

PENELITIAN DASAR



LAPORAN PENELITIAN

**KINETIKA BIODEGRADASI 2-METIL-4-KLOR FENOKSI ASETAT
FORMULA OLEH BAKTERI**

Oleh :

**Dra. NURHAYATI, MSi
KHAIRUL ANAM, Ssi, MSi**

**Dibiayai oleh Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi,
Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Dasar**

Nomor : 68/P₂IPT/DPPM/PID/III/2004

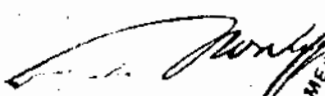
Tanggal 1 bulan Maret Tahun 2004

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS DIPONEGORO SEMARANG
OKTOBER 2004**

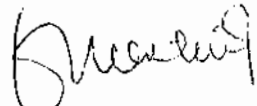
**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA**

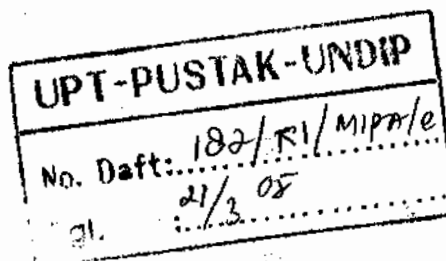
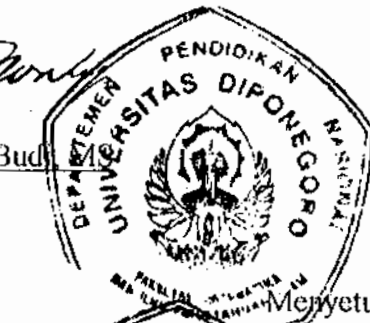
1. a. Judul Penelitian : Kinetika Biodegradasi 2-metil-4-klor fenoksi
asetat formula oleh Bakteri
b. Kategori Penelitian : Penelitian Dasar
2. Ketua Peneliti
a. Nama Lengkap : Dra. Nurhayati, MSi
b. Jenis Kelamin : Wanita
c. Pangkat/Gol/NIP : Penata / IIIC / 131 875 472
d. Jabatan Fungsional : Lektor
e. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi
f. Universitas : Universitas Diponegoro
g. Bidang Ilmu yang Diteliti : Lingkungan
3. Jumlah Tim Peneliti : 2 orang
4. Lokasi Penelitian : Biologi ; Kimia Undip & Kimia UGM
5. Jangka waktu Penelitian : 8 Bulan
6. Biaya yang Diperlukan : Rp.15.000.000,00 (Lima Belas Juta Rupiah)
7. Sumber Dana : Penelitian Dasar
No.68/P₂IPT/DPPM/PID/III/2004

Mengetahui
Dekan.


Dr. Wahyu Setia Budi
NIP. 131 459 438

Semarang, Oktober 2004
Ketua Peneliti


Dra. Nurhayati, MSi
NIP. 131 875 472



DAFTAR ISI

Halaman

Lembar Identitas dan Pengesahan Laporan Akhir Hasil Penelitian		
Dasar		
DAFTAR ISI		
RINGKASAN		
SUMMARY		
PRAKARTA		
DAFTAR TABEL		
DAFTAR GAMBAR		
DAFTAR LAMPIRAN		
BAB I.	PENDAHULUAN	1
BAB II.	TINJAUAN PUSTAKA	3
	Degradasi aerob herbisida fenoksialkanoat terklorinasi	7
	Degradasi asam klorofenoksiasetat oleh kapang	14
	Degradasi secara anaerob fenoksi asam asetat	15
	Mekanisme genetic adaptasi	17
	Penentuan konstanta kejenuhan substrat Monod untuk Pertumbuhan mikrobia	19
	Pentingnya nilai K_s	20
	Definisi konstanta kejenuhan substrat	21
	Prinsip-prinsip penentuan konstanta kejenuhan substrat	28
BAB III.	TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	30
BAB IV.	METODE PENELITIAN	31
BAB V.	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	40
	A. Hasil isolasi bakteri dehalogenasi	40
	B. Uji Kemampuan tumbuh bakteri untuk tumbuh dan mendehalogenasi KMCPA formula	41
	C. Kemampuan isolat bakteri dehalogenasi dalam melakukan biodegradasi KMCPA formula	42
	D. Penetapan biodegradasi KMCPA formula dengan HPLC	43
	E. Analisis spectra HPLC pada berbagai konsentrasi KMCPA Formula dan berbagai waktu inkubasi	44
	F. Prosentasi kadar KMCPA formula yang tersisa di medium Hasil biodegradasi beberapa bakteri pada berbagai medium dengan waktu inkubasi 41 hari	62
	G. Penentuan kinetika biodegradasi KMCPA formula oleh bakteri M	
BAB VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	64
DAFTAR PUSTAKA		65
LAMPIRAN		68

KINETIKA BIODEGRADASI 2-METIL-4-KLOR-FENOKSI ASETAT FORMULA OLEH BAKTERI

Ringkasan

Nurhayati, Khairul Anam

KMCPA formula adalah komponen yang toksik dan persisten di alam. Hanya beberapa yang mempunyai mendegradasi KMCPA formula dan menggunakan sebagai sumber karbon dan energi.

