, Zn, dll.) berfungsi untuk mendorong pertumbuhan jamur (Djarajah, 2001). Unsur fosfor dan kalium diserap dalam bentuk K_2PO_4 . Unsur fosfor berperan dalam penyusunan membran plasma, molekul organik seperti ATP, dan asam nukleat. Unsur kalium berperan dalam aktivitas enzim metabolisme karbohidrat dan keseimbangan ionik (Djarajah, 2001).

Seluruh proses inokulasi jamur, dilakukan dengan teknik aseptik, yang bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi oleh mikroorganisme lain. Jamur yang telah diinokulasi ke media PDA diinkubasi pada suhu 30°C dan disimpan di tempat gelap. Setelah 7 hari masa inkubasi, diperoleh miselium jamur *P. eryngii* hasil regenerasi yang telah menutupi seluruh permukaan media agar cawan petri dan siap digunakan untuk proses selanjutnya.



Gambar 4.1. Kultur *P. eryngii* dalam media PDA

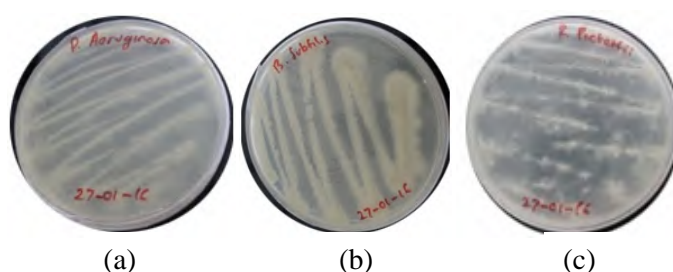
4.1.2. Persiapan Kultur Cair *P. eryngii*

Miselium jamur hasil regenerasi dengan diameter 1 cm diinokulasikan ke dalam dalam media cair steril *Potato Dextrose Broth* (PDB). Penggunaan PDB sebagai media cair dalam penelitian ini karena PDB merupakan media yang umum dan banyak digunakan untuk pertumbuhan jamur (Eddleman, 1998). PDB juga memiliki kandungan karbohidrat, protein, vitamin, dan mineral yang tinggi, sehingga dapat memacu pertumbuhan jamur tiram raja. Kultur diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C di tempat gelap. Kondisi lingkungan tanpa cahaya, merupakan kondisi yang optimal bagi jamur untuk tumbuh (Djarajah, 2001).

4.2. Regenerasi Bakteri

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* yang diperoleh dari NITE Biological Resource Center (NBRC, Jepang). Bakteri diinokulasi menggunakan jarum ose dengan metode goresan kuadran kedalam cawan petri yang berisi media agar steril *nutrient agar* (NA). Pemilihan NA sebagai media inokulasi karena NA memiliki kandungan nutrisi yang sesuai selama proses pertumbuhan dan perkembangan bakteri. Komposisi NA terdiri atas pepton, ekstrak daging, NaCl, dan agar-agar. Pepton berfungsi sebagai sumber nitrogen yang digunakan oleh bakteri untuk mensintesis asam amino, protein, dan enzim serta untuk membentuk sel baru. Ekstrak daging mengandung karbohidrat, protein, vitamin B kompleks, dan mineral (kalsium, sulfur, fosfat, kalium, dll). Karbohidrat digunakan sebagai sumber karbon yang merupakan sumber energi utama untuk metabolisme dan pertumbuhan bakteri.

Vitamin B kompleks berperan sebagai katalisator dalam sel dan koenzim. NaCl berfungsi sebagai penyedia elemen mikro berupa natrium, diperlukan untuk menaikkan tekanan osmosis dan menjaga keseimbangan psikokimia sel bakteri. Agar-agar berfungsi sebagai pematat media (Sutarma, 2000). Dalam proses ini bakteri diinkubasi pada suhu 37°C, yang merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri (Todar, 2012). Sekitar 24 jam sesudah masa inkubasi, diperoleh bakteri hasil regenerasi yang ditandai dengan terbentuknya koloni-koloni diatas media NA dan bakteri ini siap digunakan untuk proses selanjutnya (Gambar 4.2.).



Gambar 4.2. Koloni bakteri dalam media NA (a) *P. aeruginosa*; (b) *B. subtilis*; (c) *R. pickettii*

4.3. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Peningkatan ukuran dan massa sel selama perkembangan suatu organisme di sebut dengan pertumbuhan yang merupakan karakter unik dari semua organisme. Suatu organisme membutuhkan parameter tertentu untuk menghasilkan energi dan biosintesis seluler. Pertumbuhan suatu organisme di pengaruhi oleh faktor fisika dan nutrisi. Faktor fisika meliputi pH, suhu, tekanan osmotik, tekanan hidrostatis dan kadar air yang terkandung dalam media tempat suatu organisme tersebut tumbuh. Faktor nutrisi meliputi jumlah karbon, nitrogen, sulfur, fosfor dan elemen lain yang terdapat dalam media pertumbuhan. Bakteri merupakan organisme uniseluler (sel tunggal). Ketika bakteri mencapai ukuran tertentu, maka sel akan membelah diri. Tahap ini disebut sebagai fase pertumbuhan. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama yaitu fase lag (fase lambat), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat), fase stasioner (fase statis) dan fase penurunan populasi (kematian) (Prescott dkk., 2005).

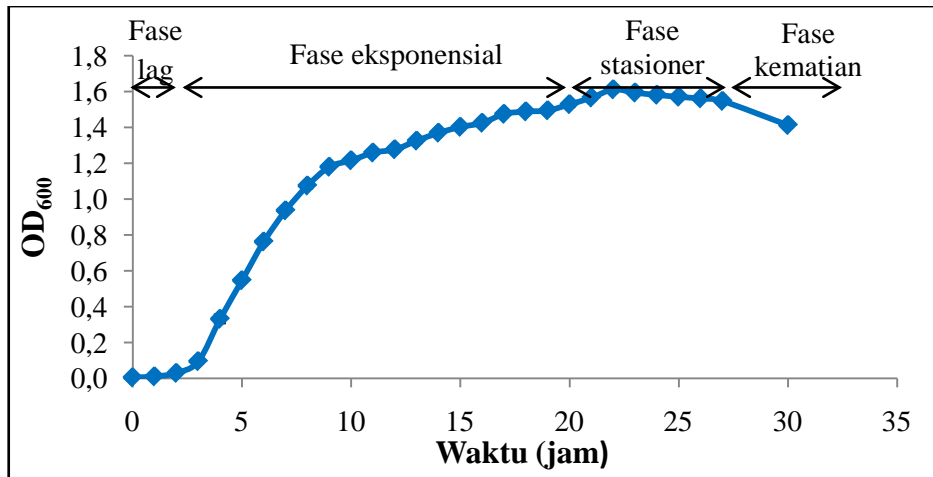
Untuk mengetahui populasi pertumbuhan bakteri, 1 koloni bakteri diambil dan diinokulasi ke dalam media steril *nutrient broth* (NB) dan di inkubasi di atas *incubator shaker* pada suhu 37°C yang merupakan kondisi pertumbuhan optimal bagi bakteri. Bakteri akan memanfaatkan komponen nutrisi dalam media sehingga ukuran sel menjadi lebih besar dan massa seluler meningkat. Jumlah pertumbuhan bakteri dapat dipelajari dengan memplot pertumbuhan sel (absorbansi) versus waktu inkubasi atau log dari jumlah terhadap waktu. Kurva yang diperoleh adalah kurva sigmoid dan dikenal sebagai kurva pertumbuhan standar. Peningkatan massa sel organisme diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Spektrofotometer mengukur kekeruhan atau kepadatan optik yang merupakan ukuran dari jumlah cahaya yang diserap oleh suspensi bakteri. Tingkat kekeruhan dalam kultur secara langsung berhubungan dengan jumlah bakteri, baik sel hidup atau mati. Meningkatnya kekeruhan medium menunjukkan peningkatan massa sel bakteri. Metode ini didasarkan pada terjadinya peningkatan *optical density* (OD) dalam kultur bakteri yang disebabkan oleh meningkatnya jumlah atau semakin besarnya ukuran bakteri dalam kultur cair. Jika cahaya mengenai sel, maka sebagian cahaya dihamburkan dan sebagian cahaya diteruskan. Jumlah cahaya yang dihamburkan atau diserap (absorbansi) berbanding lurus dengan jumlah sel bakteri atau jumlah cahaya yang diteruskan berbanding terbalik dengan jumlah sel bakteri. Jadi semakin banyak jumlah sel bakteri, semakin sedikit cahaya yang diteruskan, maka nilai absorbansi meningkat.

Absorbansi kultur cair *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* diukur setiap 1 jam sekali menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai panjang gelombang yang digunakan tergantung pada warna kultur, 420 nm digunakan untuk kultur tak berwarna, 540 nm digunakan untuk kultur berwarna kuning terang, dan 600-625 digunakan untuk kultur berwarna kuning-coklat.

4.3.1. Kurva pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*

Berdasarkan perbandingan absorbansi pada OD dengan panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) dan perhitungan dengan metode CFU maka dapat diketahui konsentrasi *P. aeruginosa* dimana 1 ml $\approx 1,5 \times 10^9$ CFU. Dari kurva

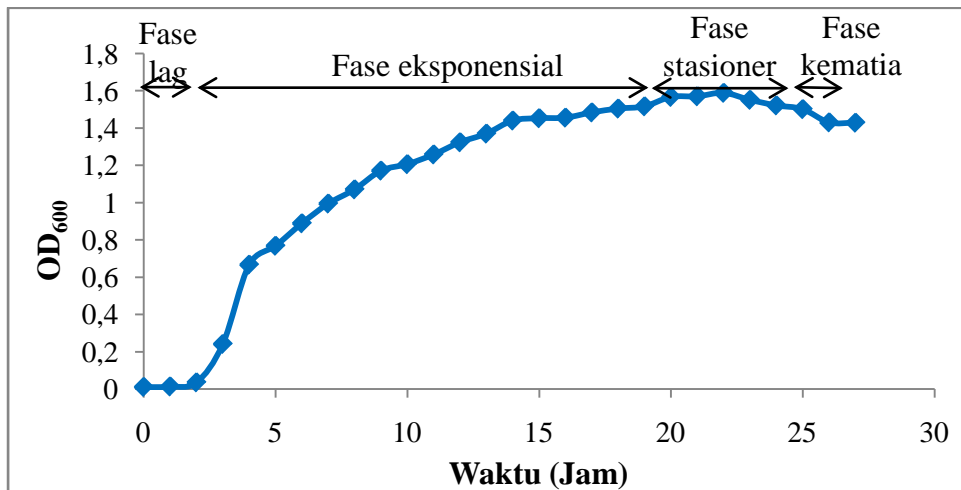
pertumbuhan (Gambar 4.3.) diketahui *P. aeruginosa* mengalami 4 fase yaitu fase lag (0-3 jam inkubasi), fase eksponensial (3-20 jam inkubasi), fase stasioner (20-26 jam inkubasi), dan memasuki fase kematian pada jam ke-26 inkubasi. Diketahui juga waktu pemanenan *P. aeruginosa* untuk digunakan pada proses selanjutnya dapat dilakukan ketika peralihan antara fase eksponensial dengan fase stasioner yaitu sekitar 21 jam inkubasi.



Gambar 4.3. Kurva Pertumbuhan *P. aeruginosa*

4.3.2. Kurva Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

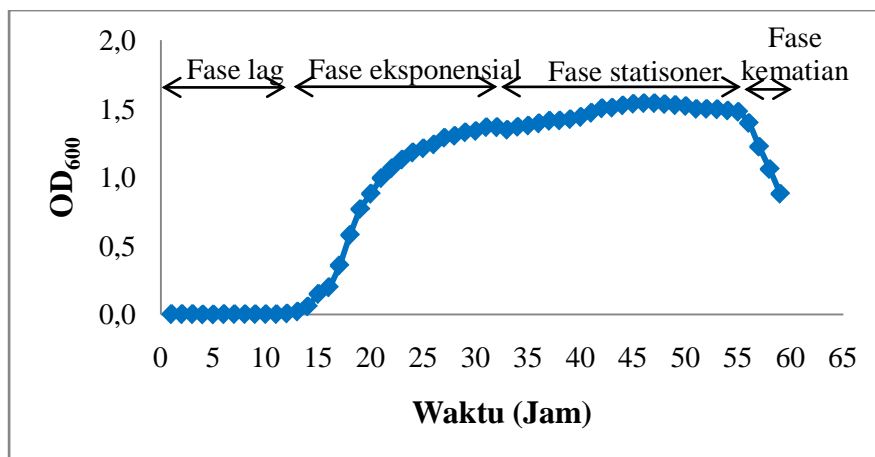
Berdasarkan perbandingan absorbansi pada OD dengan panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) dan perhitungan dengan metode CFU maka dapat diketahui konsentrasi *B. subtilis* dimana 1 ml $\approx 0.67 \times 10^9$ CFU. Dari kurva pertumbuhan (Gambar 4.4.) diketahui *B. subtilis* mengalami 4 fase yaitu fase lag (0-3 jam inkubasi), fase eksponensial (3-19 jam inkubasi), fase stasioner (19-23 jam inkubasi), dan memasuki fase kematian pada jam ke-24 inkubasi. Diketahui juga waktu pemanenan *B. subtilis* untuk digunakan pada proses selanjutnya dapat dilakukan ketika peralihan antara fase eksponensial dengan fase stasioner yaitu sekitar 20 jam inkubasi.



Gambar 4.4. Kurva pertumbuhan *B. subtilis*

4.3.3. Kurva Pertumbuhan *Ralstonia pickettii*

Berdasarkan perbandingan absorbansi pada OD dengan panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) dan perhitungan dengan metode CPU maka dapat diketahui konsentrasi *R. pickettii* dimana 1 ml $\approx 1,44 \times 10^{13}$ CFU.



Gambar 4.5. Kurva pertumbuhan *R. pickettii*

Dari kurva pertumbuhan (Gambar 4.5.) diketahui *R. pickettii* mengalami 4 fase yaitu fase lag (0-14 jam inkubasi), fase eksponensial (14-29 jam inkubasi), fase stasioner (29-54 jam inkubasi), dan memasuki fase kematian yang dimulai pada jam ke-54 inkubasi. Diketahui juga waktu pemanenan *R. pickettii* untuk digunakan pada proses selanjutnya dapat dilakukan ketika peralihan antara fase eksponensial dengan fase stasioner yaitu sekitar 30 jam inkubasi.

4.4. Persiapan Kultur Cair Bakteri

Koloni bakteri yang telah terbentuk dari hasil regenerasi diambil sekitar satu koloni dan diinokulasi ke dalam media cair steril *nutrient broth* (NB). Kultur bakteri di pre-inkubasi dalam inkubator dengan *rotary shaker* pada suhu 37°C. Lama waktu inkubasi yang digunakan mengacu pada kurva pertumbuhan bakteri. Dari kurva pertumbuhan diketahui bahwa *P. aeruginosa* mulai memasuki fase peralihan antara eksponensial dan stasioner (*late exponential*) pada waktu 21 jam, *B. subtilis* pada waktu 20 jam, dan *R. pickettii* pada 30 jam inkubasi. Pada fase ini terjadi keseimbangan antara laju bakteri yang melakukan pembelahan sel dan laju bakteri yang mengalami kematian sehingga jumlah keseluruhan bakteri dalam kultur relatif tetap. Bakteri akan berhenti membelah diri, dan hanya menyisakan metabolit aktif (Prescott dkk., 2005). Pada fase ini. *P. aeruginosa* dan *R. pickettii* secara optimal memproduksi enzim pendegradasi DDT serta biosurfaktan berupa rhamnolipid dan *B. subtilis* menghasilkan surfaktan yang berperan dalam proses degradasi senyawa-senyawa polutan seperti DDT, PCB, PAHs (Golovleva dan Skryabin, 1980; Vipulanandan dan Ren, 2000; Robinson dkk., 1996). Pertumbuhan organisme aerobik dibatasi oleh ketersediaan O₂. Oksigen tidak mudah larut didalam media dan mengalami penurunan dengan cepat, sehingga hanya kultur bagian permukaan yang akan mendapatkan konsentrasi O₂ yang cukup untuk pertumbuhan, sedangkan sel-sel di bawah permukaan tidak akan mendapatkan oksigen yang cukup. Oleh karena itu, proses pengocokan menggunakan *rotary shaker* selama inkubasi bertujuan untuk meningkatkan kadar oksigen terlarut dalam media karena *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, dan *R. pickettii* termasuk jenis bakteri aerob fakultatif. Selain itu, pengocokan juga berfungsi untuk memastikan bahwa bakteri tersebar merata dalam media pertumbuhan sehingga jumlah bakteri relatif sama per satuan volume.

4.5. Kurva Standar DDT

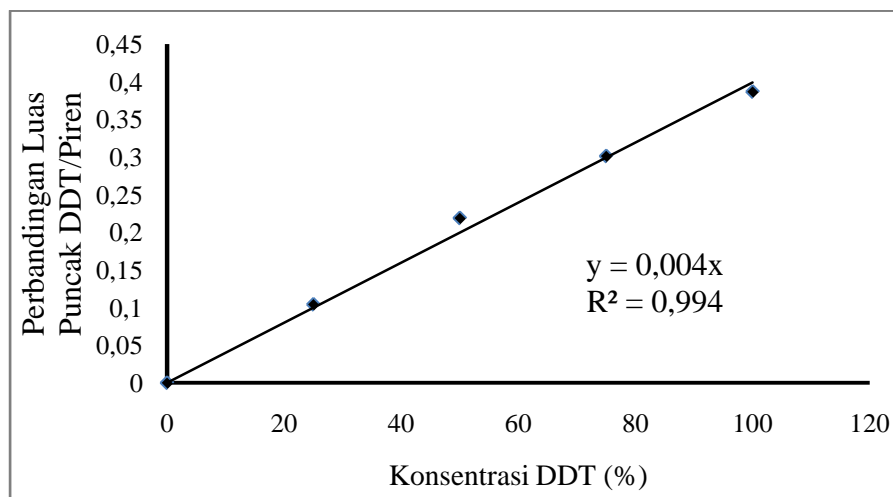
Kurva standar DDT merupakan kurva hasil plot antara nilai perbandingan luas area puncak DDT/pirena dengan konsentrasi larutan standar DDT. Pembuatan kurva dilakukan dengan mengukur perbandingan luas puncak DDT/pirena dengan variasi konsentrasi DDT 25, 50, 75 dan 100% (100% = 0,25

μmol DDT yang berasal dari DDT 5 mM) menggunakan HPLC dengan fasa gerak metanol 80%.

Tabel 4.1. Data kurva standar DDT

Konsentrasi (%)	Luas Puncak DDT	Luas Puncak Pirena	Perbandingan Luas Puncak DDT/pirena
0	0	0	0
25	8212,8	78914,9	0,104
50	17472,9	79824,9	0,219
75	23601,6	78336,4	0,301
100	29219,5	75547,9	0,387

Dari Tabel 4.1. dibuat kurva standar sebagaimana Gambar 4.6. Dari kurva standar diperoleh persamaan regresi linear $y = 0,004x$ dimana, x adalah konsentrasi DDT, y adalah perbandingan luas puncak DDT/pirena. Dari persamaan ini konsentrasi DDT dalam sampel dapat ditentukan. Untuk menentukan hubungan linier kesempurnaan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/pirena dari kurva standar dapat diketahui melalui nilai koefisien korelasi (r). Koefisien korelasi adalah suatu ukuran hubungan antara dua variabel yang memiliki nilai antara -1 dan 1.



Gambar 4.6. Kurva larutan standar DDT

Jika variabel-variabel keduanya memiliki hubungan linier sempurna, koefisien korelasi itu akan bernilai 1 atau -1. Tanda positif/negatif bergantung

pada apakah variabel-variabel itu memiliki hubungan secara positif atau negatif. Koefisien korelasi bernilai 0 jika tidak ada hubungan yang linier antara variabel. nilai koefisien korelasi (r^2) yang diperoleh sebesar 0,994, sehingga dapat disimpulkan bahwa variabel konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/pirena dari kurva standar memiliki hubungan linear sangat kuat.

