

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT KONSORSIUM BAKTERI LAHAN PERTANIAN SEBAGAI POTENSI DEGRADASI PESTISIDA PROPOXUR

Ahmad Qi Sahlan, Endang Kusdiyantini¹, Sri Pujiyanto¹, Sarjiya Antonius²

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

2. Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong
Science Centre, Jalan Raya Bogor-Jakarta Km 46 Cibinong

e-mail: aqsahlan@gmail.com

ABSTRACT

Propoxur pesticide is a pesticide used widely enough by the Indonesian agricultural community. This pesticide is used as a systemic pesticide in agricultural areas to deal with pests as well as insecticides, herbicides, and bactericide. Study of the degradation of propoxur has long performed using the bacterial bioremediation agent. Bacterial consortium is a combination of several bacteria in a medium which that has a complementary function in the environment. The purpose of this study was the isolation and characterization of a consortium of farms that use propoxur pesticide. Isolation was done by spread plate and was observed characteristics of colony morphology. The obtained isolates were tested against propoxur and its potential role in the consortium. Degradation of propoxur observations using High Performance Liquid Cromatography (HPLC). Isolation results obtained 8 (eight) bacterial isolates and one that have an important role in the consortium is K1 isolate. K1 isolate were able to work up a consortium to degrade Propoxur in 2 isolates with K2 isolate. The interaction of these bacteria are natural and have a tendency to vary in nature after a process of isolation. K1 isolate are not able to work alone in a mineral medium, and worked with synergistic and complementary that in the bacterial consortium. KSR consortium optimum growth occurs in an environment with temperature 35 °C and pH 6.

Keywords: Isolation, Propoxur, Bioremediation, Bacterial Consortium, HPLC

ABSTRAK

Pestisida propoxur merupakan pestisida yang cukup luas digunakan oleh masyarakat pertanian Indonesia. Pestisida ini digunakan sebagai pestisida sistemik pada daerah pertanian untuk menghadapi serangan hama baik sebagai insektisida, herbisida, maupun bakterisida. Kajian degradasi propoxur sudah lama dilakukan dengan menggunakan agen bioremediasi yaitu bakteri. Konsorsium bakteri merupakan kombinasi beberapa bakteri dalam sebuah medium yang memiliki fungsi dalam lingkungan yang saling melengkapi. Tujuan penelitian ini adalah isolasi dan karakterisasi konsorsium dari lahan pertanian yang menggunakan pestisida propoxur. Isolasi dilakukan dengan cara spread plate dan dilakukan pengamatan karakteristik morfologi koloni. Isolat yang didapat diuji potensinya terhadap propoxur dan perannya dalam konsorsium. Pengamatan degradasi propoxur menggunakan High Performance Liquid Cromatography (HPLC). Hasil isolasi diperoleh 8 (delapan) isolat bakteri dan isolat yang memiliki peran yang penting dalam konsorsium adalah isolat K1. Isolat K1 mampu bekerja maksimal mendegradasi Propoxur dalam konsorsium 2 isolat bersama isolat K2. Interaksi bakteri ini bersifat alami dan memiliki kecenderungan berbeda sifat setelah melalui proses isolasi. Isolat K1 tidak mampu bekerja sendiri dalam medium mineral, dan bekerja dengan sinergis dan saling melengkapi bila dalam konsorsium bakteri. Pertumbuhan konsorsium KSR terjadi secara optimum pada lingkungan dengan suhu 35° C dan pH 6.

Kata kunci: Isolasi, Propoxur, Bioremediasi, Konsorsium bakteri, HPLC

PENDAHULUAN

Penggunaan propoxur dalam kehidupan manusia tidak dapat dihindarkan karena membantu melawan hama yang merusak tanaman pertanian terutama di Indonesia. Meskipun demikian, penggunaan propoxur memiliki dampak negatif terutama dilahan-lahan

yang penggunaannya secara intensif. Hal ini disebabkan karena pada lahan tersebut pestisida berpotensi terakumulasi. Kebanyakan jenis pestisida merupakan senyawa hidrokarbon sehingga diperkirakan pada lahan tersebut, terdapat bakteri-bakteri yang beradaptasi

menggunakan pestisida tersebut sebagai sumber karbon (Antonius *et al.*, 2006).