Penelitian ini bertujuan menentukan berbagai parameter diantaranya untuk menghitung laju pertumbuhan (μ) bakteri, menentukan konstanta kejenuhan substrat (K_s), menentukan laju biodegradasi (dS/dX), dan menentukan waktu yang diperlukan untuk menentukan biodegradasi KMCPA sebanyak 50% dari konsentrasi mula-mula (DT_{50}).

Penelitian ini dimulai dengan mengisolasi bakteri melalui teknik subkultur menggunakan KMCPA formula sebagai sumber karbon dan energi. Seleksi dan pemurnian bakteri dehalogenasi telah berhasil diisolasi dan pengujian kemampuan pertumbuhan bakteri dilakukan dalam berbagai variasi medium yang berisi : 20 μg KMCPA formula / 100 ml; 40 μg KMCPA formula / 100 ml; 60 μg KMCPA formula / 100 ml; 80 μg KMCPA formula / 100 ml; 100 μg KMCPA formula / 100 ml.

Pertumbuhan bakteri diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan menentukan jumlah koloni yang hidup (CFU). Isolat yang memiliki kemampuan menggunakan KMCPA formula sebagai satu-satunya sumber C diseleksi dan digunakan untuk riset selanjutnya. KMCPA yang terdegradasi dihitung berdasarkan KMCPA yang tersisa di medium dan pengukuran KMCPA menggunakan metode HPLC.

Laju pertumbuhan bakteri (μ) = 0,00436/jam, memiliki konstanta kejenuhan substrat (K_s) = 0,9835 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pada suhu 37° C pH 7. Sel bakteri isolat M yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi KMCPA (dS/dX) = 0,000008 $\mu\text{g}/\text{sel}$ dan waktu yang diperlukan untuk mendegradasi KMCPA sebanyak 50% dari kadar mula-mula (DT_{50}) = 16,43 hari.

THE KINETIC OF BIODEGRADATION OF POTASSIUM-4-CHLORO-2-METHYL PHENOXYACETIC ACID FORMULA (KMCPA FORMULA) BY

BACTERIA

SUMMARY

KMCPA formula is a component which is toxic and persistent in nature. Only some microba have the ability to degrade the KMCPA formula and use it as carbon and energy resources.

The research is aimed to calculate the growth rate (μ) of bacteria, to calculate the substrate saturation constant (K_s), to calculate biodegradation rate (dS/dX), and to calculate the time needed to do the KMCPA biodegradation a mounted to 50% from early concentrate (DT_{50}).

The research begins by isolating the bacteria through subculture technique using KMCPA formula as the carbon and energy resources. The selection and screening of the dehalogenation bacteria isolated is completed and the ability of growth of the results is examined in liquid medium containing: 20 μ g KMCPA formula/100 ml; 40 μ g KMCPA formula/100 ml; 60 μ g KMCPA formula/100 ml; 60 μ g KMCPA formula/100 ml, 80 μ g KMCPA formula/100 ml; 100 μ g KMCPA formula/100 ml).

The growth of the bacteria is observed with the spectrophotometer on the Wave Length 600 nm and viable planting count. The isolate whose growth ability uses KMCPA formula as the only C resources is selected and used for further research. KMCPA formula is measured with HPLC.

The bacteria growth rate (μ) = 0,00436/jam, has substrate saturation constant (K_s) = 0,9835 μ g/ μ l at 37°C pH 7.

The cell bacteria of M isolate has the ability to degrade KMCPA (dS/dX) = 0,000008 μ g/sel, and degradation time 50 (DT_{50}) = 16,43 hari.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur pada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahnya sehingga diperkenankan untuk mempelajari mekanisme gejala alamiah yang Allah ciptakan melalui berbagai fenomena diantaranya fenomena yang terjadi pada penelitian dengan judul kinetika biodegradasi 2-metil-4-klor fenoksi asetet formula telah terselesaikan. Penelitian ini merupakan hasil telaah pustaka dari berbagai sumber dan riset di lapangan untuk mengambil isolat dan riset laboratorium untuk analisis data.