Uji signifikansi koefisien korelasi (uji t) dengan tingkat signifikansi $\alpha \leq 0,025$ (selang kepercayaan 97,5 %) dilakukan untuk menentukan apakah terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/pirena dan menentukan kelayakan persamaan regresi kurva standar yang digunakan dalam menentukan konsentrasi DDT dalam sampel. H_0 menyatakan tidak ada hubungan secara signifikan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/pirena. H_1 menyatakan ada hubungan secara signifikan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/pirena. Dari hasil perhitungan (lampiran 2) diketahui $t_{hitung} > t_{tabel}$, maka H_0 ditolak dan H_1 diterima, artinya terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi larutan standar DDT dengan perbandingan luas puncak DDT/pirena dan persamaan regresi linear kurva standar layak digunakan untuk menentukan konsentrasi DDT dalam sampel.

4.6. Proses dan Hasil Biodegradasi DDT

4.6.1. Biodegradasi DDT oleh *P. eryngii*

Kultur *P. eryngii* yang telah dipre-inkubasi diberi DDT sebanyak 0,25 μmol . DDT yang digunakan dalam penelitian ini dilarutkan dalam DMSO. DDT merupakan senyawa organik yang bersifat non-polar, hidrofobik sehingga sangat tidak larut dalam air. Tetapi DDT memiliki kelarutan yang baik dalam sebagian besar pelarut organik. Oleh karena itu, DDT dilarutkan terlebih dahulu ke dalam DMSO, hal ini karena DMSO merupakan pelarut polar aprotik yang memiliki polaritas menengah sehingga dapat melarutkan DDT, memiliki kelarutan yang baik dalam air, serta tidak beracun (Novak, 2002).

Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Oksigen ditambahkan ke dalam kultur karena *P. eryngii* merupakan salah jenis jamur

aerobik, penambahan oksigen bertujuan sebagai suplai oksigen yang digunakan *P. eryngii* selama proses degradasi berlangsung. Untuk mencegah terjadinya kontaminasi oleh mikroorganisme lain, labu erlenmeyer ditutup sumbat kaca dan diselotip menggunakan parafilm.

Untuk mengetahui jumlah DDT yang terdegradasi dalam kultur selama masa inkubasi, dapat dilakukan dengan mendapatkan ulang (*recovery*) DDT yang tersisa di dalam kultur. Setelah 7 hari masa inkubasi, masing-masing kultur ditambah 20 ml metanol, penambahan metanol bertujuan untuk mematikan kultur dan menghentikan proses degradasi. Untuk menentukan konsentrasi DDT yang tersisa, 50 μ L pirena 5 mM ditambahkan dalam kultur. Pirena berfungsi sebagai standar internal (senyawa referen), yang digunakan untuk menentukan nilai perbandingan antara luas area puncak DDT dalam sampel terhadap luas area puncak dari senyawa standar internal. Syarat pemilihan standar internal yang digunakan adalah senyawa yang sangat mirip, tapi tidak identik dengan sampel sehingga tidak bereaksi dengan sampel, memiliki jumlah yang sama dengan sampel, terbaca pada sinyal yang sama dengan sampel, memiliki waktu retensi dan derivitization serupa, stabil dan tidak mengganggu komponen sampel. Standar internal yang digunakan juga dapat berupa senyawa dengan gugus fungsional, titik didih dan aktivitas yang sama dengan sampel. Standar internal juga berfungsi sebagai faktor koreksi sehingga mendapat hasil analisa yang akurat, terutama untuk sampel dengan proses preparasi yang panjang (Skoog, 2004). Berdasarkan syarat-syarat tersebut, maka pada penelitian ini menggunakan pirena sebagai standar internal.

Kultur yang telah dimatikan, dipindahkan kedalam tabung valcon, labu erlenmeyer dicuci dengan 5 mL aseton. Penggunaan aseton sebagai pencuci karena aseton merupakan pelarut polar aprotik dan memiliki polaritas menengah, dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar yang masih tertinggal di dalam labu erlenmeyer. Kultur dihomogenasi agar DDT yang terperangkap dalam miselium jamur dapat terbebas. Untuk memisahkan biomassa jamur dan supernatant, kultur yang telah homogen dipisahkan dengan sentrifugasi selama 7 menit dengan kecepatan 3000 RPM. Biomassa yang mengendap kemudian disaring. Supernatant dievaporasi pada suhu 64°C untuk menghilangkan methanol

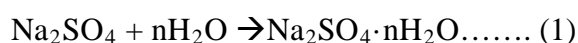
dan aseton, sehingga yang tersisa dalam supernatant adalah media dan DDT. Supernatant di pindahkan dalam corong pisah dan diekstraksi.

Proses *recovery* DDT dan produk metabolit dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair adalah suatu cara memisahkan dua komponen dari suatu campuran yang homogen berdasarkan nilai kelarutannya. Ekstraksi ini dilakukan dengan penambahan pelarut yang dapat melarutkan solut tetapi tidak larut dalam pelarut (diluen). Dengan penambahan pelarut maka sebagian solute akan berpindah dari fasa diluen ke fasa solvent (ekstrak) dan sebagian lagi tetap tinggal di fasa diluen (rafinat). Dalam penelitian ini digunakan pasangan pelarut air dan *n-heksana*, berdasarkan 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 diluent, memiliki perbedaan titik didih yang tinggi dengan solute, pelarut pertama mampu melarutkan diluent dan pelarut kedua mampu melarutkan solute. Pemakaian air sebagai pelarut pertama, karena air termasuk pelarut polar yang memiliki polaritas tinggi (konstanta dielektrik = 80), densitas 1 g/mL, tidak larut dalam sebagian besar pelarut organik, mampu melarutkan diluen dan kelarutan DDT dalam air sangat kecil yaitu 1 µg/L. Pemakaian *n-heksana* sebagai pelarut kedua, karena *n-heksana* termasuk pelarut non-polar yang memiliki polaritas rendah (konstanta dielektrik = 2), densitas 0,655 g/mL dan mampu melarutkan DDT sebesar 97 g/100 mL.

Untuk mengetahui secara kuantitatif, bagaimana suatu zat terlarut terdistribusi di antara fasa air dan fasa organik, maka dilakukan perhitungan koefisien distribusi. Koefisien distribusi merupakan rasio konsentrasi solut di dalam dua pelarut berbeda setelah sistem mencapai kesetimbangan. Pada saat sistem mencapai kesetimbangan, molekul akan terdistribusi di dalam pelarut yang lebih soluble terhadap molekul tersebut. Materi anorganik dan air akan berada pada lapisan air dan molekul organik akan tetap berada pada lapisan organik. Apabila nilai koefisien distribusi di atas 1, maka diluen lebih banyak terekstrak pada fasa organik, apabila nilai konstanta di bawah 1, maka diluen lebih banyak terekstrak pada fasa air. Dari hasil perhitungan diketahui, koefisien distribusi

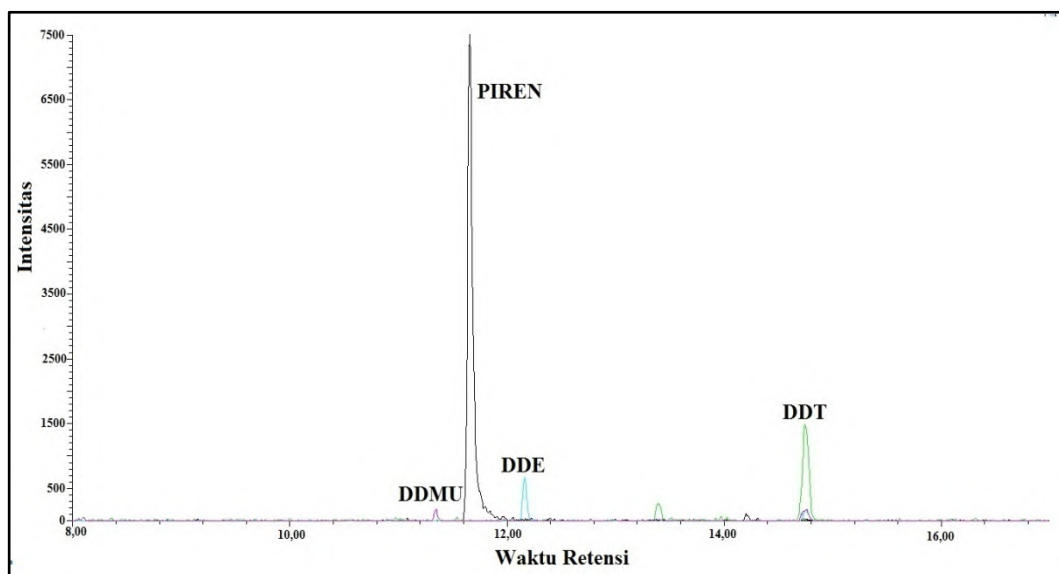
(KD) DDT diantara n-heksana dan aquades sebesar 38,8 x106, sehingga dapat disimpulkan bahwa pasangan pelarut air dan n-heksana sangat efektif dan efisien digunakan untuk ekstraksi DDT.

Sampel hasil evaporasi dipindahkan ke dalam corong pisah untuk diekstraksi dengan penambahan aquades dan n-heksana, sampel dikocok selama 10 menit menggunakan autoshacker. Tujuan dari pengocokan ialah agar terjadi kontak antara kedua pelarut, sehingga solut dapat terekstrak ke dalam fasa organik. Setelah pengocokan, akan terbentuk dua lapisan, lapisan atas merupakan fasa organik, lapisan bawah merupakan fasa air. Fasa air dipisahkan dari fasa organik. Fasa air yang telah dipisahkan dengan fasa organik dimasukkan kembali ke dalam corong pisah, lalu dilakukan ekstraksi kembali, hal ini bertujuan untuk memaksimalkan hasil *recovery* dan memastikan bahwa tidak ada DDT dan produk metabolit tertinggal dalam fasa air. Fasa organik yang diperoleh dari proses ekstraksi pertama dan kedua selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi Na₂SO₄ anhidrat yang berfungsi sebagai agen pengering (*drying agent*), senyawa ini berbentuk kristal putih, mampu menangkap senyawa polar seperti air maupun alkohol, mampu mengabsorb air, memiliki nilai hidrasi (jumlah molekul air yang mampu diabsorb per molekul natrium sulfat) 7-10. Ketika natrium sulfat mengabsorb air, maka akan berubah menjadi bentuk hidrat. Berikut persamaan reaksinya:



Jumlah penggunaan Na₂SO₄ tergantung pada kadar air yang terkandung dalam larutan fase organik. Untuk mengetahui apakah air telah terabsorpsi oleh natrium sulfat, senyawa ini akan bergerak bebas di dasar erlenmeyer ataupun melayang. Ketika natrium sulfat yang ditambahkan tidak bergerak atau menggumpal di dasar erlenmeyer, ini merupakan indikasi bahwa larutan masih mengandung air, sehingga natrium sulfat perlu ditambahkan kembali. Sampel disaring dan dievaporasi hingga volume tersisa sekitar 2 mL. Tujuan dari evaporasi adalah untuk menguapkan *n-heksana* serta meningkatkan konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel. 1 mL sampel dianalisis menggunakan GC/MS. Sisa sampel dievaporasi kembali hingga kering, setelah itu ditambah 1 mL metanol untuk dianalisis menggunakan HPLC.

Hasil analisis menggunakan HPLC diperoleh data, nilai *recovery* DDT yang diperoleh dalam sampel kontrol dan kultur *P. eryngii* secara berurutan sebesar 96,70% dan 53,49%. maka degradasi DDT oleh *P. eryngii* sebesar 43,21%. Hasil ini mengindikasikan bahwa *P. eryngii* memiliki kemampuan untuk mendegradasi DDT.

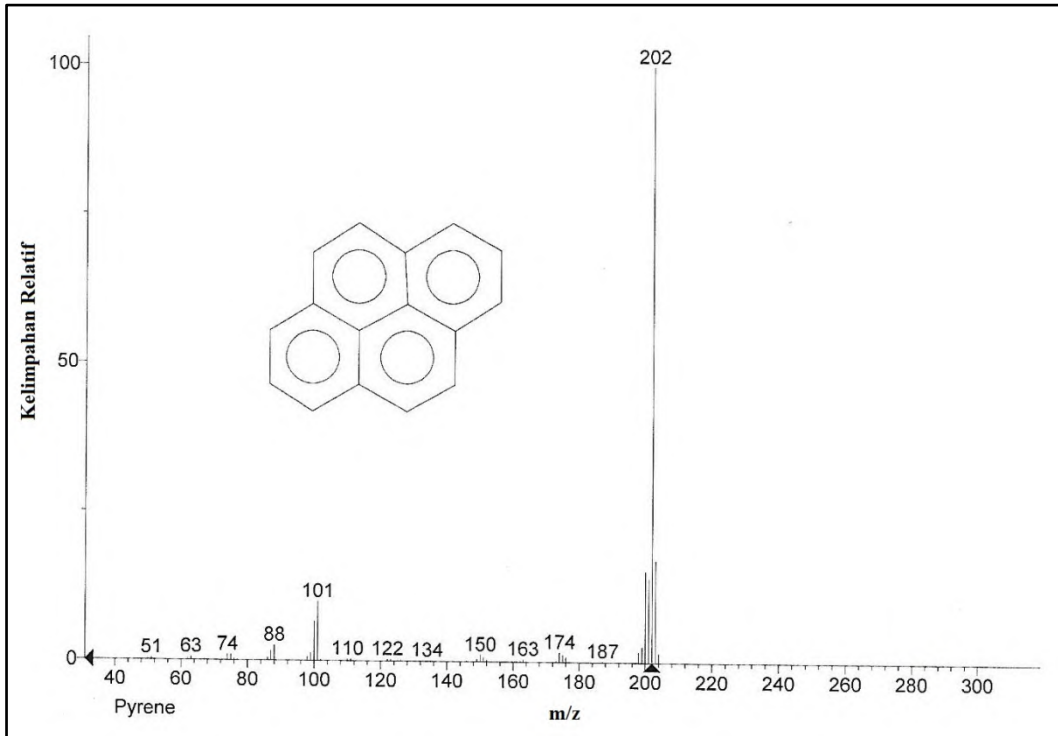


Gambar 4.7. Kromatogram GC produk metabolit yang dihasilkan dari degradasi DDT oleh *P. eryngii*

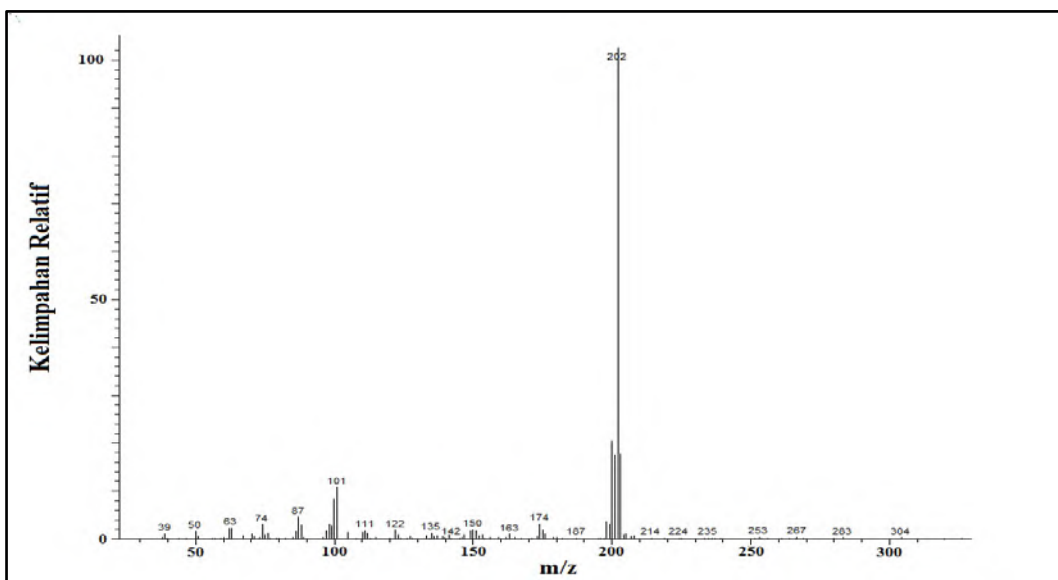
Hasil analisis kromatogram GC sampel *P. eryngii* (Gambar 4.7.) menunjukkan beberapa puncak senyawa yaitu Pirena pada waktu retensi 11,657 menit, 1,1-dikloro-2,2-bis (4-klorofenil) etilena (DDE) 12,169 menit, 1-kloro-2,2-bis (4-klorofenil) etilena (DDMU) 11,327 menit dan DDT 14,751 menit. Identifikasi senyawa pirena, DDT, serta beberapa produk metabolit berdasarkan pada spektra MS pada waktu retensi masing-masing senyawa yang memiliki pola pemecahan molekul dengan tingkat kemiripan yang tinggi dengan pola pemecahan molekul pirena, DDT, DDE dan DDMU yang ada dalam database. Untuk memastikan keakuratan identifikasi senyawa tersebut berupa pirena, DDT, DDE dan DDMU, maka dilakukan pencocokkan M^+ dan m/z yang diperoleh pada spektra MS masing-masing senyawa dalam sampel dengan spektra MS database.

Berdasarkan spektra MS pirena dalam database (Gambar 4.8.), pirena memiliki nilai M^+ sebesar 202 dan nilai m/z 202 (base peak), 174, 150, dan 101.

Spektra MS pirena hasil analisis sampel degradasi DDT oleh *P. eryngii* memiliki beberapa puncak dengan nilai M^+ dan m/z yang sama dengan spektra MS pirena dalam database (Gambar 4.9.).

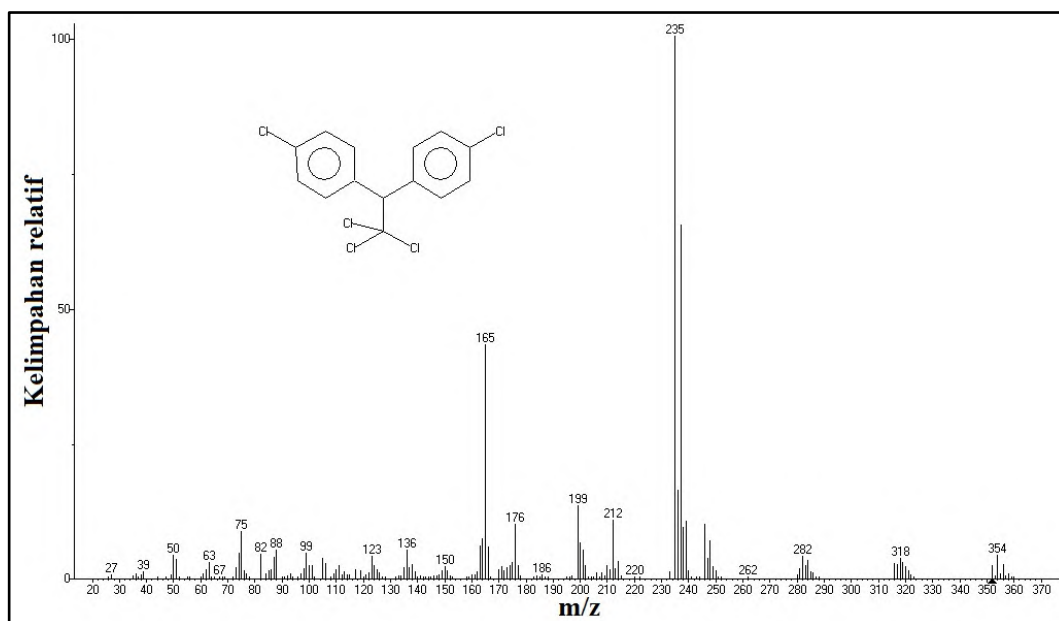


Gambar 4.8. Spektra MS pirena dalam database

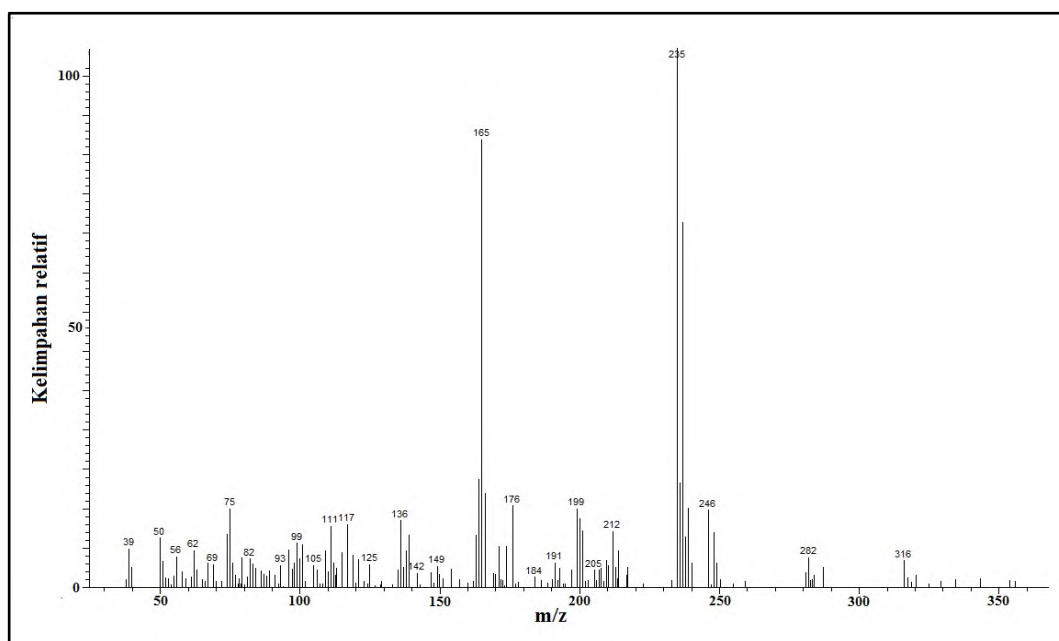


Gambar 4.9. Spektra MS pirena hasil analisis sampel *P. eryngii*

Berdasarkan spektra MS DDT dalam database (Gambar 4.10.), DDT memiliki nilai M^+ sebesar 352 dan nilai m/z 352, 317, 281, 235 (*base peak*), 199 dan 165. Spektra MS DDT hasil analisis sampel degradasi DDT oleh *P. eryngii* memiliki beberapa puncak dengan nilai M^+ dan m/z yang sama dengan spektra MS DDT dalam database (Gambar 4.11.).