Akumulasi pestisida dalam lahan pertanian menjadi ancaman cukup serius bagi ekosistem tanah. Rao (2007) menuliskan bahwa pengaruh langsung pestisida terhadap aspek-aspek mikrobiologi berikut, yang pada gilirannya mempengaruhi pertumbuhan tanaman dapat disebutkan: (1) Pengaruh populasi *Azotobacter*, *Rhizobium*, mikroorganisme selulolitik dan mikroorganisme pelarut fosfat yang menentukan kesuburan tanah, (2) Perubahan dalam jumlah bintil dan akar lateral pada akar-akar legum berbintil (3) Perubahan pada aspek kuantitatif beberapa mikroorganisme dalam tanah yang mengganggu keseimbangan mikrobiologis, (4) Perpindahan keseimbangan nitrogen dalam tanah karena adanya perubahan dalam pertumbuhan dan kegiatan bakteri nitrifikasi – *Nitrosomonas* dan *Nitrobacter*, dan (5) Interferensi dengan ammonifikasi dalam tanah.

Propoxur (2-isopropoksifenil-N-metilkarbamat) merupakan insektisida karbamat yang diproduksi oleh perusahaan Bayer AG, Jerman. Propoxur di Indonesia boleh digunakan untuk komoditas pertanian berdasarkan Keputusan Menteri Nomor: 222/Kpts/SR.140/4/2004 tentang pendaftaran dan pemberian izin tetap pestisida, propoxur dapat digunakan dalam bentuk tepung yang disuspensikan digunakan pada tanaman kopi untuk membasi kutu putih *Planococcus citri* (Departemen Pertanian, 2004).

Bioremediasi mensyaratkan adanya agen biologis dalam proses pengembalian kondisi tanah tersebut dari akumulasi pestisida dalam tanah. Agen inilah yang akan bekerja dalam mendegradasi pestisida tersebut. Metode ini dipilih karena memiliki keunggulan yaitu rendahnya biaya instalasi awal dan efektifitas biaya yang tinggi dalam perawatannya. Hal tersebut sangat kontras dengan penanganan metode fisika-kimia (Cookson, 1995).

Propoxur perlu lebih cepat diuraikan. Beberapa cara telah dicoba untuk mempercepat penguraian propoxur diantaranya dengan penambahan bahan kimia tertentu seperti

degradasi propoxur dengan Fe-TiO₂ dibantu dengan H Zeolit (Mahalakshmi *et al.*, 2010) atau dengan fotodegradasi (Schwack & Kopf, 1992). Cara yang lain yakni dengan memperkaya lahan tersebut dengan bakteri pendegradasi. Beberapa jenis bakteri telah dilaporkan memiliki kemampuan mendegradasi propoxur. Ou *et al.* (1992) melaporkan bahwa *Arthrobacter* sp. mampu mendegradasi dan menggunakan senyawa hasil degradasi propoxur berupa 2-isopropoksifenol sebagai sumber karbon. Kamanavalli & Ninnekar (2000) melaporkan bahwa *Pseudomonas* sp. mampu menghidrolisis propoxur dan menggunakan hasil degradasinya berupa metilamin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Topp *et al.* (1993) melaporkan bahwa strain ER2 yang memiliki plasmid yang homolog dengan plasmid yang dimiliki oleh *Achromobacter* sp. mampu menghidrolisis senyawa N-metilkarbamat termasuk propoxur. Anusha *et al.* (2009) melaporkan bahwa *Neisseria subflava* dan *Staphylococcus aureus* mampu mendegradasi propoxur menjadi residu fenol dan senyawa-senyawa sederhana.

Konsorsium bakteri baik yang terbentuk alami maupun buatan memiliki kelebihan yaitu memiliki fungsi metabolism yang saling melengkapi dalam suatu ekosistem (Prescott *et al.*, 2002). Sehingga beberapa metode penelitian dalam mendegradasi residu polutan digunakan konsorsium bakteri. DeJonghe *et al.* (2002) melaporkan adanya degradasi sinergis dalam mendegradasi pestisida linuron oleh konsorsium bakteri. De Souza *et al.* (1998) melaporkan adanya katabolisme interspecies yang bersifat simulatan dari herbisida Atrazine.