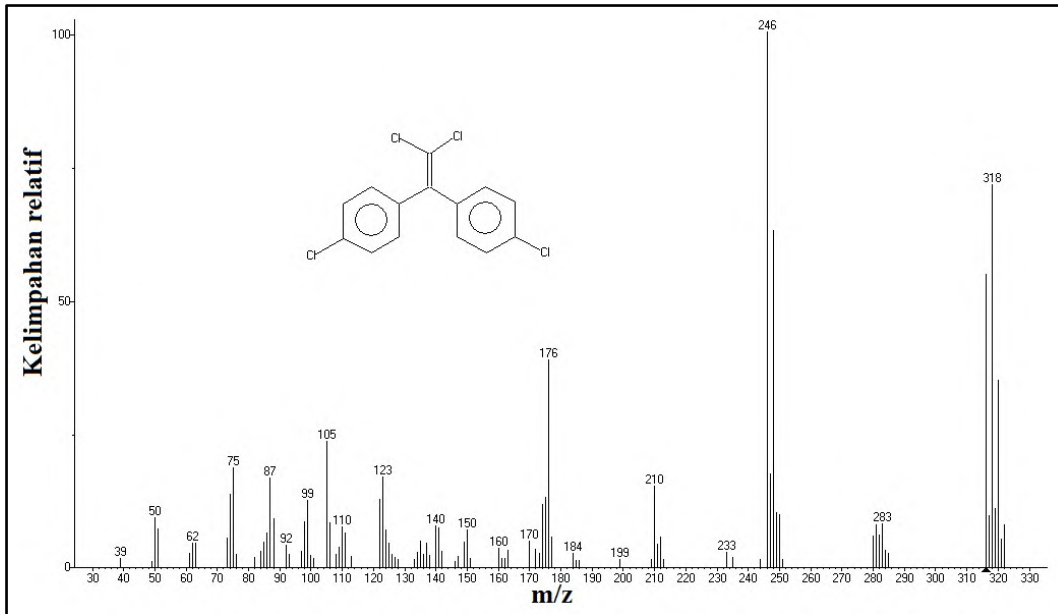


Gambar 4.10. Spektra MS DDT dalam database

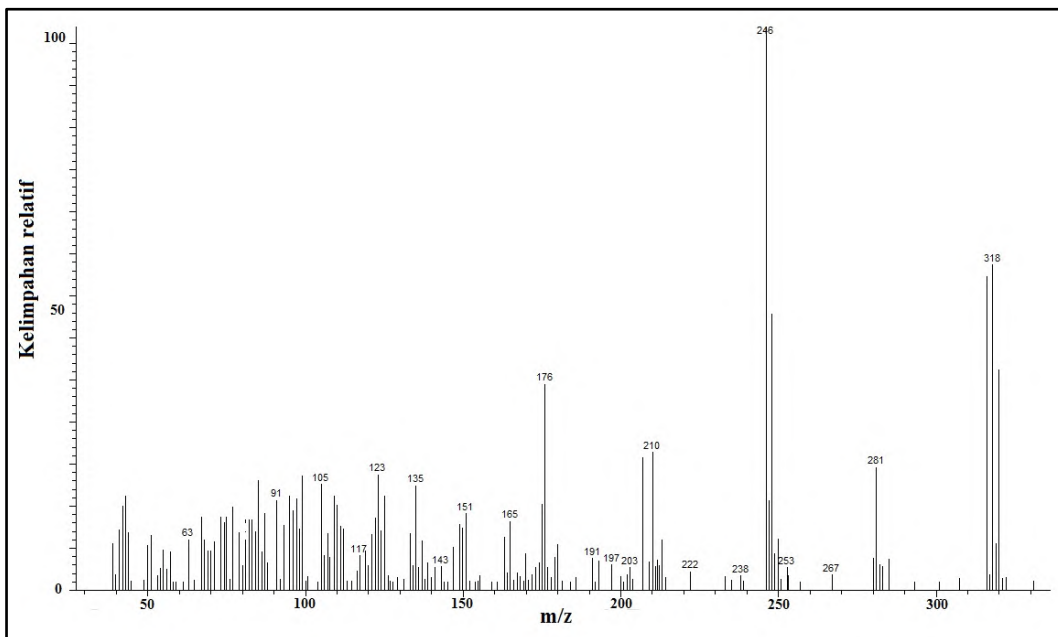


Gambar 4.11. Spektra MS DDT hasil analisis sampel *P. eryngii*

DDE dan DDMU merupakan senyawa turunan dari DDT. Berdasarkan spektra MS DDE dalam database (Gambar 4.12.), DDE memiliki nilai M^+ sebesar 318 dan m/z 318, 246 (base peak), 210, dan 176. Spektra MS DDE hasil analisis sampel degradasi DDT oleh *P. eryngii* memiliki beberapa puncak dengan nilai M^+ dan m/z yang sama dengan spektra MS DDE dalam database (Gambar 4.13.).

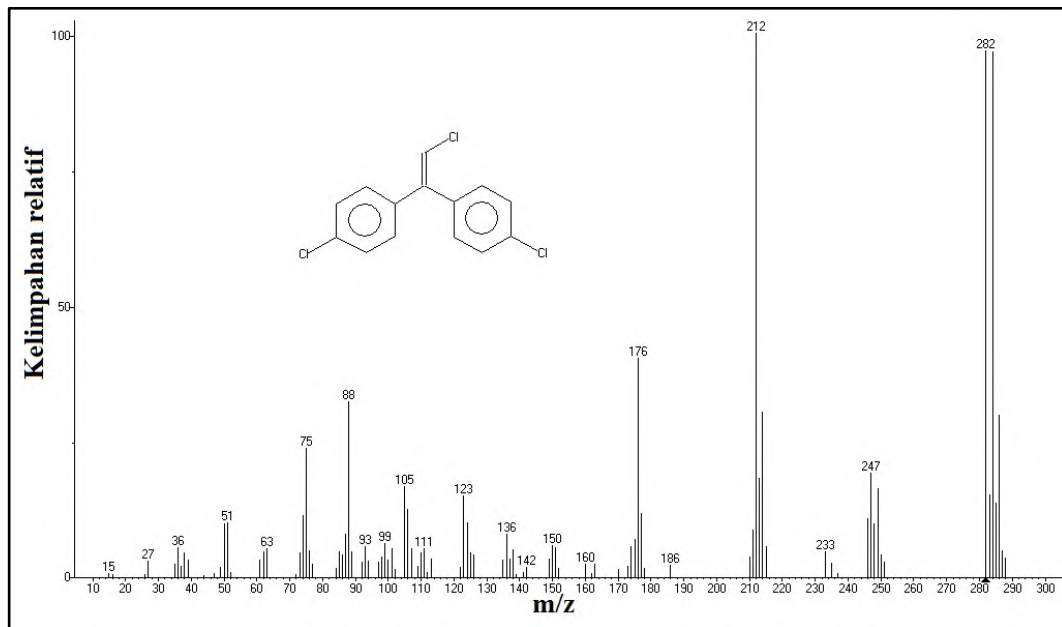


Gambar 4.12. Spektra MS DDE dalam database

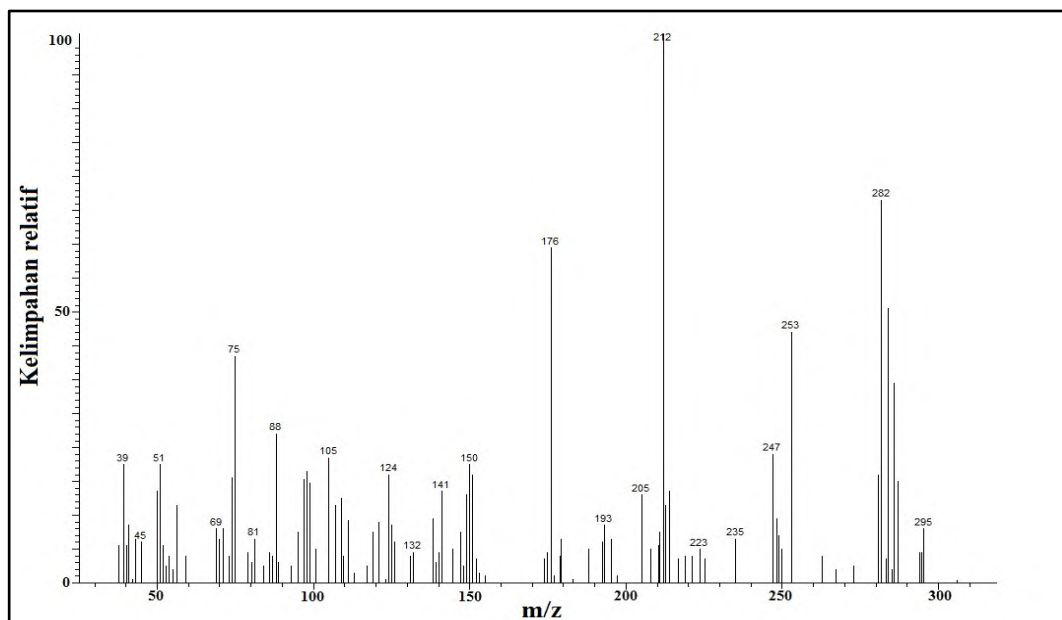


Gambar 4.13. Spektra MS DDE hasil analisis sampel *P. eryngii*

DDMU memiliki nilai M^+ sebesar 282 dan m/z 283, 247, 212 (base peak), dan 176 (Gambar 4.14). Spektra MS DDMU hasil analisis sampel degradasi DDT oleh *P. eryngii* memiliki beberapa puncak dengan nilai M^+ dan m/z yang sama dengan spektra MS DDMU dalam database (Gambar 4.15.).



Gambar 4.14. Spektra MS DDMU dalam database



Gambar 4.15. Spektra MS DDMU hasil analisis sampel *P. eryngii*

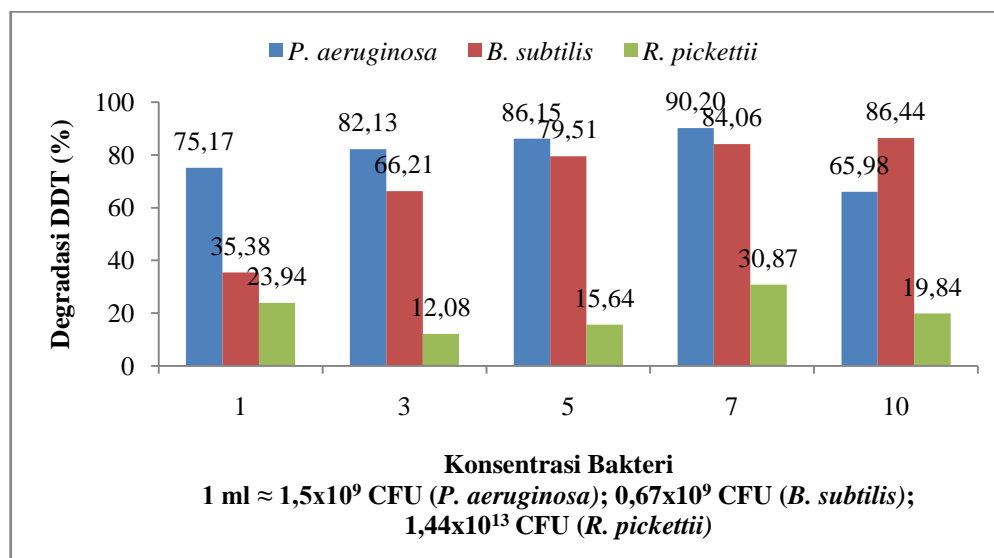
Hasil spektra produk metabolit mengindikasikan bahwa *P. eryngii* dapat merubah DDT menjadi DDE dan DDMU.

Secara umum jamur pelapuk putih memiliki sistem enzim pendegradasi lignin yang terdiri atas lignin peroksidase, mangan peroksidase, dan lakase. Berdasarkan pola enzim ligninolitik, jamur pelapuk putih dibagi dalam dua kelompok, yaitu jamur yang hanya memproduksi enzim lakase dan MnP dan jamur yang memproduksi enzim lakase, MnP dan LiP. Kemampuan kedua kelompok jamur ini dalam menghasilkan enzim, berhubungan dengan kemampuan untuk mendegradasi lignin (Hatakka, 1994). *P. eryngii* termasuk dalam kelompok jamur pelapuk putih yang hanya memproduksi enzim lakase dan MnP (Pelaez dkk., 1995). Hasil penelitian Camarero dkk. (1996), Guillen dkk. (1992) dan Martinez dkk. (1992) melaporkan bahwa *P. eryngii* memproduksi lakase dan MnP dalam kultur cair tetapi enzim MnP hanya dihasilkan jika menggunakan media nitrogen terbatas. Hal ini sejalan dengan penelitian Hou dkk. (2004) dan Zhao (2010) yang melaporkan bahwa jamur pelapuk putih yang diinokulasi dalam kultur cair dengan atau tanpa pengocokan, hanya aktivitas enzim lakase yang terdeteksi di dalam supernatant. Oleh karena itu dapat diketahui bahwa proses degradasi DDT oleh *P. eryngii* menjadi beberapa produk metabolit sebagai hasil dari aktivitas enzim lakase yang mengkatalisis oksidasi DDT bersamaan dengan reduksi molekul oksigen menjadi air meskipun mekanisme katalisis dan jalur degradasi DDT oleh lakase belum diketahui secara jelas (Zhao, 2010).

4.6.2. Biodegradasi DDT oleh bakteri (*P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *R. pickettii*)

Kultur bakteri yang telah dipre-inkubasi, diambil sebanyak 1, 3, 5, 7 dan 10 mL ($1 \text{ ml} \approx 1,5 \times 10^9 \text{ CFU}$ (*P. aeruginosa*); $0,67 \times 10^9 \text{ CFU}$ (*B. subtilis*); $1,44 \times 10^{13} \text{ CFU}$ (*R. pickettii*)) dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 10 ml media PDB. Bakteri di inkubasi dalam media PDB pada suhu 30°C, bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri ini mampu tumbuh dan mendegradasi DDT pada kondisi optimum *P. eryngii*. Pemberian oksigen ke dalam kultur bertujuan sebagai suplai oksigen selama proses degradasi karena bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri aerobik. Sebelum diinkubasi, kultur diputar perlahan selama beberapa detik yang bertujuan untuk persebaran bakteri dan DDT

dalam kultur merata, sehingga proses degradasi dapat berjalan optimal. Setelah 7 hari masa inkubasi, selanjutnya dilakukan proses ekstraksi DDT dalam kultur untuk mengetahui hasil degradasi DDT, sebagaimana pembahasan subbab 4.6.1.



Gambar 4.16. Jumlah DDT terdegradasi oleh bakteri dengan variasi konsentrasi yang diinkubasi selama 7 hari

Gambar 4.16. menunjukkan hasil degradasi DDT oleh bakteri. Jumlah DDT yang terdegradasi oleh bakteri *P. aeruginosa* dengan konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 10 ml secara berurutan adalah sebesar 75,17%, 82,13%, 86,15%, 90,20%, dan 65,98%. Jumlah DDT yang terdegradasi oleh bakteri *B. subtilis* dengan konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 10 ml secara berurutan adalah sebesar 35,38%, 66,21%, 79,51%, 84,06% dan 86,44%. Jumlah DDT yang terdegradasi oleh bakteri *R. pickettii* dengan konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 10 ml secara berurutan adalah sebesar 8,62%, 12,08%, 15,64%, 30,87% dan 19,84%. Dari grafik tersebut dapat dilihat, bahwa bakteri *P. aeruginosa* mampu mendegradasi DDT sekitar 90% pada konsentrasi 7 ml dan *B. subtilis* sekitar 86% pada konsentrasi 10 ml. Hal ini mengindikasikan bahwa *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* memiliki kemampuan untuk mendegradasi DDT. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Bidlan (2003), dimana *P. aeruginosa* mampu mendegradasi DDT sebesar 4-45% selama 72 jam dalam medium dengan sumber nitrogen berbeda. Hasil penelitian Langlois dkk. (1970) menyatakan bahwa *B. subtilis* mampu mendegradasi DDT dengan produk metabolit DDD. *R. pickettii* mampu mendegradasi DDT sekitar 30% pada

konsentrasi 7 ml. Dari Gambar 4.16. dapat dilihat bahwa ada korelasi antara konsentrasi bakteri dengan jumlah DDT yang terdegradasi. Semakin besar konsentrasi (jumlah populasi) bakteri yang digunakan, semakin besar pula DDT yang terdegradasi. Akan tetapi, pada konsentrasi bakteri 10 ml menunjukkan bahwa degradasi DDT tidak linier terhadap konsentrasi, karena nilai degradasi mengalami penurunan. Konsentrasi optimum untuk bakteri dalam mendegradasi DDT adalah 7 ml, konsentrasi bakteri yang berlebih akan menurunkan jumlah DDT yang terdegradasi. Konsentrasi bakteri yang terlalu besar meningkatkan persaingan akan kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri, sehingga bakteri memproduksi senyawa toksik sebagai prioritas untuk bertahan hidup daripada mendegradasi DDT.

Tabel 4.2. Produk metabolit yang dihasilkan pada proses degradasi DDT oleh bakteri

Produk Metabolit	Kultur Bakteri*		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>R. pickettii</i>
DDD	√	√	-
DDE	-	-	√
DDMU	√	√	-

*Konsentrasi bakteri 7 ml

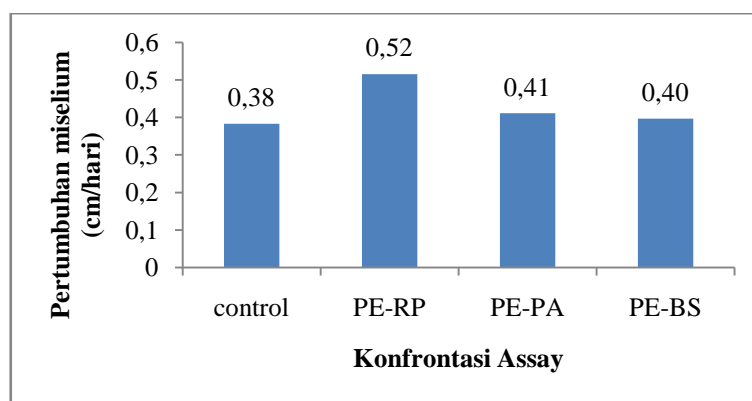
Hasil analisis kromatogram GC sampel bakteri diketahui bahwa produk metabolit yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* yaitu DDD dan DDMU (Lampiran 5), dengan waktu retensi secara berurutan adalah 13,398 menit dan 11,339 menit. Hasil tersebut menunjukkan bahwa reaksi yang terjadi adalah reaksi reduktif deklorinasi. Hasil ini sesuai dengan Lal dan Saxena (1982) yang menyatakan bahwa *Bacillus* sp dan *Pseudomonas* sp menghasilkan DDD sebagai produk metabolit. *R. pickettii* menghasilkan DDE (waktu retensi 12,163 menit) sebagai produk metabolit. Patil dkk. (1979) menyatakan bahwa produk metabolit yang dihasilkan pada kondisi anaerob adalah DDD, dan pada kondisi aerob adalah DDE (Lal dan Saxena, 1982).

4.7. Konfrontasi Assay Jamur dan Bakteri

Konfrontasi *assay* jamur-bakteri bertujuan untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara *P. eryngii* dengan bakteri *P. aeruginosa* (PE-RP), *B. subtilis*

(PE-BS) dan *R. pickettii* (PE-RP). Mille-Lindlom (2005) menjelaskan suatu mikroorganisme berbeda dapat menghasilkan interaksi positif (sinergis), negatif (inhibisi) dan tidak ada interaksi. Dari *assay* ini dapat diketahui bakteri yang memiliki potensi menguntungkan bagi pertumbuhan *P. eryngii* dan meningkatkan kemampuan *P. eryngii* dalam mendegradasi DDT.

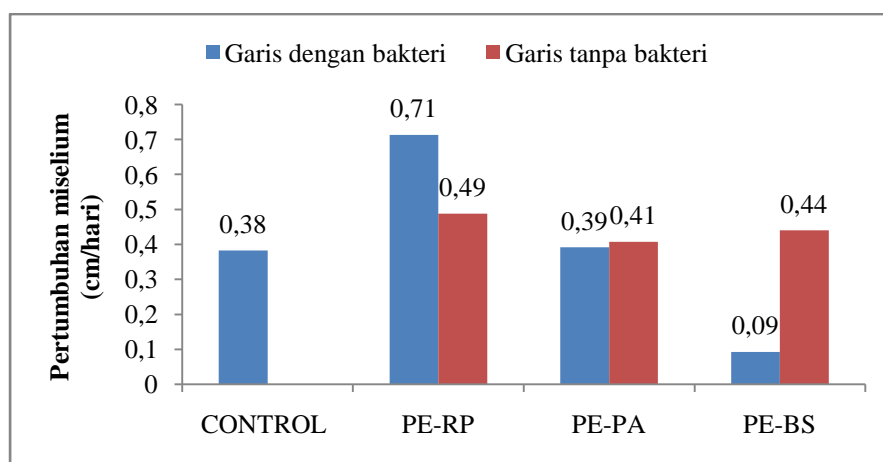
P. eryngii dengan diameter 0,5 cm, diinokulasikan pada bagian tengah cawan petri yang telah berisi media steril PDA, kemudian pada jarak $\pm 2,5$ cm, ditambahkan 10 μ L bakteri. Kultur diinkubasi pada suhu 30°C. Pengukuran pertumbuhan miselium *P. eryngii* dimulai pada hari keempat inkubasi (Kamei dkk., 2011) hingga miselium menutupi seluruh permukaan cawan petri.



Gambar 4.17. Pertumbuhan miselium *P. eryngii* dalam konfrontasi *assay*

Gambar 4.17 menunjukkan perbandingan pertumbuhan miselium *P. eryngii* dengan dan tanpa bakteri. Pertumbuhan *P. eryngii* yang dikonfrontasikan dengan *R. pickettii* lebih cepat (0,52 cm/hari) bila dibandingkan dengan kontrol (0,38 cm/hari) dan *P. eryngii* yang dikonfrontasikan dengan *P. aeruginosa* (0,41 cm/hari) dan *B. subtilis* (0,40 cm/hari). Gambar 4.18 menunjukkan perbandingan pertumbuhan miselium *P. eryngii* pada garis yang terdapat bakteri dan garis yang tidak terdapat bakteri. *P. eryngii* yang dikonfrontasikan langsung pada garis dengan bakteri *R. pickettii*, menunjukkan pertumbuhan dua kali lebih cepat (0,71 cm/hari) dibandingkan kontrol (0,38 cm/hari) dan miselium tanpa konfrontasi dengan bakteri (0,49 cm/hari). Hasil ini mengindikasikan bahwa *R. pickettii* dapat mempercepat pertumbuhan *P. eryngii* dan memberikan efek positif

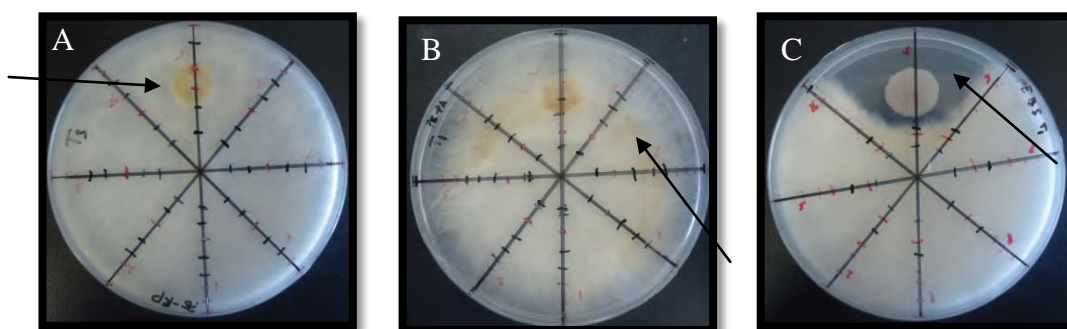
serta terdapat hubungan sinergitas antara *P. eryngii* dan *R. pickettii*. Hubungan sinergitas ini diharapkan dapat meningkatkan kemampuan *P. eryngii* dalam mendegradasi DDT. *P. aeruginosa* tidak memberikan efek yang signifikan terhadap pertumbuhan *P. eryngii* baik pada garis dengan konfrontasi bakteri (0,39 cm/hari) ataupun pada garis tanpa konfrontasi bakteri (0,41 cm/hari). Hasil ini menunjukkan, bahwa tidak terdapat hubungan sinergitas antara *P. eryngii* dan *P. aeruginosa*. Pada konfrontasi assay *P. eryngii* dengan *B. subtilis*. Miselium *P. eryngii* hanya tumbuh 0,09 cm/hari pada garis dengan konfrontasi terhadap bakteri, hal ini berarti bahwa ketika *P. eryngii* dikonfrontasikan dengan *B. subtilis*, miselium *P. eryngii* tidak mengalami pertumbuhan. Miselium *P. eryngii* tumbuh 0,44 cm/hari pada garis yang tidak terdapat konfrontasi dengan bakteri. Hal ini mengindikasikan bahwa *B. subtilis* memberikan efek inhibisi terhadap pertumbuhan *P. eryngii*, sehingga tidak terbentuk hubungan sinergis antara *P. eryngii* dengan *B. subtilis*.



Gambar 4.18. Perbandingan pertumbuhan miselium *P. eryngii* dalam konfrontasi assay.

Gambar 4.19. menunjukkan pertumbuhan miselium *P. eryngii* setelah 12 hari masa inkubasi. Gambar 4.19.A. merupakan konfrontasi assay *P. eryngii* dengan *R. pickettii*, pada gambar terlihat bahwa morfologi *P. eryngii* berubah, yang ditandai dengan adanya perubahan warna miselium pada area bakteri. Warna miselium cenderung kekuningan. Gambar 4.19.B merupakan konfrontasi assay *P. eryngii* dengan *P. aeruginosa*, pada gambar terlihat bahwa *P. aeruginosa*

menggunakan miselium *P. eryngii* untuk tumbuh secara melingkar yang ditunjukkan dengan bentuk lingkaran berwarna kuning. Gambar 4.19.C. merupakan konfrontasi assay *P. eryngii* dengan *B. subtilis*, pada gambar dapat terlihat bahwa *B. subtilis* menghambat pertumbuhan *P. eryngii*. Miselium *P. eryngii* tidak tumbuh pada area yang berdekatan dengan *B. subtilis*. Dari hasil ini, maka *R. pickettii* dapat digunakan untuk proses selanjutnya.



Gambar 4.19. Miselium *P. eryngii* dalam konfrontasi assay setelah 12 hari masa inkubasi; (A) PE-RP, (B) (PE-PA), (C) PE-BS.

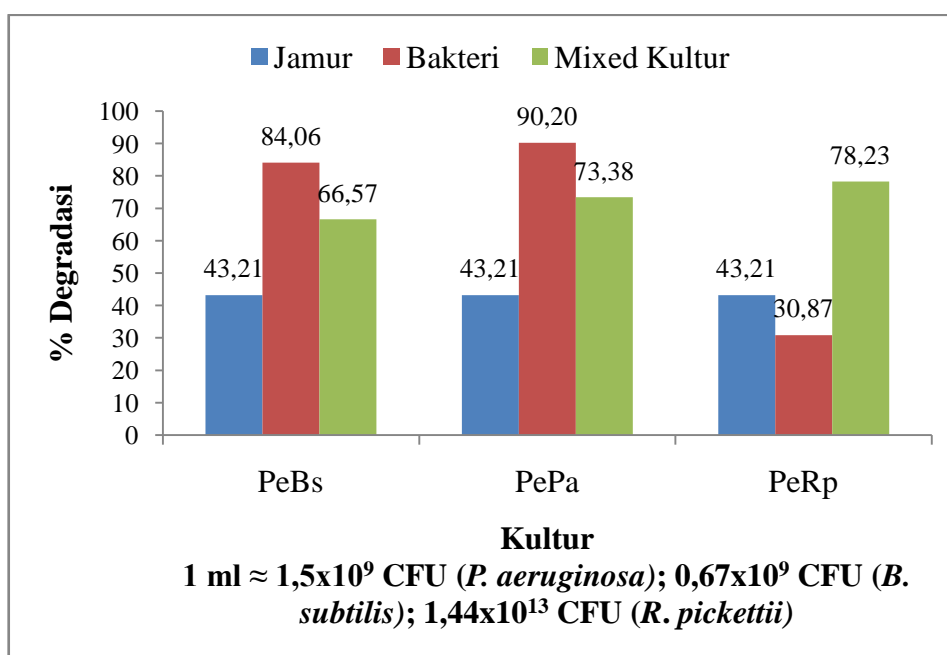
Interaksi antara jamur dan bakteri di dalam tanah telah dilaporkan sebelumnya. Beberapa metabolit sekunder bakteri dapat meningkatkan pertumbuhan jamur, tetapi dalam beberapa kondisi kehadiran bakteri akan memperlambat bahkan menghambat pertumbuhan jamur (Clausen., 1996; Wargo dan Hogan., 2006). Pertumbuhan jamur ektomikoriza dan pembentukan mikoriza dipromosikan oleh beberapa bakteri *mycorrhizosphere* (*mycorrhiza helper bacteria* [MHB]), beberapa diantaranya *Bacillus* (Bending dkk., 2002), *Burkholderia* (Poole dkk., 2001), *Pseudomonas* (Deveau dkk., 2010), *Streptomyces* (Schrey dkk., 2005), dan *Ralstonia* (Kataoka dan Futai, 2009). MHB mampu meningkatkan pertumbuhan jamur presimbiotik, dan memiliki peran dalam proses pembentukan akar jamur dalam tanah (Frey dkk., 2007). Akan tetapi mekanisme pertumbuhan miselium dan pembentuk mikoriza oleh MHB belum diketahui. Deveau dkk. (2010) melaporkan beberapa faktor pertumbuhan yang di hasilkan oleh MHB, *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 menghasilkan tiamin pada konsentrasi tertentu yang mampu meningkatkan pertumbuhan ektomikoriza dari jenis *Laccaria bicolor* S238N. Riedlinger dkk. (2006)

melaporkan bahwa *Streptomyces* strain AcH505 menghasilkan auxofuran yang meningkatkan pertumbuhan *Amanita muscaria*. Belum ada penelitian yang melaporkan bahwa *R. pickettii* mampu meningkatkan pertumbuhan *P. eryngii*. sehingga, diperlukan penelitian lebih mendalam mengenai mekanisme dari *R. pickettii* yang memberikan efek positif terhadap pertumbuhan *P. eryngii*.

4.8. Screening Bakteri

Screening bakteri bertujuan untuk memilih hasil degradasi DDT yang terbaik, dengan melihat hubungan sinergitas antara jamur dan bakteri (sub bab 4.7.), produk metabolit yang dihasilkan, serta nilai degradasi DDT menjadi pertimbangan untuk memilih *mixed* kultur yang terbaik. Gambar 4.20 menunjukkan hasil degradasi DDT pada kultur jamur, bakteri dan mix kultur menggunakan bakteri konsentrasi 7 mL, kultur di inkubasi selama 7 hari. Penggunaan konsentrasi bakteri 7 mL, didasarkan pada hasil degradasi DDT oleh bakteri pada variasi konsentrasi (sub bab 4.6.2), dimana konsentrasi optimal adalah 7 mL.

Pada konsentrasi 7 ml, tidak terjadi hubungan sinergitas antara jamur *P. eryngii* dengan bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*, karena nilai degradasi DDT menurun. Degradasi DDT oleh bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* lebih besar dari degradasi DDT oleh *mixed* kultur. Akan tetapi terdapat hubungan sinergitas antara *P. eryngii* dengan *R. pickettii*. *R. pickettii* mampu meningkatkan kemampuan *P. eryngii* dalam mendegradasi DDT yaitu sebesar 78%, dimana sebelum penambahan *R. pickettii*, nilai degradasi DDT oleh *P. eryngii* sebesar 43%. Berdasarkan data produk metabolit, maka mix kultur *P. eryngii* dan *R. pickettii* dapat digunakan untuk proses selanjutnya. Produk metabolit yang dihasilkan dari kultur PeRp adalah DDD, DDE dan DDMU. Tabel 4.4. menunjukkan jenis produk metabolit yang dihasilkan dari kultur jamur, kultur bakteri dan *mixed* kultur.



Gambar 4.20. Degradasi DDT oleh mixed kultur konsentrasi 7 ml (*P. eryngii* dan *B. subtilis* (PeBs); *P. eryngii* dan *P. aeruginosa* (PePa); *P. eryngii* dan *R. pickettii* (PeRp)).

Tabel 4.3. Produk metabolit yang dihasilkan pada proses degradasi DDT oleh *P. eryngii*, Bakteri dan mix kultur

Metabolit	Kultur						
	Jamur <i>P. eryngii</i>	Bakteri*			Jamur + Bakteri*		
		Bs	Pa	Rp	PeBs	PePa	PeRp
DDD	-	√	√	-	√	√	√
DDE	√	-	-	√	√	√	√
DDMU	√	√	√	-	-	-	√

Keterangan:

Bs : *Bacillus subtilis*

Pa : *Pseudomonas aeruginosa*

Rp : *Rasltonia pickettii*

*Konsentrasi bakteri 7 ml

4.9. Pengaruh Penambahan *R. pickettii* Terhadap Biodegradasi DDT oleh *P. eryngii* (Variasi Konsentrasi Bakteri)

Kultur *P. eryngii* yang telah dipre-inkubasi ditambah bakteri *R. pickettii* masing-masing dengan konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 10 ml. Tujuan dari penambahan

R. pickettii ialah untuk mengoptimalkan jumlah DDT yang terdegradasi. Dari hasil screening bakteri dan konfrontasi assay *P. eryngii* dengan *R. pickettii*, menunjukkan bahwa terdapat hubungan sinergitas antara *P. eryngii* dan *R. pickettii*.

Setelah penambahan *R. pickettii* dan DDT, kultur diputar perlahan selama beberapa detik untuk meratakan persebaran *R. pickettii* dan DDT dalam kultur sehingga proses degradasi dapat berjalan optimal. Sebagai kontrol, kultur dinonaktifkan menggunakan *autoclave* sebelum ditambah DDT. Fungsi dari kontrol ialah untuk memastikan bahwa penurunan DDT dalam kultur karena proses degradasi oleh *P. eryngii* dan *R. pickettii*, bukan karena hal lain diluar proses degradasi. Setelah masa inkubasi selesai, selanjutnya dilakukan proses ekstraksi DDT dalam kultur untuk mengetahui hasil degradasinya sebagaimana pada pembahasan subbab 4.6.1.

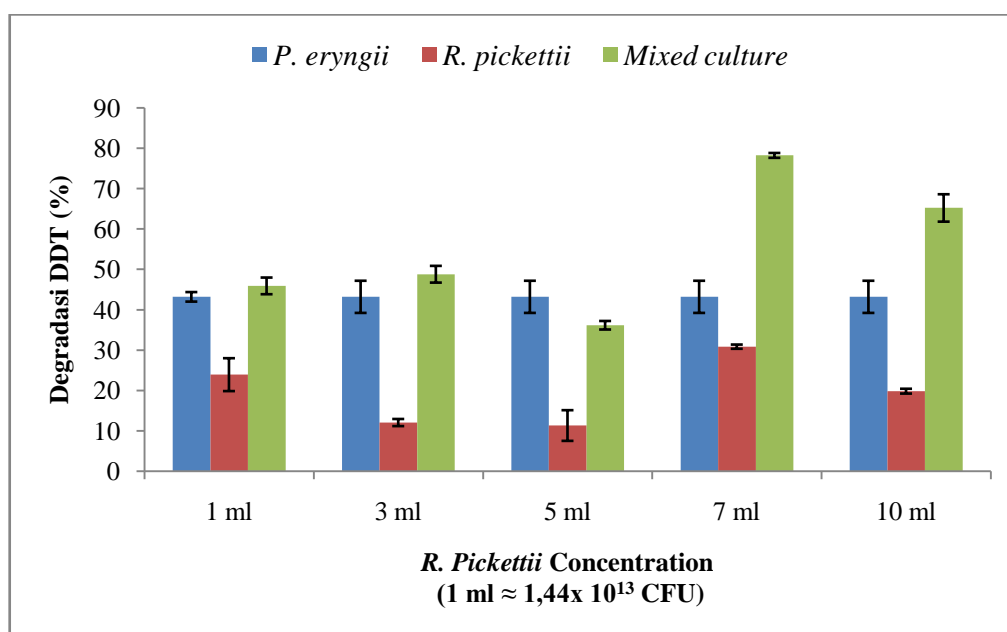
Hasil analisis biodegradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan penambahan *R. pickettii* ditunjukkan pada Tabel 4.5. Dari data analisis menggunakan HPLC diperoleh jumlah degradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan penambahan *R. pickettii* pada konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 10 ml masing-masing sebesar 45,92 %, 48,80 %, 36,17 %, 78,23 dan 65,22 %.

Tabel 4.4. Jumlah degradasi DDT oleh *P.eryngii* dengan penambahan bakteri *R. pickettii* dengan waktu inkubasi selama 7 hari

Konsentrasi Bakteri (ml)	Recovery (%)	Degradasi DDT (%)	Standard Deviasi
Kontrol	96,70	0,00	0,38
1	50,78	45,92	2,06
3	47,89	48,80	2,07
5	60,52	36,17	1,06
7	18,46	78,23	0,60
10	31,47	65,22	3,39

Gambar 4.21. menunjukkan korelasi laju degradasi DDT oleh jamur *P. eryngii* dan bakteri *R. pickettii*, dibandingkan dengan kultur campuran. Penambahan *R. pickettii* ke dalam kultur *P. eryngii* memiliki pengaruh pada

degradasi DDT. Jumlah degradasi DDT oleh *P. eryngii* meningkat jika dibandingkan dengan jumlah degradasi DDT oleh *P. eryngii* tanpa penambahan *R. pickettii*. Penambahan konsentrasi 7 ml dari *R. pickettii* dalam kultur *P. eryngii* mampu mendegradasi DDT sekitar 78,23%. Peningkatan jumlah degradasi ini terjadi karena adanya sinergitas antara *P. eryngii* dengan *R. pickettii*. Hal ini karena *R. pickettii* mampu menghasilkan biosurfaktan berupa rhamnolipid (Plaza dkk., 2007). 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, *P. eryngii* menjadi lebih mudah dalam mengakses senyawa DDT, sehingga degradasi DDT oleh *P. eryngii* semakin meningkat.