Salah satu spesies dalam konsorsium bakteri ini telah diteliti yaitu *Rhodococcus pyridinivorans* mampu mendegradasi pestisida karbamat jenis Propoxur yang dimiliki laboratorium Ekologi dan Fisiologi Puslit Biologi-LIPI (Ananda, 2012). Ada kelemahan yaitu masih adanya sisa degradasi berupa methilamin. Oleh konsorsium bakteri tersebut perlu diteliti lagi dengan melihat fungsi

degradasinya mendegradasi propoxur dan substrat residunya.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2012 s.d. Januari 2014 di Laboratorium Ekologi dan Fisiologi, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong Science Centre, Jalan Raya Bogor-Jakarta Km 46 Cibinong, Kab. Bogor.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu meliputi alat dalam pembuatan medium dan sterilisasi, penguji pertumbuhan bakteri dan pengamatan pertumbuhan. Tabung Erlenmeyer, magnetic stirrer, gelas ukur, timbangan, sudip, penangas, autoklaf, sumbat penutup, vortex, rotary shaker, waterbath shaker, biolaminar cabinet, automatic pipet, minitube ependorf, rak minitube, UV-VIS Spectrofotometer, HPLC.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian terbagi dalam beberapa bagian. Bahan meliputi Konsorsium Bakteri, Medium NFMS, Medium MSB, dan bahan uji pestisida propoxur.

Konsorsium bakteri yang digunakan diperoleh dari perkebunan nanas PT Great Giant Pineapple di Lampung. Konsorsium ini telah ditumbuhkan dan disimpan dengan nama Konsorsium KSR oleh Lab. Ekofisiologi Bid. Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong. Konsorsium KSR ditumbuhkan dalam medium cair NFMS (Nitrat-free Mineral Salt) dengan penambahan Propoxur 1000 ppm.

Medium NFMS (Nitrate-free Mineral Salt) merupakan pengembangan dari medium MS (Mineral Salt) dengan mengganti NaNO₃ dengan NaCl 0,34 g per liter (Topp *et al.*, 1993). Medium NFMS terdiri dari K₂HPO₄ 0,82 g, KH₂PO₄ 0,19g, NaCl 0,34 g, MgSO₄.7H₂O 0,1 g, dan FeSO₄ (0,01 M) 2 ml. Medium disesuaikan dengan pH 7,00 – 8,00.

Medium MSB menurut Chen *et al.* (2005) terdiri dari Na₂HPO₄.(7H₂O) (Merck),

KH₂PO₄ (Merck), (NH₄)₂SO₄ (Merck), KOH (Univar), Asam Nitriloasetat (AppliChem), MgSO₄.(7H₂O) (Merck), CaCl₂.2H₂O (Merck), (NH₄)₆Mo₇.4H₂O (Merck), FeSO₄.7H₂O (Merck) dan larutan unsur kelumit (trace element).

Larutan unsur kelumit tersusun atas, EDTA.Fe (Merck), Zn.SO₄.7H₂O (Merck), FeSO₄.7H₂O (Merck), MnSO₄.7H₂O (Merck), CuSO₄.5H₂O, Co(NO₃)₂.6H₂O (Merck), Na₂B₄O₇.10H₂O (Merck).

Propoxur teknis 98%, dan pelarutnya, methanol (HPLC grade; 99,9%). Bahan-bahan fase gerak pengujian HPLC yaitu Aquabidestilata (HPLC grade) dan Acetonitrile (HPLC grade; 99,93%).

Cara Kerja

a. Persiapan Kultur Kerja

Konsorsium bakteri yang diperoleh dalam bentuk kultur cair menggunakan medium NFMS dengan Propoxur 2000 ppm merupakan kultur stok. Konsorsium ini diperoleh dari sampel lahan pertanian yang ditumbuhkan dalam medium NB+Propoxur yang telah dikoleksi dengan nama Konsorsium KSR oleh Lab. Ekofisiologi Bid. Mikrobiologi Puslit Biologi LIPI. Persiapan kultur kerja Konsorsium KSR yang digunakan dalam penelitian yaitu dengan menumbuhkan pada 2 medium kerja yaitu NFMS+Propoxur dan MSB+Propoxur.

Pembentukan Konsorsium KSR dilakukan menurut Ananda (2012) dengan cara memasukkan tanah sampel 10 g dalam medium MSB+Propoxur+Glukosa 150 ml. Kultur ditumbuhkan dalam rotary shaker selama 5 minggu dan diremajakan dengan medium yang sama. Kultur peremajaan kemudian ditumbuhkan selama 4 hari dan diulang hingga 3 kali. Konsorsium bakteri kemudian ditumbuhkan dalam medium MSB+Propoxur 150 ml tanpa penambahan Glukosa, selama dilakukan 4 hari. Kemudian setelah inkubasi dipindah dalam medium NFMS+Propoxur 150 ml. Pertumbuhan dalam NFMS ini dilakukan selama 4 hari dan kultur tersebut yang digunakan sebagai perlakuan.

b. Isolasi Bakteri

Isolasi Bakteri dilakukan dari Konsorsium KSR dalam medium cair NFMS+Propoxur. Satu ml kultur KSR diencerkan secara berjenjang dengan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Pengenceran yang dilakukan dihomogenkan dengan vortex. Isolasi dilakukan dengan mengambil 25 μ l dari pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Kultur bakteri ditumbuhkan dengan metode *spread plate* ke dalam medium NA+Propoxur di cawan petri. Kultur diratakan menggunakan speader hingga merata dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C.

Pertumbuhan pada pengenceran hasil isolasi diamati dan satu-persatu koloni bakteri dipisahkan secara aseptis menggunakan ose pada medium yang sama pada cawan petri. Hasil isolasi ini diinkubasi dengan suhu 30°C selama 1-3 hari hingga dapat diamati sebagai koloni tunggal. Metode *spread plate* juga dilakukan pada medium MSB+Propoxur dengan perlakuan yang sama dan diinkubasi selama 7 hari. Medium MSB pada tahap isolasi ini dilakukan penambahan dengan propoxur 1000 ppm.

Isolasi yang dilakukan menggunakan medium Nutrien Agar dan medium Mineral Salt Basal (MSB) dilakukan dengan 2 kali pengulangan, sehingga mampu memperoleh seluruh bakteri yang terdapat dalam konsorsium bakteri. Medium Nutrien digunakan supaya dapat mendukung pertumbuhan sebanyak-banyak isolat bakteri, karena medium ini adalah medium paling ideal bagi hampir semua bakteri. Medium MSB merupakan medium mineral dengan sumber nutrisi terukur, namun dengan tidak adanya sumber karbon di dalam medium, sehingga medium ini berfungsi untuk menumbuhkan bakteri tertentu dengan sumber substrat karbon yang spesifik.

c. Karakterisasi Isolat

Masing-masing koloni tunggal dari proses isolasi diamati bentuk dan warna koloninya. Isolat bakteri diberi penamaan K1, K2, K3 dan seterusnya. Setiap isolat diberi deskripsi morfologi bentuk koloni, warna, dan

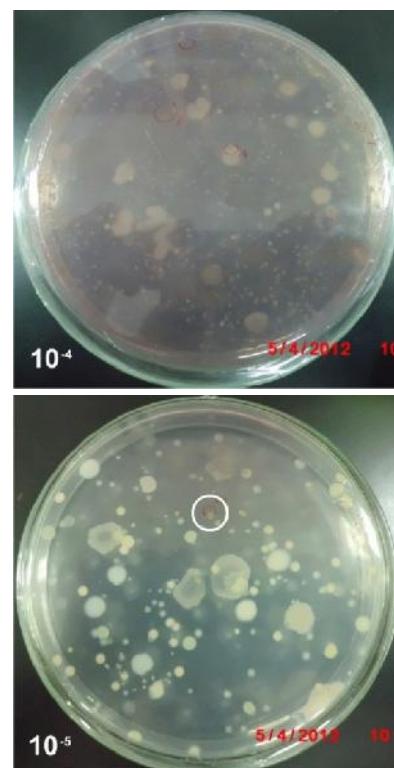
elevasinya. Isolat yang telah murni dipindahkan ke tabung agar miring dengan medium NA+Propoxur.