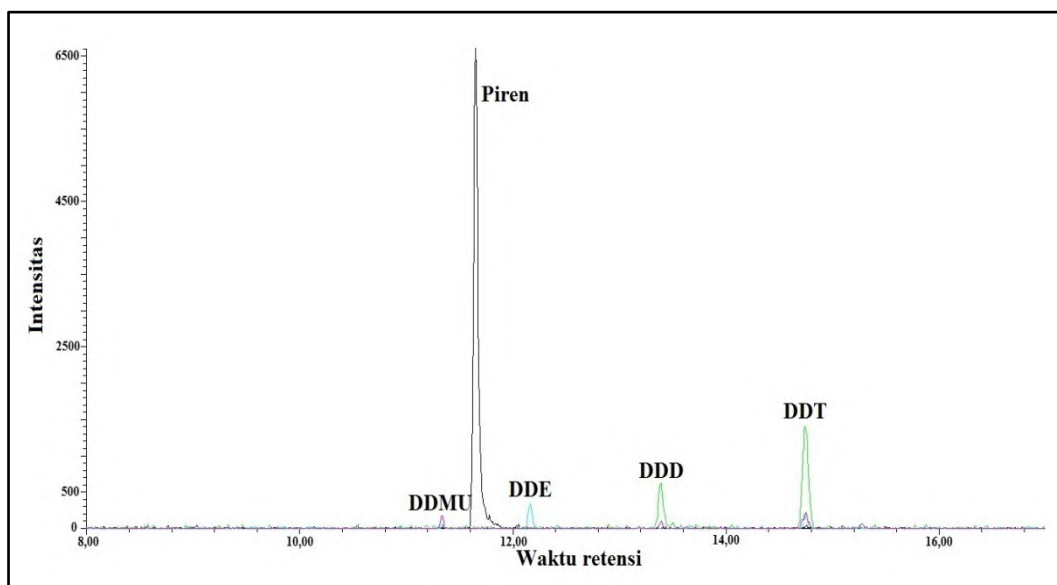


Gambar 4.21. Pengaruh penambahan *R. pickettii* terhadap biodegradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan variasi konsentrasi bakteri.

Selain penghasil biosurfaktan, *R. pickettii* diketahui mampu menghasilkan enzim Poly[(R)-3-hydroxyalkanoate]s (PHAs) (Hiraishi dkk., 2006). PHAs merupakan enzim yang diproduksi oleh banyak jenis bakteri, dan menunjukkan kemampuan untuk mendegradasi senyawa polutan di lingkungan, baik tanah

(Kasuya dkk., 1994 dan Mergaert dkk., 1993), lumpur aktif (Tanio dkk., 1982), air tawar (Mukai dkk., 1994) dan air laut (Mukai dkk., 1993).

Dari Gambar 4.21. juga dapat diketahui bahwa pada penambahan bakteri konsentrasi 1 dan 3 ml, DDT yang didegradasi oleh *P. eryngii* hanya sedikit mengalami kenaikan dibandingkan dengan kultur *P. eryngii* tanpa penambahan *R. pickettii*, hal ini kemungkinan karena masih rendahnya biosurfaktan yang diproduksi *R. pickettii* sehingga peningkatan jumlah DDT terlarut juga masih rendah. Ketika peningkatan jumlah DDT terlarut rendah, *P. eryngii* dan *R. pickettii* hanya sedikit menghasilkan enzim-enzim pendegradasi senyawa polutan. Pada konsentrasi 5 ml degradasi DDT oleh mixed kultur lebih rendah dibandingkan dengan *P. eryngii* tanpa penambahan *R. pickettii*, pada konsentrasi tersebut *R. pickettii* cenderung menghambat proses degradasi. Penambahan bakteri dengan konsentrasi bakteri 7 dan 10 mL, merupakan konsentrasi yang paling optimal dalam mendegradasi DDT karena kemampuan *P. eryngii* dalam mendegradasi DDT mengalami kenaikan yang signifikan, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan sinergitas antara *P. eryngii* dan *R. pickettii* dalam mendegradasi DDT.



Gambar 4.22. Kromatogram GC hasil analisa degradasi DDT oleh *P. eryngii* dan *R. pickettii* Konsentrasi 7 ml

Hasil analisis kromatogram GC sampel *mixed* kultur (Gambar 4.22.) diketahui bahwa kultur *P. eryngii* dengan penambahan *R. pickettii* pada konsentrasi 1, 3, 5, 7 ml dan 10 mL mampu mendegradasi DDT dan menghasilkan beberapa metabolit antara lain DDE (waktu retensi 12,157 menit), DDD (waktu retensi 13,386 menit), dan DDMU dengan waktu retensi 11,333 menit (pembahasan spektra MS, lihat subbab 4.6.1.).

4.10. Pengaruh Penambahan *R. pickettii* Terhadap Biodegradasi DDT oleh *P. eryngii* (Variasi Waktu Penambahan Bakteri)

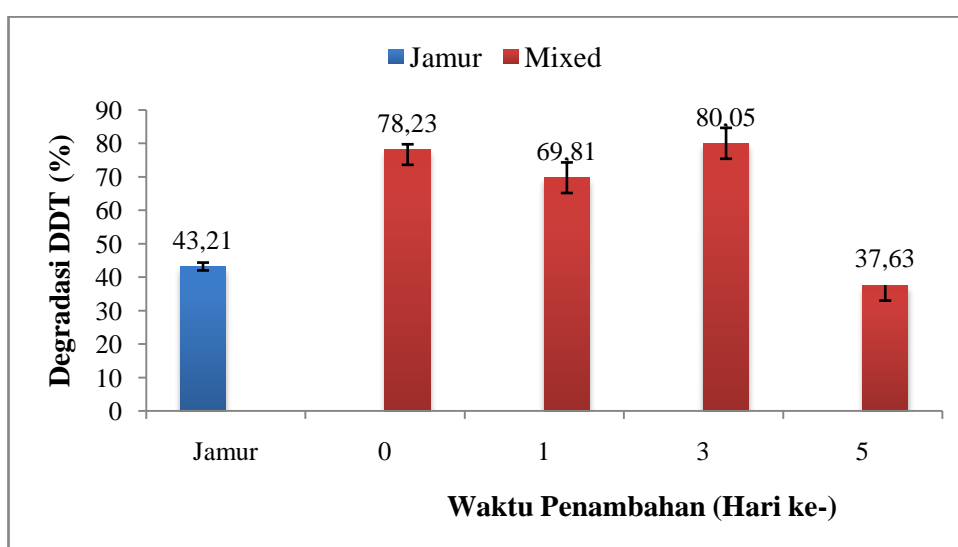
Kultur *P. eryngii* yang telah dipre-inkubasi ditambah bakteri *R. pickettii* masing-masing dengan konsentrasi 7 ml. Bakteri di tambahkan pada hari ke- 0, 1, 3, dan 5 masa inkubasi setelah kultur *P. eryngii* ditambahkan DDT, sehingga lama inkubasi masing-masing adalah 7, 6, 4, dan 2 hari. Tujuan dari penambahan *R. pickettii* dengan waktu berbeda untuk mengetahui apakah ada pengaruh terhadap degradasi DDT oleh *P. eryngii*.

Tabel 4.5. Jumlah degradasi DDT oleh *P.eryngii* dengan penambahan bakteri *R. pickettii* dengan waktu berbeda

Perlakuan	Recovery (%)	Degradasi DDT (%)	Standard Deviasi
Kontrol	96,70	0,00	0,38
Hari ke-0	18,46	78,23	0,60
Hari ke-1	26,89	69,81	1,53
Hari ke-3	16,55	80,05	4,53
Hari ke-5	59,07	37,63	4,62

Tabel 4.5. dan Gambar 4.23 menunjukkan hasil degradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan penambahan bakteri pada waktu berbeda. Jumlah degradasi pada hari ke-0, ke-1 dan ke-3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Terdapat sinergitas antara *P. eryngii* dan *R. pickettii* dimana hasil degradasi meningkat dibandingkan dengan *P. eryngii* tanpa penambahan *R. pickettii*. Degradasi DDT pada penambahan hari ke-5 lebih rendah, hal ini dapat dipengaruhi oleh waktu inkubasi *P. eryngii* dengan *R. pickettii* hanya 2 hari, fase stationer *R. pickettii* pada masa inkubasi 30 jam, artinya *R. pickettii* belum menghasilkan biosurfaktan yang

cukup, sehingga tingkat kelarutan DDT masih rendah menyebabkan DDT sulit terakses oleh *P. eryngii*. *R. Pickettii* juga belum menghasilkan metabolit sekunder yang dapat mempercepat pertumbuhan *P. eryngii*. Maka dapat disimpulkan bahwa waktu penambahan *R. pickettii* mempengaruhi degradasi DDT oleh *P. eryngii*, ditinjau dari jumlah DDT yang terdegradasi, maka penambahan *R. pickettii* pada hari ke-3 adalah waktu yang paling optimal. Ditinjau dari produk metabolit yang dihasilkan, maka waktu penambahan yang paling optimal untuk proses degradasi adalah pada hari ke-0.



Gambar 4.23. Pengaruh penambahan *R. pickettii* terhadap biodegradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan variasi waktu penambahan bakteri.

Hasil analisis kromatogram GC sampel *mixed* kultur diketahui bahwa kultur *P. eryngii* dengan penambahan *R. pickettii* pada hari ke-1, 3, dan 5 menghasilkan DDD sebagai produk metabolit. Pada hari ke-0 produk metabolit yang dihasilkan adalah DDE, DDD, dan DDMU (pembahasan spektra MS, lihat subbab 4.6.1.). Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa DDT menjadi DDE dan DDMU ditransformasi oleh *P. eryngii*.

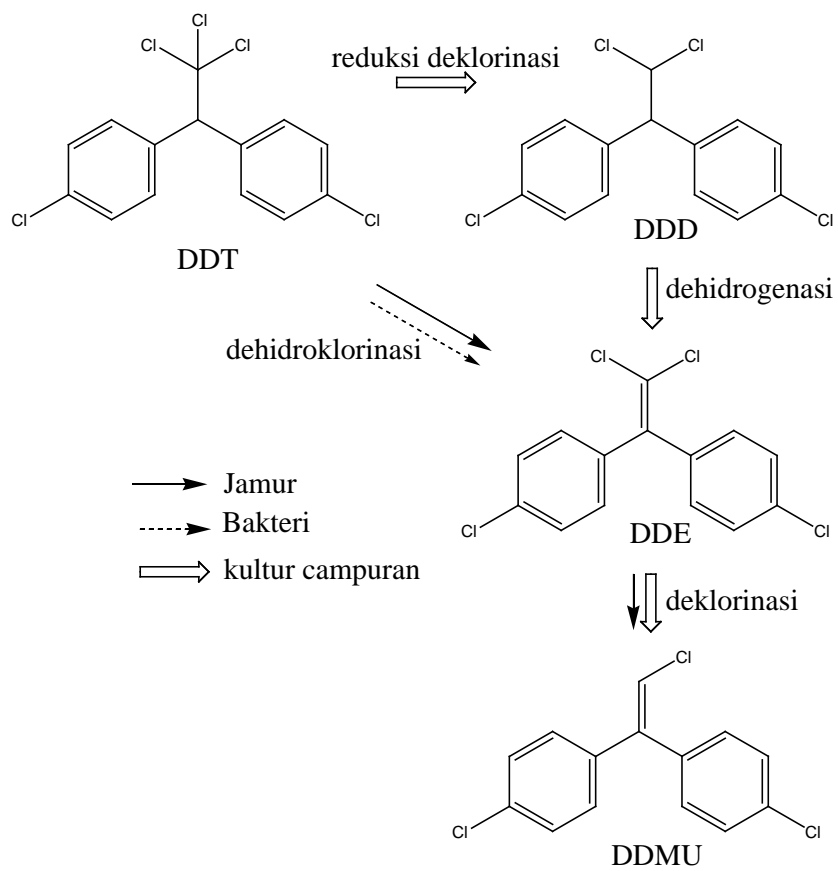
4.11. Jalur Degradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan Penambahan *R. pickettii* Konsentrasi 7 mL

Pada penelitian ini diperoleh beberapa produk metabolit dari hasil degradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan penambahan *R. pickettii*, yaitu DDD, DDE dan DDMU. Untuk mengetahui jalur degradasi DDT dan metabolit, maka kultur *P. eryngii* yang ditambahkan bakteri *R. pickettii* diinkubasi dengan penambahan 50 µl substrat DDD, DDE dan DDMU (Konsentrasi akhir 0,25 µl). Kultur diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. setelah diinkubasi kultur di ekstrak sebagaimana pada pembahasan sub bab 4.6.1.

Tabel 4.6. *Recovery* dan produk metabolit DDT oleh *P. eryngii* dengan penambahan *R. pickettii*

Perlakuan	Substrat	Perolehan Kembali Substrat dan Produk metabolit (%)			
		DDT	DDD	DDE	DDMU
PE-RP Konsentrasi 7 ml	DDT	18,46	17,75	4,83	1,48
	DDD	-	45,71	7,15	+
	DDE	-	-	21,33	+
	DDMU	-	-	-	0,33

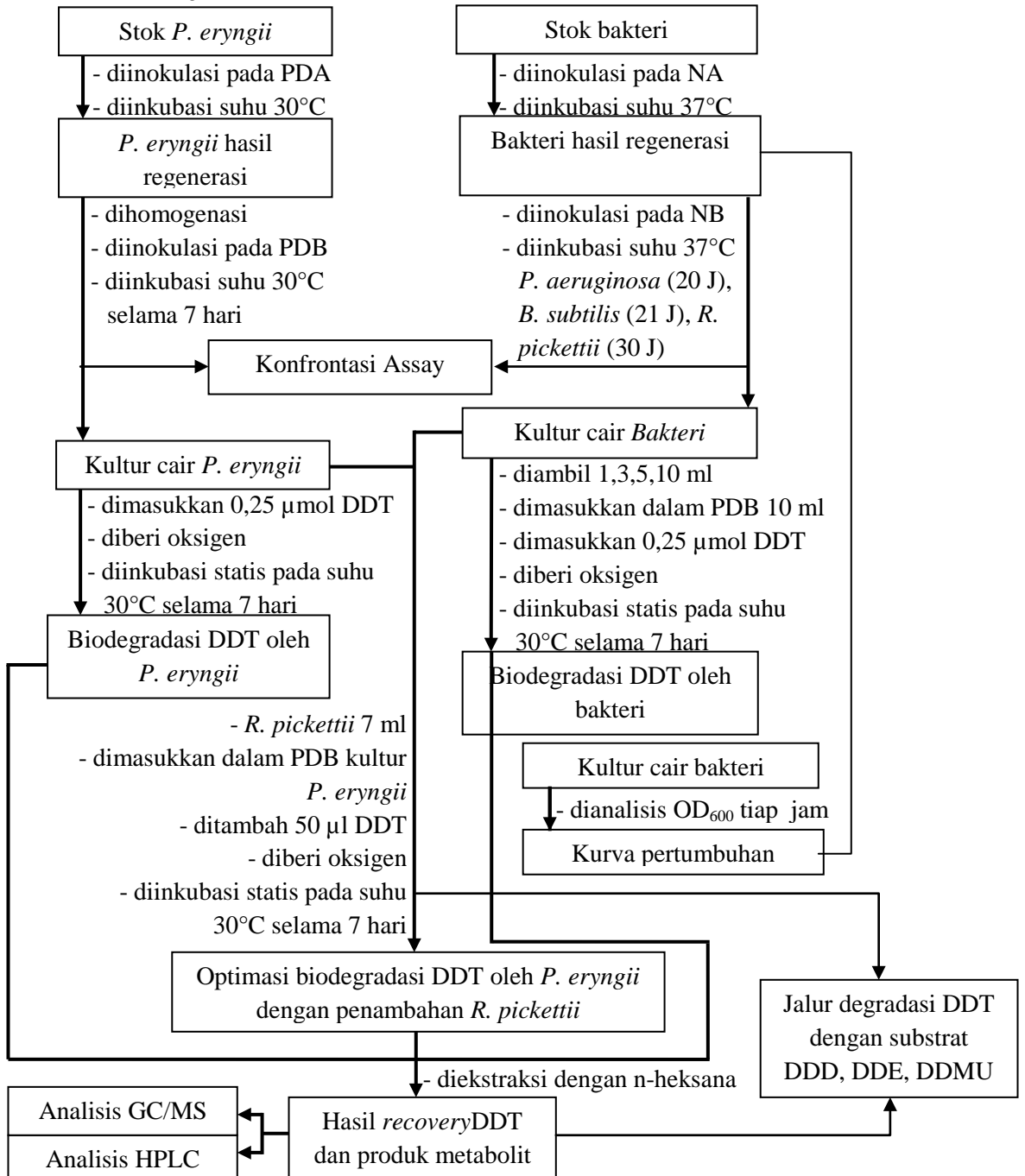
Tabel 4.6. menunjukkan, persen perolehan kembali DDD, DDE dan DDMU secara berurutan adalah 45,71%, 21,33% dan 0,33%. Ketika menggunakan DDD sebagai substrat yang didegradasi, DDE dan DDMU terdeteksi didalam kultur dan merupakan produk metabolit dari DDD. Konsentrasi DDD paling tinggi dalam medium, hal ini berarti bahwa DDD merupakan produk utama dalam degradasi DDT oleh mix kultur. DDMU terdeteksi sebagai produk metabolit ketika menggunakan DDE sebagai substrat yang didegradasi. Dari hasil ini dapat digambarkan jalur degradasi DDT oleh mix kultur *P. eryngii* dan *R. pickettii* seperti Gambar 4.23. DDT di transformasi menjadi DDD melalui proses reduksi deklorinasi, kemudian DDD dihidrogenasi menjadi DDE dan diikuti dengan proses deklorinasi menjadi DDMU. Jalur degradasi ini, menyerupai jalur degradasi oleh bakteri gram negatif, sebagaimana yang dilaporkan oleh Masse dkk. (1989).



Gambar 4.24. Dugaan jalur degradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan penambahan *R. pickettii*.