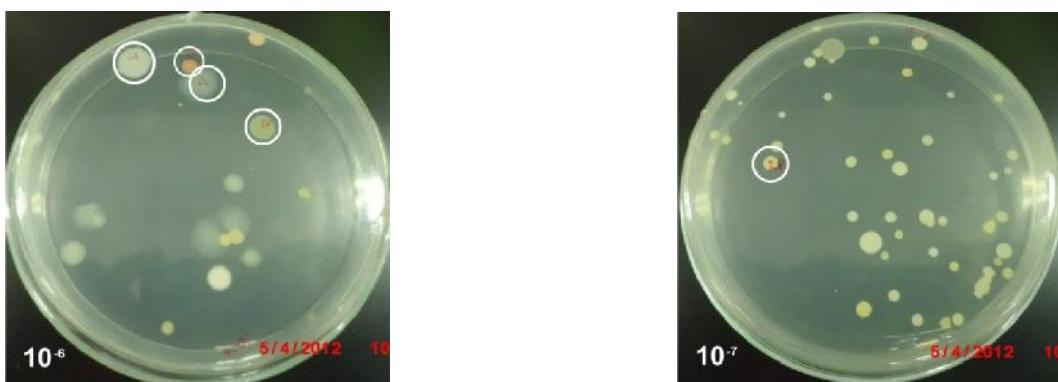
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Konsorsium Bakteri pada medium Nutrien Agar

Hasil isolasi koloni dari *spread plate* di medium NA diperoleh 6 koloni. Hasil ini dipindah dengan metode gores ke dalam 6 cawan petri yang berbeda (Gambar 1). Hasil pindahan koloni diinkubasi 3 hari menghasilkan isolat yang belum murni. Terdapat beberapa bakteri dalam satu petri yaitu petri A dan D. Pemurnian dilakukan dengan mengambil isolat-isolat dari petri tersebut.

Isolasi bakteri yang diperoleh setelah pemurnian berjumlah 8 isolat. Setelah pertumbuhan dilakukan selama 3 hari, isolat-isolat tersebut diamati untuk mengetahui karakteristik koloni berdasarkan warna, bentuk, dan elevasi sesuai dengan metode yang digunakan Prescott (2002). Karakteristik morfologi koloni ini ditunjukkan pada Tabel 1.





Gambar 1. Hasil *spread plate* pada medium Nutrien Agar pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} .

Tabel 1.Karakteristik morfologi koloni bakteri hasil isolasi

Isolat	Warna	Bentuk	Deskripsi koloni isolat	
			Elevasi	Keterangan
K1	Orange	<i>Filamentous</i>	<i>Convex</i>	Kecil
K2	Putih-kuning	Bulat	<i>Convex</i>	Sedang
K3	Transparan	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	
K4	Kuning	<i>Punctiform</i>	<i>Raised</i>	Sedang
K5	Putih	Bulat	<i>Raised</i>	Melebar
K6	Kuning-transparan	<i>Punctiform</i>	<i>Pulvinate</i>	Kecil
K7	Putih-kuning-transparan	Bulat	<i>Raised</i>	
K8	Putih-transparan	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	Mengubah warna medium

Isolasi Konsorsium Bakteri pada medium Mineral Salt Basal

Isolasi Konsorsium Bakteri juga dilakukan pada media Mineral Salt Basal. Hasil isolasi diperoleh 1 isolat (Gambar 2). Karakteristik morfologi koloni bakteri ini sama dengan isolat K1 pada isolasi menggunakan medium NA, yaitu berwarna orange, bentuk koloni *filamentous* dan memiliki *elevasi convex*. Isolat dari medium MSB ini juga diberi nama isolat K1, karena kesamaan karakter tersebut. Semua Isolat hasil isolasi kemudian diuji peran dan fungsinya dalam uji konsorsium.



Gambar 2. Hasil *spread plate* pada medium Mineral Salt Basal pada pengenceran 10^{-6} .

SIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa isolasi Konsorsium KRS diperoleh 8 jenis bakteri. Karakteristik interaksi antar bakteri dalam konsorsium terjadi dengan adanya

perbedaan tingkat pertumbuhan pada konsorsium KSR dibandingkan konsorsium KSR-b. Pengujian interaksi utama dalam konsorsium dalam mendegradasi propoxur terjadi antara isolat K1 dan K2.

Bakteri utama dalam mendegradasi propoxur yaitu Bakteri Isolat K1. Namun dalam medium miskin nutrisi, bakteri ini harus bersama dengan bakteri lainnya salah satunya bakteri K2. Karakteristik degradasi propoxur oleh konsorsium KSR sangat berbeda dengan isolat tunggal K1. Uji Konsorsium menunjukkan adanya kerja isolat yang saling melengkapi dalam mendegradasi propoxur sebagai substrat pertumbuhan. Pertumbuhan konsorsium KRS terjadi secara optimum pada lingkungan dengan suhu 35°C dan pH 6.

DAFTAR PUSTAKA

- Ananda, A. 2012. Biodegradation of Propoxur (2-Isoropxyphenyl-N-Methylcarbamate) by Bacteria from Agricultural Soil in Lampung. *Thesis.Jur. Biologi Fakultas MIPA Univ. Indonesia, Jakarta.*
- Antonius, S., Sulistinah, N., Sulistiani, T.R., Kustiarini, D.A., Agustiani, D. 2006. Exploring Carbamat-Degrading Bacteria from Soil from Distant Indonesian Island. In: Kim, K., Inam, E (Eds). Science and Technology for Sustainability, Volume 4: Sound Management of Hazardous Chemicals. Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju.
- Anusha, J., Kavitha, P. K., Louella, C. G., Chetan, D. M. and Rao, C.V. 2009. A study on biodegradation of propoxur by bacteria isolated from municipal solid waste. *International Journal of Biotechnology Applications* 1 (2): 26-31
- Chen, H.J., Tseng, D.W., & Huang, S.L. 2005. Biodegradation of octyphenol polythoxylate surfactant Triton X-100 by selected microorganism. *Bioresource Technology* 96: 1483-1491
- Cookson, J.T. 1995. Bioremediation Engineering: design and application. McGraw-Hill, Inc, New York.
- De Souza, M.L., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D.E., Hay, A., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1): 178-184
- Dejonghe, W., Berteloot, E., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., Hofte, M., De Vos, P., Verstraete, W., Top, E.M. 2003. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading variovorax strain. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3): 1532-1541
- Departemen Pertanian. 2004. Keputusan Menteri Pertanian Nomor : 222/Kpts/SR.140/4/2004 Tentang Pendaftaran dan Pemberian Izin Tetap Pestisida. Departemen Pertanian Republik Indonesia, Jakarta.
- Kamanavalli, C.M. and Ninnekar, H.Z. 2000. Biodegradation of propoxur by Pseudomonas species. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 329-331
- Mahalakshmi, M., Vishnu P. S., Arabindoo, B., Palanichamy, M., Murugesan, V. 2009. Photocatalytic degradation of aqueous propoxur solution using TiO₂ and Hbeta zeolite-supported TiO₂. *Journal of Hazardous Materials* 161(1):336-43
- Ou, L.T., Nkedi-Kizza, P., Cisar, J.L., Snyder, G.H. 1992. Microbial degradation of propoxur in turfgrass soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 27 (5): 545-564
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 2002. Microbiology : 5th Edition. McGraw-Hill, New York.
- Rao, N.S.S. 2007. Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman. UI Press, Jakarta
- Schwack, W. and Kopf, G. 1992. Photodegradation of the carbamate insecticide propoxur. *Zeitschrift f r Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 195: 250-253
- Topp, E., Hanson, R.S., Ringelberg, D.B., White, D.C., Wheatcroft, R. 1993. Isolation and characterization of an *N*-methylcarbamate insecticide-degrading methylotrophic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (10): 3339-3349