LAMPIRAN

1. Skema Kerja



2. Perhitungan

2.1. Pembuatan larutan DDT 5 mM dalam 50 ml DMSO

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

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

2.2. Pembuatan larutan pirena 5 mM dalam 50 ml DMSO

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

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

2.3. Uji signifikansi koefisien korelasi (uji t)

X_i	Y_i	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$(Y_i - \bar{Y})$	$(Y_i - \bar{Y})^2$	$(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})$
0	0	-50	2500	-0,202	0,041	10,111
25	0,104	-25	625	-0,098	0,010	2,451
50	0,219	0	0	0,017	0,000	0,000
75	0,301	25	625	0,099	0,010	2,476
100	0,387	50	2500	0,185	0,034	9,228
$\bar{X} = 50$	$\bar{Y} = 0,202$		$\Sigma = 6250$		$\Sigma = 0,095$	$\Sigma = 24,266$

$$\begin{aligned}r &= \frac{\Sigma[(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\sqrt{\Sigma[(X_i - \bar{X})^2(Y_i - \bar{Y})^2]}} \\ &= \frac{24,266}{\sqrt{(6250)(0,095)}} \\ &= 0,998\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 t_{hit} &= \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \\
 &= \frac{0,998\sqrt{5-2}}{\sqrt{1-0,998^2}} \\
 &= 25,362 \quad (t_{tabel} = 3,182)
 \end{aligned}$$

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

2.4. Koefisien Distribusi DDT Diantara n-heksana Dan Aquades

Kelarutan DDT dalam aquades = $2,5 \times 10^{-6}$ g/100 mL

Kelarutan DDT dalam n-heksana = 97 g/100 mL

$$K_D = \frac{\text{kelarutan DDT dalam fasa organik (g/100mL)}}{\text{kelarutan DDT dalam fasa aquos (g/100mL)}}$$

$$= \frac{97 \text{ g/100mL}}{2,5 \times 10^{-6} \text{ g/100mL}}$$

$$= 38,8 \times 10^6$$

2.5. Contoh Perhitungan Persen Recovery

Data analisis sampel kontrol (bakteri 1 mL)

Luas puncak Pirena	Luas puncak DDT	Perbandingan luas puncak DDT/pirena	Recovery
5684,99	2139,81	0,3764	94,10%
5846,27	2153,19	0,3683	92,08%

*Analisis menggunakan HPLC

Persamaan regresi linear kurva standar DDT $y = 0,004 x$

$$0,3764 = 0,004x$$

$$x = \frac{0,3764}{0,004}$$

$$x = 94,10\%$$

dimana:

y : perbandingan luas area puncak DDT/pirena

x : persen recovery

3. Data Analisis Sampel

3.1. Data analisis sampel *P. eryngii*

n	Pirena	DDT	DDT/ pirena	Recovery (%)	Rata- rata	SD	Degradasi (%)
C1	76994,95	29698,65	0,39	96,43	96,70	0,38	-
C2	74100,91	28740,36	0,39	96,96			
T1	13280,61	2797,06	0,21	52,65	53,49	1,18	43,21
T2	14416,07	3132,57	0,22	54,32			

3.2. Data analisis sampel screening bakteri

Kode sampel	n	Pirena	DDT	DDT/ pirena	Recovery (%)	Rata- rata	SD	Degradasi (%)
PePa	C1	76994,95	29698,65	0,39	96,43	96,70	0,38	-
	C2	74100,91	28740,36	0,39	96,96			
PePa	T1	1210719	112224	0,09	23,17	23,31	0,20	73,38
	T2	1473269	138221	0,09	23,45			
PeBs	T1	478489	55447	0,12	28,97	30,13	1,63	58,02
	T2	1234569	154471	0,13	31,28			
PeRp	T1	5052,5	381,72	0,08	18,89	18,46	0,60	78,23
	T2	12159,95	877,31	0,07	18,04			

3.3. Data analisis sampel *P. eryngii* dengan penambahan *R. pickettii* (variasi konsentrasi)

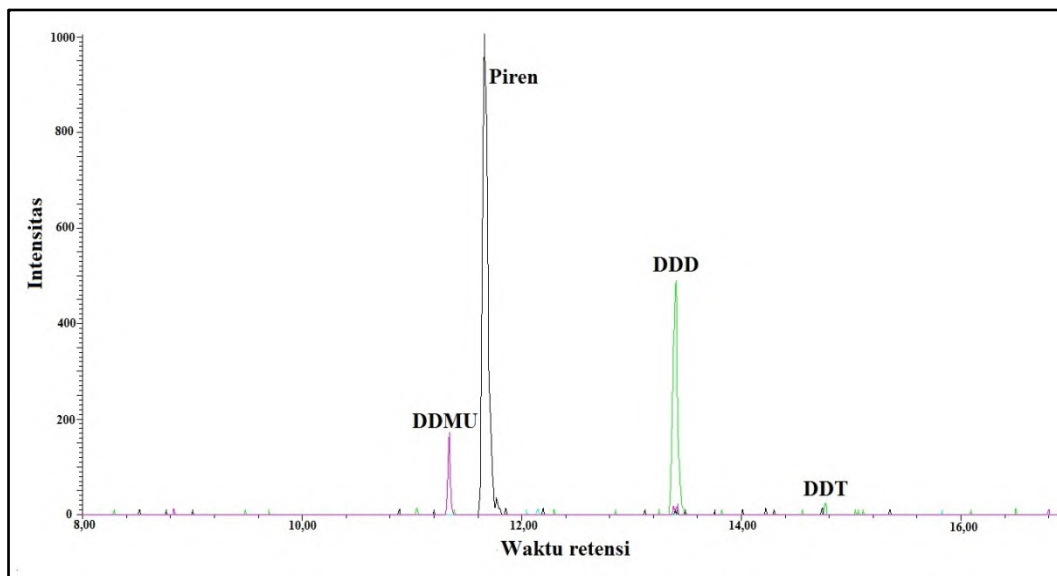
Kons. Bakteri (ml)	n	Pirena	DDT	DDT/pirena	Recovery (%)	Rata-rata	SD	Degradasi (%)
0	C1	76994,95	29698,65	0,39	96,43	96,70	0,38	-
	C2	74100,91	28740,36	0,39	96,96			
1	T1	6106.65	1275.98	0.21	52.24	50,78	2,06	45,92
	T2	11208.65	2211.11	0.20	49.32			
3	T1	6285.32	1167.22	0.19	46.43	47,89	2,07	48,80
	T2	11205.68	2212.35	0.20	49.36			
5	T1	12694.99	3111.3	0.25	61.27	60,52	1,06	36,17
	T2	17921	4284.89	0.24	59.77			
7	T1	5052.5	381.72	0.08	18.89	18,46	0,60	78,23
	T2	12159.95	877.31	0.07	18.04			
10	T1	3787.45	440.5	0.12	29.08	31,47	3,39	65,22
	T2	15449.7	2093.31	0.14	33.87			

3.4. Data analisis sampel *P. eryngii* dengan penambahan 7 ml *R. pickettii* (variasi waktu penambahan)

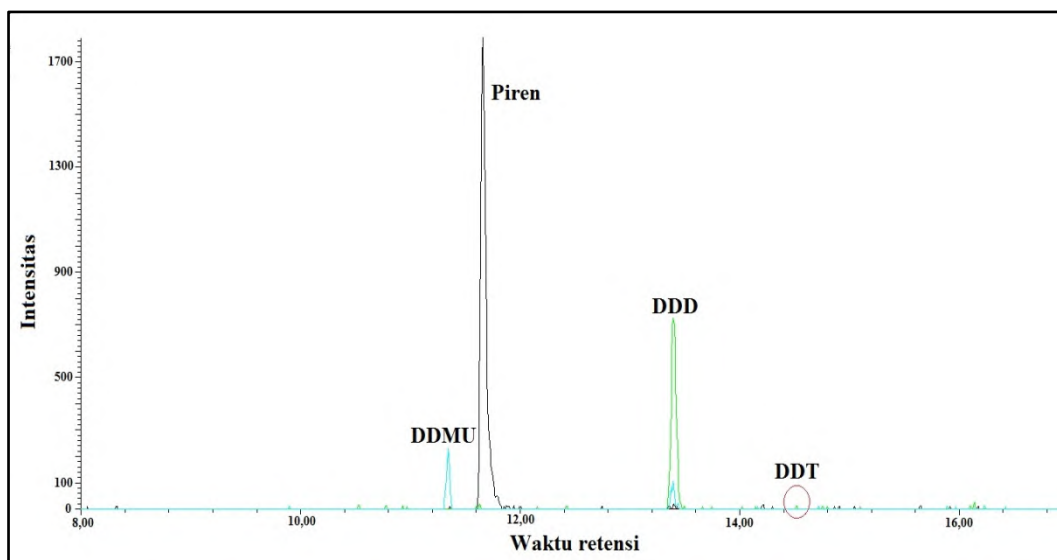
Hari ke-	n	Pirena	DDT	DDT/pirena	Recovery (%)	Rata-rata	SD	Degradasi (%)
	C1	76994,95	29698,65	0,39	96,43	96,70	0,38	-
	C2	74100,91	28740,36	0,39	96,96			
0	T1	5052.5	381.72	0.08	18.89	18,46	0,60	78,23
	T2	12159.95	877.31	0.07	18.04			
1	T1	1108537	114445	0.10	25.81	26,89	1,53	69,81
	T2	1269217	141984	0.11	27.97			
3	T1	1497050	80518	0.05	13.45	16,65	4,53	80,05
	T2	1467028	116496	0.08	19.85			
5	T1	745449	166374	0.22	55.80	59,07	4,62	37,63
	T2	1225426	305542	0.25	62.33			

4. Kromatogram GC hasil analisa

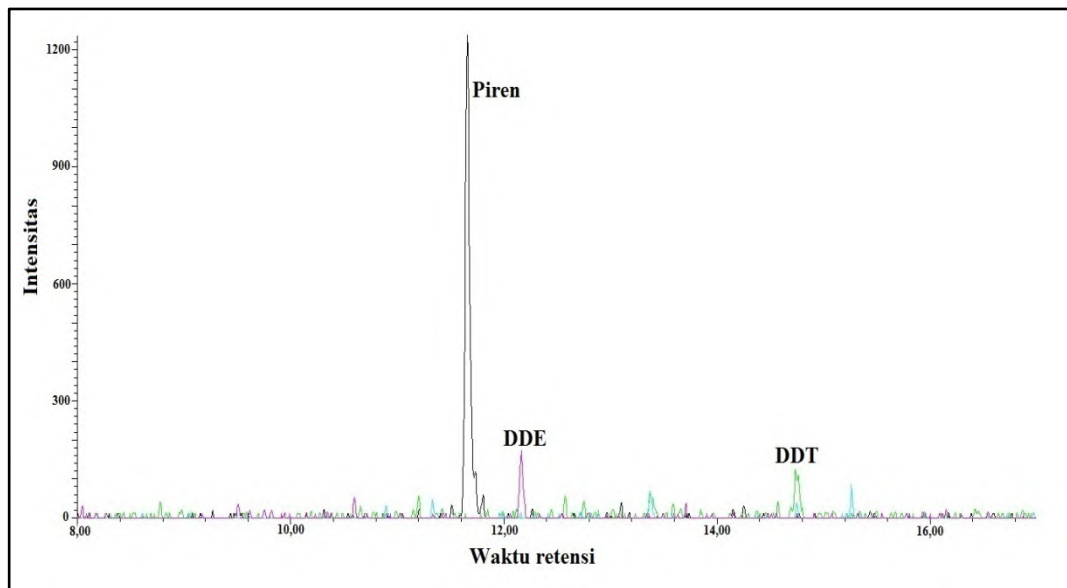
4.1. Degradasi DDT oleh *B. subtilis* konsentrasi 7 ml



4.2. Degradasi DDT oleh *P. aeruginosa* konsentrasi 7 ml



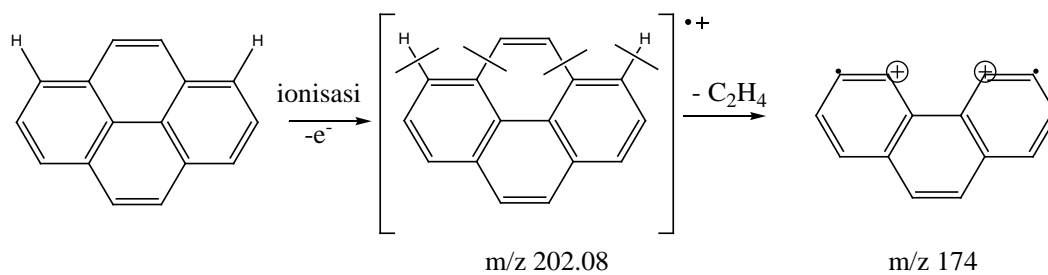
4.3. Degradasi DDT oleh *R. pickettii* konsentrasi 7 ml



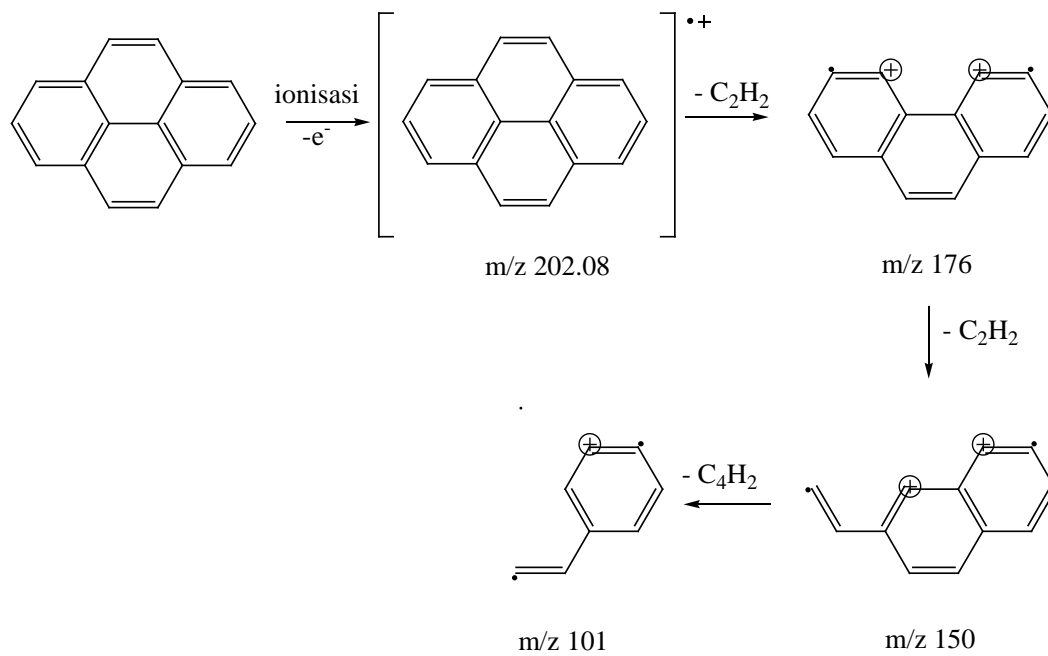
5. Fragmentasi Molekul

5.1. Ion hasil fragmentasi molekul piren

m/z 174

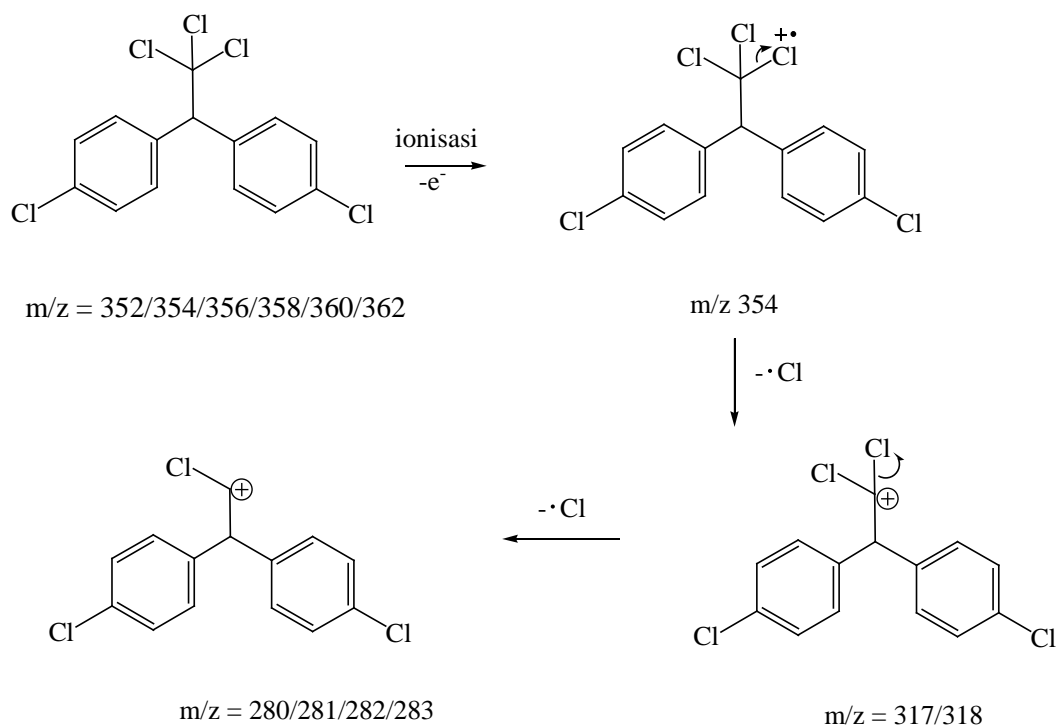


m/z 202 -> m/z 176 -> m/z 150 -> m/z 101

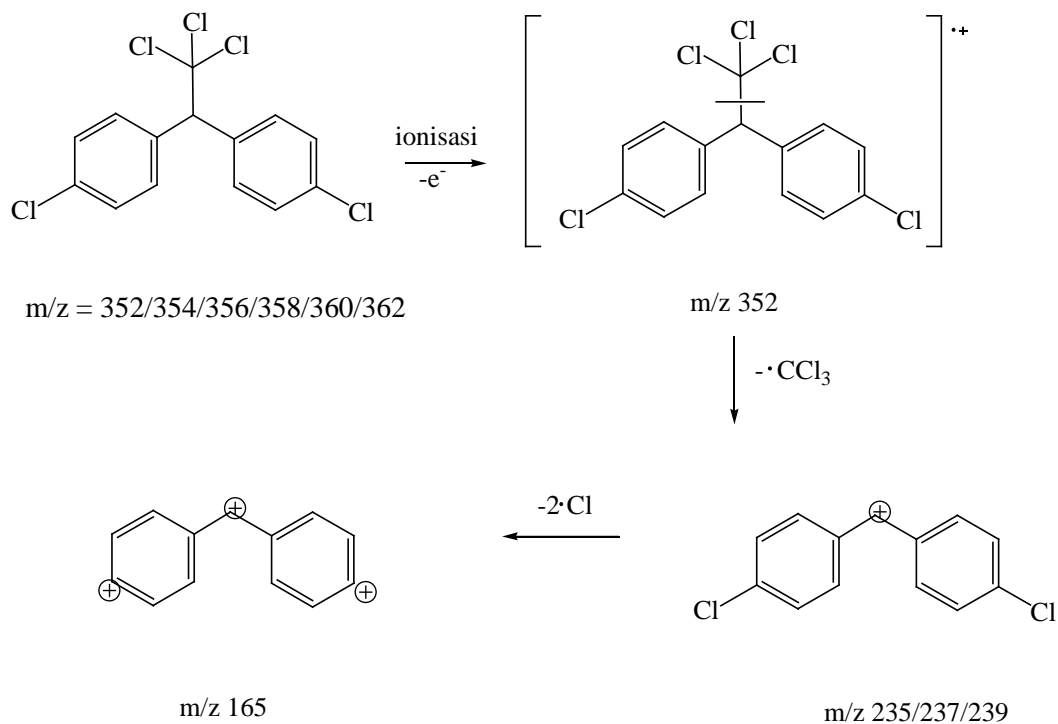


5.2. Ion hasil fragmentasi molekul DDT

m/z 354 \rightarrow m/z 317 \rightarrow m/z 282

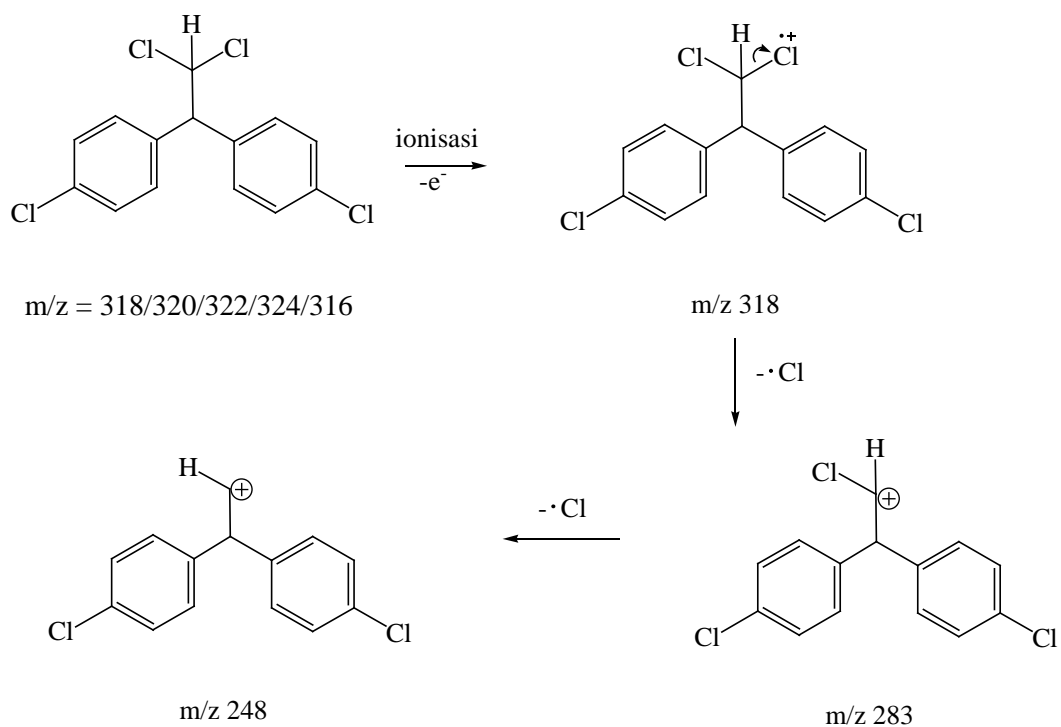


m/z 354 \rightarrow m/z 235 \rightarrow m/z 165

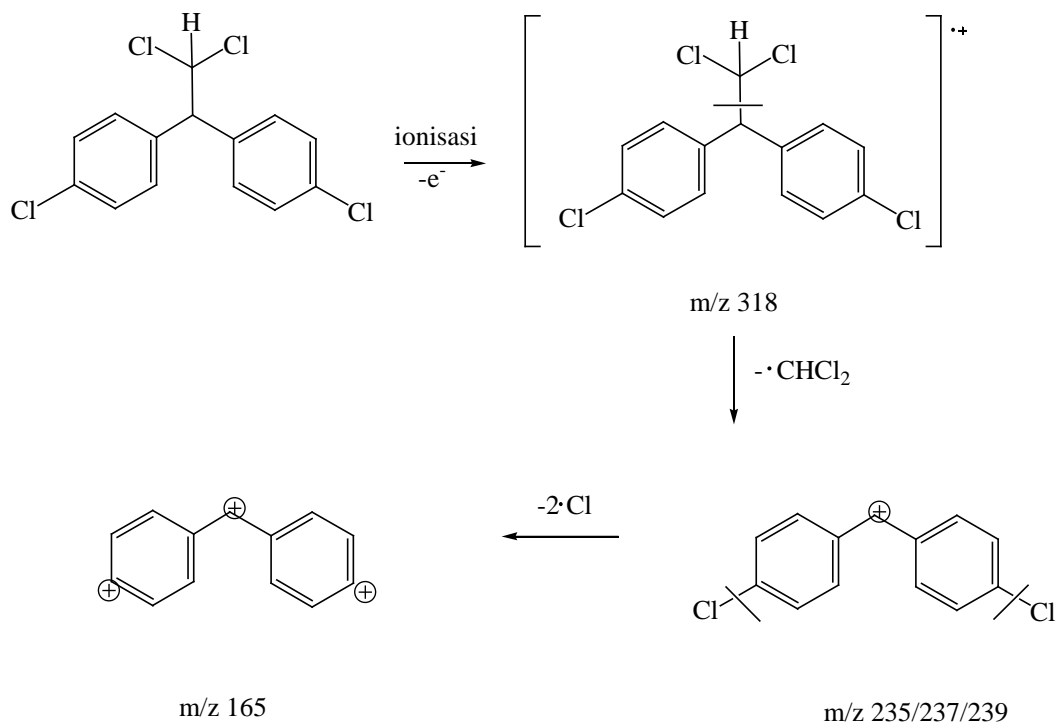


5.3. Ion hasil fragmentasi molekul DDD

m/z 318 -> m/z 283 -> m/z 248

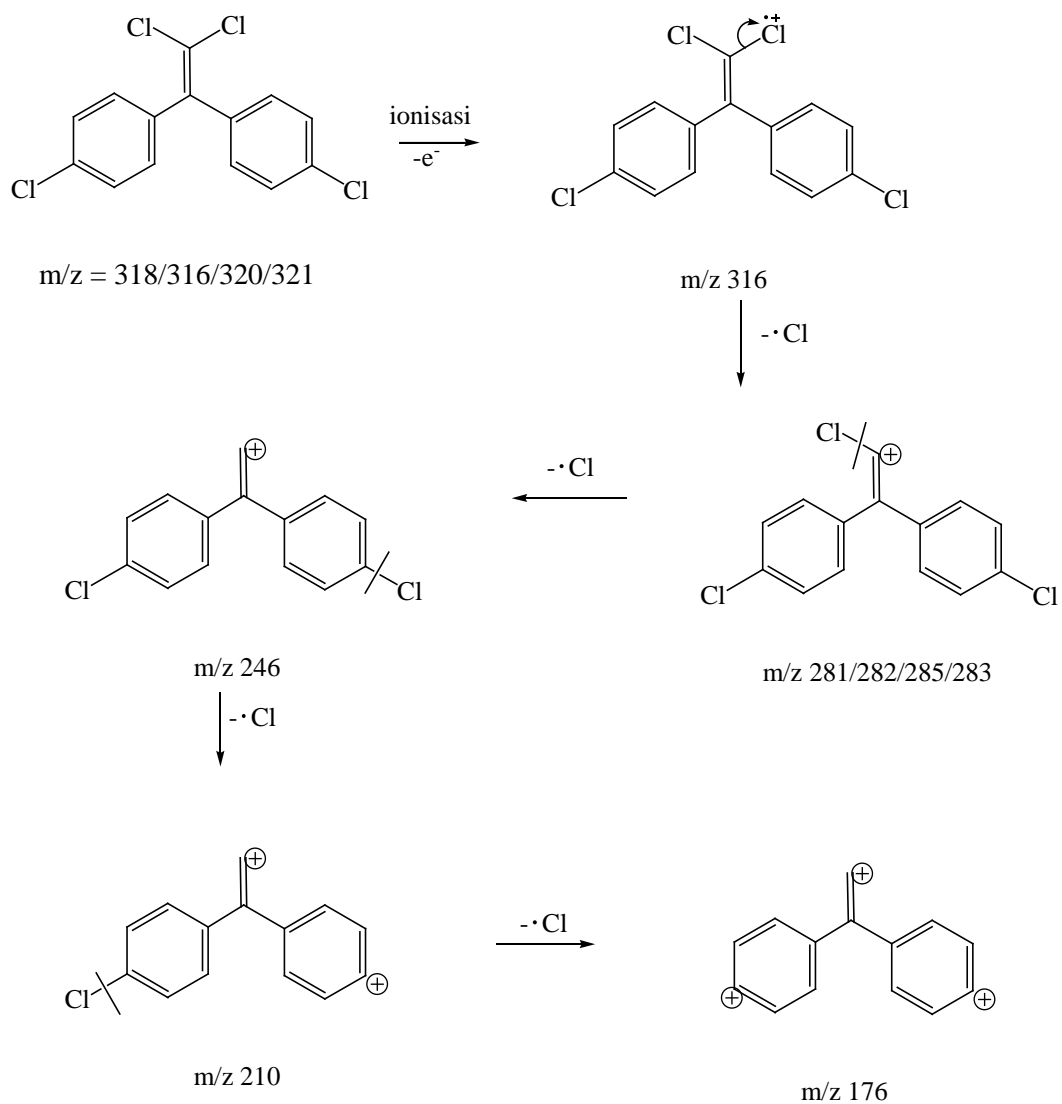


m/z 318 -> m/z 235 -> m/z 165



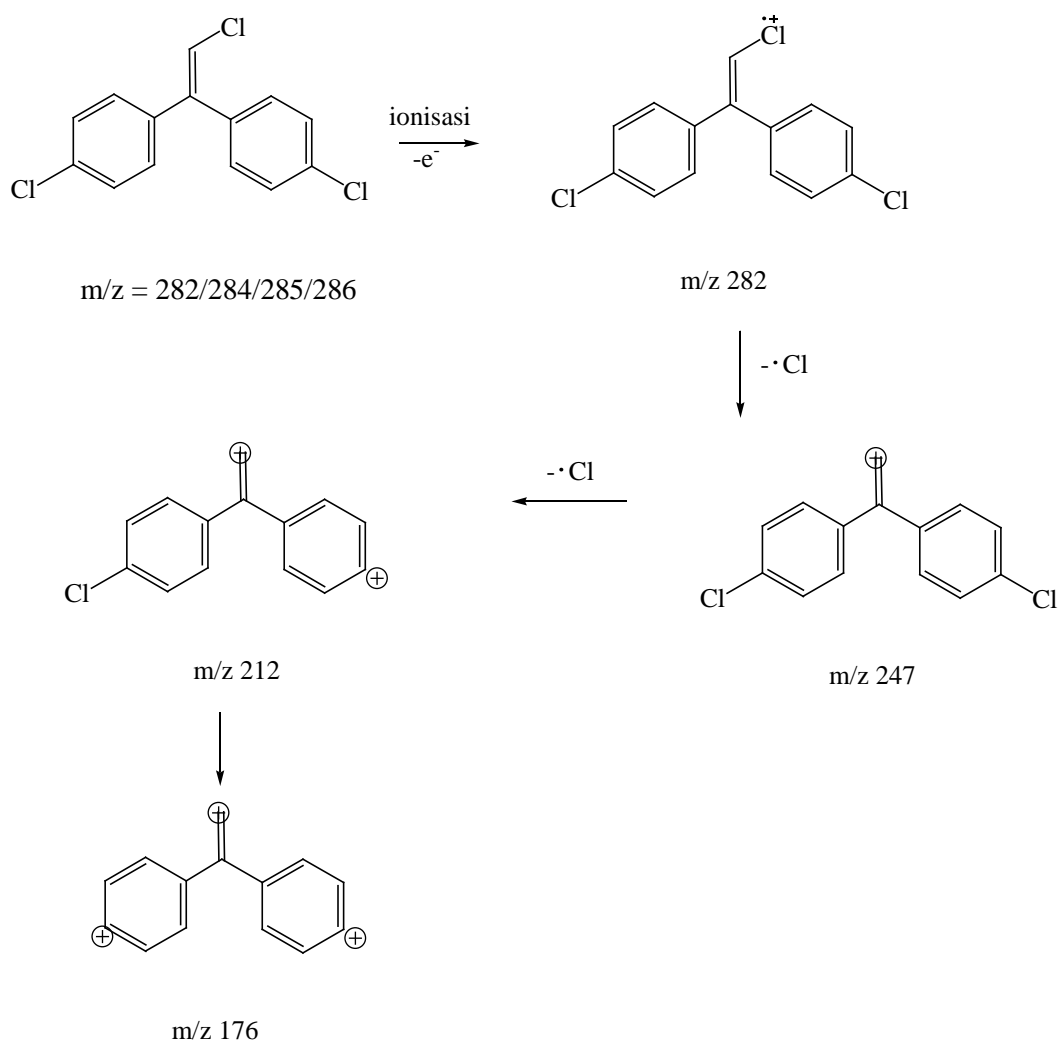
5.4. Ion hasil fragmentasi molekul DDE

m/z 316 \rightarrow m/z 281 \rightarrow m/z 246 \rightarrow m/z 210 \rightarrow m/z 176



5.5. Ion hasil fragmentasi molekul DDMU

m/z 282 -> m/z 247 -> m/z 212 -> m/z 176



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat hubungan sinergitas antara *P. eryngii* dan bakteri *R. pickettii*, dimana *R. pickettii* mampu mempercepat pertumbuhan miselium *P. eryngii*, sehingga bakteri *R. pickettii* yang ditambahkan ke dalam kultur *P. eryngii* dapat meningkatkan jumlah degradasi DDT. Konsentrasi *R. pickettii* serta waktu penambahan *R. pickettii* ke dalam kultur memberikan pengaruh terhadap degradasi DDT. Kultur dengan penambahan bakteri konsentrasi 7 ml memiliki jumlah degradasi DDT yang tertinggi yakni sekitar 78,23 %, Waktu penambahan pada hari ke-3 memiliki nilai degradasi tertinggi yakni sekitar 80,05%. Produk metabolit yang dihasilkan selama proses degradasi DDT oleh *P. eryngii* dengan penambahan 7 ml *R. pickettii* adalah DDD, DDE, dan DDMU.

5.2. Saran

Penelitian lebih lanjut mengenai kondisi yang optimal dan efektif seperti suhu, lama inkubasi, penggunaan aditif, serta jenis media cair untuk meningkatkan jumlah DDT yang terdegradasi serta menghasilkan produk metabolit yang lebih sederhana dan memiliki kadar toksisitas yang rendah terhadap lingkungan. Uji keterlibatan aktivitas enzim dan biosurfaktan dalam proses degradasi perlu dilakukan.

“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*, Vol. 17, hal. 1367-1371.
- Abou-Arab, A.A.K. (2002), "Degradation of Organochlorine Pesticides by Meat Starter in Liquid Media and Fermented Sausage", *Food Chemistry and Toxicology*, Vol. 40, hal. 33-41.
- Aislabie, J.M., Richards, N.K. dan Boul, H.L. (1997), "Microbial Degradation of DDT and its Residues-a Review. *Journal Agriculture Residues*, Vol. 40, hal. 269-282.
- Ashari, K. (2014), *Pengaruh Penambahan Pseudomonas aeruginosa Terhadap Biodegradasi DDT oleh Pleurotus ostreatus*, Skripsi, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Barr, D.P. dan Aust, S.D. (1994), "Pollutant Degradation by White Rot Fungi", *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 138, hal. 49-67.
- Bending, G.D., Poole, E.J., Whipps, J.M. dan Read, D.J., (2002), "Characterisation of Bacteria from *Pinus Sylvestris-Suillus Luteus* Mycorrhizas and Their Effects on Root-Fungus Interactions and Plant Growth", *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 39, hal. 219-227.
- Bidlan, R. dan Manonmami, H.K. (2002), "Aerobis Degradation of Dichlorodiphenyl-tricholoroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P", *Process Biochemistry*, Vol. 38, hal. 49-56.
- Bidlan, R. (2003), *Studies on DDT degradation by bacterial strains*, Thesis Ph.D., University of Mysore, Mysore.
- Bouwman, H., Kylin, H., Sereda, B. dan Bornman, R. (2012), "High Levels of DDT in Breast Milk: Intake, Risk, Lactation Duration, and Involvement of Gender", *Environmental Pollution*, Vol. 170, hal. 63-70.
- Bumpus, J.A. dan Aust, S.D. (1987), "Biodegradation of DDT [1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethane] by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*", *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 53, hal. 2001-2008.

- Bumpus, J.A. (1989), "Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, hal. 154-158.
- Cai, D. dan Tien, M. (1993), "Lignin-Degrading Peroxides of *Phanerochaete chrysosporium*", *Journal of Biotechnology*, Vol. 30, hal. 79-90.
- Camarero, S., Marti'nez, M.J. and Marti'nez, A.T., (1996), "Lignin-Degrading Enzymes Produced by *Pleurotus* Species During Solid-State Fermentation of Wheat Straw, dalam *Advances in Solid State Fermentation*, eds. Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. dan Viniegra-Gonzalez, G., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. hal. 335-345.
- Chandrappa, M. K. dan Harichandra, Z. N. (2004), "Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* Species", *Curr. Microbiol*, Vol. 48, hal. 10-13.
- Chang, B.V. dan Chang, Y.M. (2014), "Biodegradation of Toxic Chemicals by *Pleurotus Eryngii* in Submerged Fermentation and Solid-State Fermentation", *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. Vol. 20, hal. 1-7.
- Chu, W. (1999), "Photodechlorination Mechanism of DDT in a UV/Surfactant System", *Environmental Science and Technology*, Vol. 33, hal. 421-425.
- Clausen, C.A. (1996), "Bacterial association with decaying wood: a review", *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 37, hal. 101-107.
- Colleran, E. (1997), "Uses of Bacteria in Bioremediation", dalam *Bioremediation Protocols*, Sheehan, D., New Jersey, hal. 3-22.
- Costerton, J. W. (1980), "Pseudomonas aeruginosa in Nature And Disease", dalam *Pseudomonas aeruginosa: The Organism, Diseases It Causes and Their Treatment*. Hans Huber, Switzerland, hal. 15-24.
- Coulter, C., Kennedy, J.T., McRoberts, W.C. dan Harper, D.B. (1993), "Purification and Properties of an S-adenosylmethionine 2,4-disubstitued Phenol O-Methyl Transferase from *Phanerochaete chrysosporium*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 59, hal. 706-711.
- Desai, J.D. dan Banat, I.M. (1997), "Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential", *Microbiology of Molecular Biology*. Vol. 61, hal. 47-64.
- Deveau, A., Brule', C., Palin, B., Champmartin, D., Rubini, P., Garbaye, J., Sarniguet, A. dan Frey-Klett, P., (2010), "Role of Fungal Trehalose and Bacterial Thiamine in The Improved Survival and Growth of The Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria Bicolor* S238N and The Helper

Bacterium *Pseudomonas Fluorescens* BBc6R8”, *Environmental Microbiology*, Vol. 2, hal. 560-568.

Djojoseumarto, P. (2008), *Pestisida dan Aplikasinya*. PT. Agromedia Pustaka. Jakarta.

Djarajah, N. M. dan Djarajah, A. S. (2001), *Budidaya Jamur Tiram*, Kanisius, Yogyakarta.

Dufour, S., Deleu, M., Nott, K., Wathélet, B., Thonart, P., dan Paquot, M. (2005), “Hemolytic Activity of New Linear Surfactin Anaogs in Relation To Their Physico-Chemical Properties”, *Biochem Biophysical Acta*. Vol. 1726, hal. 87-95.

Eddleman, H., (1998). "Making Bacteria Media from Potato". Indiana Biolab. disknet.com.

Eggen, T. dan Majcherczyk, A., (2006), “Effects of zero-valent iron (Fe⁰) and temperature on the transformation of DDT and its metabolites in lake sediment”, *Chemosphere*, Vol. 62, hal. 1116-1125.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F., dan Eriksson, K. E. (1996), “A Fungal Metabolite Mediates Degradation of Non-Phenolic Lignin Structures and Synthetic Lignin by Laccase”, *FEBS Letters*, Vol. 391, hal. 144-148.

Engelmann, M.D., Hutcheson, R., Henschied, K., Neal, R., dan Cheng, I.F. (2003), “Simultaneous Determination of Total Polychlorinated Biphenyl and Dichloro Diphenyl Trichloroethane (DDT) by Dechlorination With Fe/Pd and Mg/Pd Bimetallic Particles and Flame Ionization Detection Gas Chromatography”, *Microchemical Journal*, Vol.74, hal. 19-25.

Estrada, R.A.E. dan Royse, D.J. (2007). “Yield, Size and Bacterial Blotch Resistance of *Pleurotus eryngii* Grown on Cottonseed Hulls/Oak Sawdust Supplemented With Manganese, Copper and Whole Ground Soybean”, *Bioresource Technology*, Vol. 98, hal. 1898-1906.

Feng, J. dan Turnbull, M. (2011), “1,1,1-Trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl)-ethane (DDT) Anaerobic Graphic Pathway Map. Biocatalysis/Biodegradation Database, University of Minnesota, Minneapolis, Saint Paul.

Fernando, T., Bumpus, J.A., dan Aust, S.D. (1990), “Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, hal. 1666-1671.

Frey-Klett, P., Garbaye, J. dan Tarkka, M., (2007), “The Mycorrhiza Helper Bacteria Revisited”, *New Phytological*, Vol. 176, hal. 22-36

- Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W.M., dan Liang, H. (2009), "A Critical Review of The Application of White Rot Fungus To Environmental Pollution Control", *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 30, hal. 70-77.
- 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*, Vol. 2, hal. 143-151.
- Guerra-Santos, L.H., Käppeli, O., dan Fiechter, A., (1984), "*Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture With Glucose As Carbon Source", *Application Environmental Microbiology*, Vol. 48, hal. 301-305.
- Guille'n, F., Marti'nez, M.J. and Marti'nez, A.T., (1992), "Substrate Specificity and Properties of The Aryl-Alcohol Oxidase from The Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*", *European Journal of Biochemistry*, Vol. 209, hal. 603-611.
- Hadibarata, T. dan Kristanti, R.A. (2014), "Potential of a White-Rot Fungus *Pleurotus eryngii* F032 for Degradation and Transformation of Fluorene", *Fungal Biology*, Vol. 118, hal. 222-227.
- Harris, D.C., (2007), *Quantitative Chemical Analysis*, 7th Edition, W. H. Freeman and Company, USA.
- Hatakka, A., (1994), "Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi-Production and Role in Lignin Degradation", *FEMS Microbiology Review*, Vol. 13, hal. 125-135.
- Hatta, T., Fujii, E. dan Takizawa, N. (2012), "Analysis of Two Gene Clusters Involved in 2,2,4,6-Trichlorophenol Degradation by *Ralstonia pickettii* DTP0602", *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, Vol. 76, hal. 892-899.
- Hermanyasa, F.T. (2014), *Pengaruh Penambahan Bacillus subtilis Terhadap Biodegradasi DDT Oleh Pleurotus ostreatus*, Skripsi, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Hiraishi, T., Hirahara, Y., Doi, Y., Maeda, M. dan Taguchi, S. (2006), "Effects of Mutations in the Substrate-Binding Domain of Poly[(R)-3Hydroxybutyrate] (PHB) Depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB Degradation", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 72, hal. 7331-7338.
- Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. dan Yan, B. (2004), "Enhancement of Laccase Production by *Pleurotus Ostreatus* and its Use for The Decolorization of Anthraquinone Dye", *Process Biochemistry*, Vol. 39, hal. 1415-1419.

- Huang, Y. dan Wang, J. (2013), "Degradation and mineralization of DDT by the Ectomycorrhizal Fungi, *Xerocomus chrysenteron*", *Chemosphere*, Vol. 92, hal. 760-764.
- Hundt, K., Wagner, M., Becher, D., Hammer, E., dan Scahuer, F. (1998), "Effect of Selected Environmental Factors on Degradation and Mineralization of Biaryl Compounds By The Bacterium *Ralstonia pickettii* in Soil and Compost", *Chemosphere*, Vol. 36, hal. 2321-2335.
- Ichiro, K., Yoshida, T., Enami, D. dan Meguro, S., (2012), "Coexisting *Curtobacterium* Bacterium Promotes Growth of White-Rot Fungus *Stereum* sp.", *Curr Microbiology*, Vol. 64, hal. 173-178.
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., dan Suzuki, T. (1971), "Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on N-Paraffin (Mixture of C12, C13 and C14 Fractions)", *Journal Antibiotic*, Vol. 24, hal. 855-859.
- Jarvis, F.G. dan Johnson, M.J. (1949), "A Glycolipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*", *J Am Chem Soc*, Vol. 71, hal. 4124-4126.
- Johnson, B.T., Goodman, R.N. dan Goldberg, H.S. (1967), "Conversion of DDT to DDD by Pathogenic and Saprophytic Bacteria Associated with Plants", *Science*, Vol.157, hal. 560-561.
- Kang, S.W., Kim, Y.B., Shin, J.D., dan Kim,E.K. (2010), "Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Surfactant, Sophorolipid", *Application Biochemical Biotechnology*, Vol. 160, hal. 780-790.
- Kasuya, K., Doi, Y. and Yao, T. (1994), "Enzymatic Degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] by *Comamonas testosteroni* ATSU of Soil Bacterium. Polymerase Degradation", Vol. 45, hal. 379-386.
- Kataoka, R., Futai, K. (2009), "A New Mycorrhizal Helper Bacterium, *Ralstonia* Species, in The Ectomycorrhizal Symbiosis Between *Pinus Thunbergii* and *Suillus Granulatus*", *Biological Fertilization Soils*, Vol. 45, hal. 315-320.
- Kennedy, D.W., Aust, S.D., dan Bumpus, J. (1990), "Comparative Biodegradation of Alkyl Halide Insecticides by the White Rot Fungus, *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767)", *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 56, hal. 2347-2353.
- Kersten, P.J. (1990), "Glyoxal Oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its Role, Characterization and Activation by Lignin Peroxidase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 87, hal. 2936-2940.

- Khaleel, A. dan Al-Nayli, A. (2008), "Supported and Mixed Oxide Catalysts Based on Iron and Titanium for The Oxidative Decomposition of Chlorobenzene", *Applied Catalysis B–Environmental*, Vol. 80, hal. 176-184.
- Kinuthia, M., Hamadi, I.B., Anne, W.M., Ciira, K., dan Muniru, K.T. (2010), "Degradation of Dichloro Diphenyl Trichloroethane (DDT) by Bacterial Isolates from Cultivated and Uncultivated Soil", *Afr. J. Microbial*, Vol, 4, hal. 185-196.
- Kirk, T.K. dan Farrell, R.L. (1987), "Enzyme "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin", *Ann Rev Microbiol*, Vol. 41, hal. 465-505.
- Kirk, T.K. dan Shimada, M. (1985), "Lignin Biodegradation: The Microorganisms Involved and The Physiology and Biochemistry of Degradation by White-Rot Fungi", dalam *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Compounds*, eds. Takayoshi Higuchi, Academic Press Inc., San Diego, hal. 579-605.
- Koper, O. dan Klabunde, K.J., (1997), "Destructive Adsorption of Chlorinated Hydrocarbons on Ultrafine (Nanoscale) Particles of Calcium Oxide, Chloroform, Trichloroethene, and Tetrachloroethene", *Chemistry of Materials*, Vol. 9, hal. 2481-2485.
- Kosaric, N. (1992), "Biosurfactant in Industry", *Pure Application Chemistry*, Vol. 64, hal. 1731-1737.
- Lal, R. dan Saxena, D. M. (1982), "Accumulation, Metabolism, and Effects of Organochlorine Insecticides on Microorganisms", *Microbiological reviews*, Vol. 46, hal. 95-100.
- Lang, S. dan Wullbrandt, D. (1999), "Rhamnose Lipids—Biosynthesis, Microbial Production and Application Potential", *Application Microbiology Biotechnology*, Vol. 51, hal. 22–32.
- Langlois, B.E., Collins, J.A. dan Sides, K.G., (1970), "Some Factors Affecting Degradation of Organochlorine Pesticides by Bacteria", *Journal of Dairy Science*, Vol. 53, hal. 1671-1675.
- Lima, A.S. dan Alegre, R.M. (2009), "Evaluation of Emulsifier Stability of Biosurfactant Produced by *Saccharomyces lipolytica* CCT-0913", *Brazilian Archeology Biologu Technology*, Vol. 52, hal. 285-290.
- Lomnicki, S. dan Dellinger, B. (2003), "Development of Supported Iron Oxide Catalyst for Destruction of PCDD/F", *Environmental Science and Technology*, Vol. 37, hal. 4254–4260.

- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., dan Pier, G.B. (2000), "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* Infection: Lessons From a Versatile Opportunist", *Microbes Infections*, Vol. 2, hal. 1051-1060.
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., dan Torrents, A. (2002), "Influence of Rhamnolipids and Triton X-100 on The Desorption of Pesticides From Soils, *Environmental Science Technology*, Vol. 36, hal. 4669-4675.
- Maier, R.M., dan Soberón-Chávez, G. (2000), "*Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and Potential Applications", *Application Microbiology Biotechnology*, Vol. 54, hal. 625-633.
- Masse, R., Lalanne, D., Messier, F. dan Sylvestre, M. (1989), "Characterization of New Bacteria Transformation Products of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethane (DDT) Metabolites by *Pseudomonas putida*", *Biomedical Environmental Mass Spectrometry*, Vol. 18, hal. 741-752.
- Matsuda, H., Ito, T., Kuchar, D., Tanahashi, N., dan Watanabe, C. (2009), "Enhanced Dechlorination of Chlorobenzene and In Situ Dry Sorption of Resultant Cl-Compounds by CaO and Na₂CO₃ Sorbent Beds Incorporated with Fe₂O₃", *Chemosphere*, Vol. 74, hal. 1348-1353.
- Matsunaga, A. dan Yasuhara, A. (2005), "Dechlorination of Polychlorinated Organic Compounds by Electrochemical Reduction with Naphthalene Radical Anion as Mediator", *Chemosphere*, Vol. 59, hal. 1487-1496.
- Mayer, A.M. dan Staples, R.C. (2002), "Laccase: New Functions for an Old Enzyme", *Phytochemistry*, Vol. 60, hal. 551-565.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A. dan Swings, J. (1993), "Microbial Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in Soils. *Application Environmental Microbiology*, Vol. 59, hal. 3233-3238.
- Mille-Lindblom, C. (2005), "*Interactions between bacteria and fungi on aquatic detritus—causes and consequences*". Digital Comperhensive of Uppsala Dissertations From Faculty of Science and Technology.
- Mishakov, I.V., Bedilo, A.F., Richards, R.M., Chesnokov, V.V., Volodin, A.M., dan Zaikovskii, V.I. (2002), "Nanocrystalline MgO as a Dehydrohalogenation Catalyst", *Journal of Catalysis*, Vol. 206, hal. 40-48.
- Monguchi, Y., Kume, A., dan Sajiki, H. (2006), "Facile and Catalytic Degradation Method of DDT Using Pd/C-Et₃N System Under Ambient Pressure and Temperature", *Tetrahedron*, Vol. 62, hal. 8384-8392.

- Morrison, D.E., Robertson, B.K., dan Alexander, M. (2000), "Bioavailability to Earthworms of Aged DDT, DDE, DDD, and Dieldrin in Soil", *Environmental Science and Technology*, Vol. 34, hal. 709-713.
- Moussa, T.A.A., Ahmed, G.M., dan Abdel-hamid, S.M.S. (2006), "Optimization of Cultural Conditions for Biosurfactants Production From *Nocardia amarae*", *Journal of Application Science*, Vol. 2, hal. 844-850.
- Mukai, K., Yamada, K. dan Doi, Y. (1994), "Efficient Hydrolysis of Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 Isolated from Lake Water", *Polymer Degradation Stab*, Vol. 43, hal. 319-327.
- Mukai, K., Yamada, K. dan Doi, Y. (1993), "Enzymatic Degradation of Poly-(hydroxyalkanoates) by a Marine Bacterium", *Polym. Degrad. Stab*, Vol. 41, hal. 85-91.
- Mulligan, C.N. (2005), "Environmental Applications for Biosurfactants", *Environmental Pollutant*. Vol. 133, hal. 183-198.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., dan Gibbs, B.F. (2001), "Surfactant-enhanced Remediation of Contaminated Soil: a Review", *Eng. Geology*, Vol. 60, hal. 371-380
- Munoz, C., Guillen, F., Martinez, A.T., dan Martinez, M.J. (1997), "Laccase Isoenzymes of *Pleurotus Eryngii*: Characterization, Catalytic Properties and Participation in Activation of Molecular Oxygen and Mn²⁺ Oxidation", *Application Enviroment Microbial*, Vol. 63, hal. 2166-2174.
- Nadeau, L.J., Menn, F., Bree, A., dan Sayler, G.S. (1994), "Aerobic Degradation of 1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-chlorophenyl)Ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Appl. Environ. Microbiol*, Vol. 60, hal. 51-55.
- Novak, K.M., (2002), *Drug Facts and Comparisons*, 56th edition, St. Louis, Missouri: Wolters Kluwer Health. Hal. 619
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Antoniou, T., Merhautova, V., dan Zerva, G.I., (2012), "Biodegradation and Detoxification of Olive Mill Wastewater by Selected Strains of The Mushroom Genera *Ganoderma* and *Pleurotus*", *Chemosphere*, Vol. 88, hal. 620-626.
- Palmieri, G., Cennamo, G., dan Sannia, G. (2005), "Remazol Brilliant Blue R Decolorisation by The Fungus *Pleurotus ostreatus* and its Oxidative Enzymatic System", *Enzyme Microbiology Technology*, Vol. 36, hal. 17-24.

- Pela'ez, F., Marti'nez, M.J. and Marti'nez, A.T., (1995), "Screening of 68 Species of Basidiomycetes for Enzymes Involved in Lignin Degradation", *Mycology Residues*, Vol. 99, hal. 37-42.
- Philp, J.C., Bamforth, S.M., Singleton, I., dan Atlas, R.M., (2005), "Environmental Pollution and Restoration: A Role For Bioremediation", dalam *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup*, Atlas, R. M. dan Phil, J., Washington, hal. 1-48.
- Philp, J. C., Atlas, R. M., (2005), "Bioremediation of Contaminated Soils and Aquifers", dalam *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup*, eds. Atlas, R. M. dan Phil, J., Washington, hal. 139-236.
- Plaza, G.A., Wypych, J., Berry, C. dan Brigmon, R.L., (2007), "Utilization of Monocyclic Aromatic Hydrocarbons Individually and in Mixture by Bacteria Isolated from Petroleum-Contaminated Soil", *World Journal Microbiology Biotechnology*, Vol. 23, hal. 533-542.
- Poole, E.J., Bending, G.D., Whipps, J.M. dan Read, D.J., (2001), "Bacteria Associated with Pinus Sylvestris-Lactarius Rufus Ectomycorrhizas and their Effects on Mycorrhiza Formation In Vitro", *New Phytology*, Vol. 151, hal. 743-751.
- Prescott, M.L., Harley, P.J. dan Klein A.D., (2005), *Microbiology*, 6th edition, McGraw-Hill Higher Education.
- Purnomo, A.S., Kamei, I., dan Kondo, R. (2008), "Degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by Brown-Rot Fungi", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 105, hal. 614-621.
- Qiu, X.H., Zhu, T., Li, J., Pan, H.S., Li, Q.L., Miao, G.F., dan Gong, J.C. (2004), "Organochloride pesticides in the Air Around the Taihu Lake, China", *Environmental Science and Technology*, Vol. 38, hal. 1368-1374.
- Ramadhani, N.W. dan Katharina, O. (2010), *Residu Insektisida Organoklorin Di Persawahan SUB DAS Citarum Hulu*. Program Studi Teknik Lingkungan, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Riedlinger, J., Schrey, S.D., Tarkka, M.T., Hampp, R., Kapur, M. dan Fiedler, H.P., (2006), "Auxofuran, a Novel Metabolite that Stimulates The Growth of Fly Agaric, is Produced by The Mycorrhiza Helper Bacterium *Streptomyces* Strain AcH 505", *Apply Environmetanl Microbiology*, Vol. 72, hal. 3550-3557.

- Robinson, K.G., Ghosh, M.M. dan Shi, Z. (1996), "Mineralization Enhancement of Non-aqueous Phase and Soilbound PCB Using Biosurfactant", *Water Science and Technology*, Vol. 34, hal. 303-309.
- Ron, E.Z. dan Rosenberg, E. (2001). "Minireview: Natural Role of Biosurfactants", *Environmental Microbiology*, Vol. 3, hal. 229-236.
- Sari, A.A., Tachibana, S., dan Itoh. K. (2012), "Determination of Co-Metabolism for 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4chlorophenyl)ethane (DDT) Degradation with Enzymes from *Trametes versicolor* U97", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 114, hal. 176-181.
- Sastroutomo, S.S, (1992), *Pestisida: Dasar-dasar dan Dampak Penggunaannya*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Santoyo, F., González, A. E., Terrón, M. C., Ramírez, L., dan Pisabarro, A. G. (2008) "Quantitative Linkage Mapping of Lignin-Degrading Enzymatic Activities in *Pleurotus ostreatus*", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol, 43, hal. 137-143.
- Sayles, G.D., You, G.R., Wang, M.X., dan Kuperferle, M.J. (1997), "DDT, DDD, and DDE Dechlorination by Zero-Valent Iron", *Environmental Science and Technology*, Vol. 31, hal. 3448-3454.
- Schenker U., Scheringer M., Sohn M.D., Maddalena, R.L., Mckone, T.E., dan Hungerbuhler, K. (2009). "Using Information on Uncertainty to Improve Environmental Fate Modeling : A Case Study on DDT", *Environmental Science and Technology*, Vol. 43, hal. 128-134.
- Schrey, S.D., Schellhammer, M., Ecke, M., Hampp, R. dan Tarkka, M.T., (2005), "Mycorrhiza Helper Bacterium *Streptomyces* AcH 505 Induces Differential gene Expression in The Ectomycorrhizal Fungus *Amanita muscaria*", *New Phytological*, Vol. 168, hal. 205-216.
- Seydlova, G. dan Svobodova, J. (2008), "Review of Surfactin Chemical Properties and The Potential Biomedical Applications", *Central Europe Journal Medical*, Vol. 3, hal. 123-33.
- Singh, A., Van Hamme, J.D., dan Ward, O.P. (2007), "Surfactants in Microbiology and Biotechnology: Part 2. *Application Aspect Biotechnology*, Vol. 25, hal. 99-121.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., dan Crouch, S.R. (2004), *Fundamental of Analytical Chemistry*, 8th Edition, Brooks/Cole, Inc., London.

- Soemirat, J. 2003. *Toksikologi Lingkungan*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Stanghellini, M.E. dan Miller, R.M., (1997), "Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in The Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens", *Plant Disease*, Vol. 81, hal. 4-12.
- Sudarmo, S. (1991), *Pestisida*, Kanisius, Jakarta.
- Sudaryanto, A., Takahashi, S. dan Tanabe, S. (2006), "Persistent Toxic Substances in The Environment of Indonesia", *Development in Environmental Science*, Vol. 7, hal. 587-627.
- Sutarma, (2000), *Kultur Media Bakteri*. Temu Teknis Fungsional Non Penelitian, 6.
- Tanio, T., Fukui, T., Shirakura, Y., Saito, T., Tomita, K., Kaiho, T. dan Masamune, S. (1982), "An Extracellular Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from *Alcaligenes faecalis*", *European Journal Biochemistry*, Vol. 124, hal. 71-77.
- Thurston, C.F. (1994), "The Structure and Function of Fungal Laccases", *Microbiology*, Vol. 140, hal. 19-26.
- Tien, M., Kirk, T.K., Bull, C., dan Fee, J.A., (1984), "Steady-State and Transient-State Kinetic Studies on The Oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl Alcohol Catalyzed by The Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* burds", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 261, hal. 1687-1693.
- Tien, M., Kirk, T.K., (1984), "Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-Requiring Oxygenase", *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America*, Vol. 81, hal: 2280-2284.
- Tien, M. (1987), "Properties of Ligninase From *Phanerochaete chrysosporium* and Their Possible Applications", *Critical Review of Microbiology*, Vol. 15, hal. 141-168.
- Todar, K. (2008), *Pseudomonas aeruginosa*. Todar's Online Textbook of Bacteriology.

- Ukisu, Y. (2008), "Complete Dechlorination of DDT and its Metabolites in an Alcohol Mixture Using NaOH and Pd/C Catalyst", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 152, hal. 287-292.
- United Nations Environmental Program (UNEP), (2004). <http://www.chem.unep.ch/pops/>.
- Urum, K. dan Pekdemik, T. (2004), "Evaluation of Biosurfactant for Crude Oil Contaminated Soil Washing", *Chemosphere*, Vol. 57, hal. 1139-1150.
- Vipulanandan, C. dan Ren, X. (2000), "Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant", *Journal of Environmental Engineering*, Vol. 126, hal. 629-634.
- Waluyo, L. (2010), *Teknik dan Metode Dasar Mikrobiologi*, UMM Pers, Malang.
- Wang, H., Tian, H., dan Hao, Z., (2011), "Study of DDT and its Derivatives DDD, DDE Adsorption and Degradation Over Fe-SBA-15 at Low Temperature", *Journal of Environment Science*, Vol 24, hal. 536-540.
- Wargo, M.J. dan Hogan, D.A. (2006), "Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes", *Current opinion in microbiology*, Vol. 9, hal. 359-364.
- Weber, R., Nagai, K., Nishino, J., Shiraishi, H., Ishida, M., dan Takasuga, T. (2002), "Effects of Selected Metal Oxides on The Dechlorination and Destruction of PCDD and PCDF", *Chemosphere*, Vol. 46, hal. 1247-1253.
- Weir, D. dan Schapiro, M. (1998), *Lingkaran Racun Pestisida*, Sinar Harapan, Jakarta.
- Westermarck, U. dan Eriksson K.E. (1974), "Cellobiose Quinone Oxidoreductase, a New Wood Degrading Enzyme from White Rot Fungi", *Acta Chem Scand*, Vol. 28, hal. 209-214.
- Wong, M.H, Leung, A.O.W., Chan, J.K.Y., dan Choi, M.P.K. (2005), "A Review on The Usage of POP Pesticides in China, with Emphasis on DDT Loadings in Human Milk", *Chemospher*, Vol. 60, hal. 740-752.
- Wonorahardjo, S. (2013), *Metode-metode Pemisahan Kimia Sebuah Pengantar*, Cetakan I, Akademia Permata, Jakarta.
- Zhang, L.L., Leng, S.Q., Zhu, R.Y. dan Chen, J.M. (2011), "Degradation of Chlorobenzene by strain *Ralstonia pickettii* L2 Isolated from a Biotricking Filter Treating a Chlorobenzene-Contaminated Gas Stream", *Apply Microbiolgy Biotechnology*, Vol 91, hal. 407-415.

Zhao, Y., Yi, X., Li, M., Liu, L., dan Ma, W. (2010), "Biodegradation Kinetics of DDT in Soil Under Different Environmental Conditions by Laccase Extract from White Rot Fungi", *Chinese Journal of Chemical Engineering*, Vol. 18, hal. 486-492.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BIODATA PENULIS

Penulis dilahirkan di Tarakan, 17 Juli 1984, merupakan anak pertama dari tiga bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal yaitu di SD Negeri 009 Tarakan, SLTP Negeri 3 Tarakan, dan SMA Negeri 2 Tarakan, Kalimantan Timur. Penulis menyelesaikan pendidikan sarjana di Universitas Mulawarman, Samarinda pada tahun 2005. Penulis pernah bekerja sebagai staf laboran di Universitas Borneo Tarakan pada tahun 2008-2013. Penulis menempuh studi master di Institut Teknologi Sepuluh Nopember melalui program Pra-S2 3T pada tahun 2013 dan dilanjutkan dengan program BPPDN Calon Dosen Dikti pada tahun 2014. Penulis mengambil bidang minat Biokimia di bawah bimbingan Adi Setyo Purnomo, M.Sc, Ph.D. Penulis dapat dihubungi melalui nomor HP 0852 4778 2142 dan email: diana.maulianawati@gmail.com.