Dengan terselesikan penulisan ini diucapkan terima kasih yang tulus kepada :

1. Direktur Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan kepercayaan untuk menjalankan penelitian.
2. Prof. Dr. IG Riwanto, SPbD. Selaku ketua Lembaga penelitian di Universitas Diponegoro Semarang yang memberikan bimbingan selama monitoring penelitian.
3. Dr. Wahyu Setya Budi, Msi, selaku Dekan MIPA UNDIP yang telah memberikan ijin serta bantuan berbagai fasilitas sehingga penelitian ini berlangsung dengan baik.
4. Bapak Khairul Anam, Msi, Ssi, selaku rekan satu team yang telah membantu menganalisis data, menyusun laporan, memberikan berbagai masukan sehingga penelitian dapat berlangsung dengan baik.
5. Bapak K. tomo atas dukungan dan berbagai bantuan yang diberikan dengan tulus.
6. Bapak Domo, Teknisi Lab. Kimia Organik UGM yang telah memberikan berbagai bantuan sehingga analisis HPLC berjalan baik dan lancar.
7. Indra, ST dan dik mardi atas segala bantuan sehingga berbagai parameter dapat diamati dengan baik.
8. Seluruh pihak yang tidak dapat kami sebut satu persatu.

Akhir kata, mohon kritik dan saran demi perbaikan penulisan laporan penelitian ini. Semoga penelitian yang tertuang dalam penulisan ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Semarang, Oktober 2004.

Penulis

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Konstanta kejenuhan substrat berbagai jenis mikrobia	22
2. Pengaruh Etidiumbromida pada populasi	37
3. Resistensi Alcaligenes dan Pseudomonas terhadap logam berat	38
4. Prosentase biodegradasi KMCPA formula oleh Isolat M di medium BSS; isolat M di medium SBS + <i>yeast extract</i> dan isolat B di medium SBS + <i>yeast extract</i>	42
5. Prosentase KMCPA yang terdegradasi	43
6. Prosentase KMCPA formula terdegradasi pada waktu inkubasi 41 hari	62
7. Kinetika pertumbuhan bakteri M pada medium SBS+KMCPA formula	63

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. <i>Pathway</i> biodegradasi 2,4 D oleh <i>Arthrobacter sp.</i>	8
2. <i>Pathway</i> biodegradasi MCPA oleh <i>Pseudomonas sp.</i>	9
3. <i>Pathway</i> degradasi 2,4,5-T oleh <i>Pseudomonas cepacia</i> AC 1100	12
4. Koloni bakteri dehalogenasi isolat M (merah), B (bening), P (putih)	40
5. Petumbuhan bakteri M dalam medium SBS ditambah KMCPA formula pada konsentrasi berbeda	41
6. Kromatogram hasil biodegradasi bakteri M pada KMCPA formula 44 dengan waktu inkubasi 7 hari	44
7. Kromatogram KMCPA formula dengan bakteri M pada waktu inkubasi 13 hari	45
8. Kromatogram KMCPA formula 20 µg/ 100 ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 16 hari	46
9. Kromatogram KMCPA formula 40 µg/100 ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 7 hari	47
10. Kromatogram KMCPA formula 40µg/100 ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 13 hari	48
11. Kromatogram KMCPA formula 40 µg/100 ml dengan bakteri M waktu inkubasi 16 hari	49
12. Kromatogram KMCPA formula 60 µg/100 ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 13 hari	50
13. Kromatogram KMCPA formula 60 µg/100 ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 16 hari	51
14. Kromatogram KMCPA formula 80 µg/100ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 7 hari	52
15. Kromatogram KMCPA formula 80 µg/100 ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 13 hari	53

16. Kromatogram KMCPA formula 80 $\mu\text{g}/100$ ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 16 hari.....	54
17. Kromatogram KMCPA formula 100 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ dengan bakteri M pada waktu inkubasi 7 hari.....	55
18. Kromatogram KMCPA formula 100 $\mu\text{g}/100$ ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 13 hari.....	56
19. Kromatogram KMCPA formula 100 $\mu\text{g}/100$ ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 16 hari.....	57
20. Kromatogram KMCPA formula 80 $\mu\text{g}/100$ ml dengan bakteri M waktu inkubasi 41 hari pada medium SBS + yeast extract (2).....	58
21. Kromatogram KMCPA formula 80 $\mu\text{g}/100$ ml dengan bakteri M pada waktu inkubasi 41 hari pada medium SBS tanpa <i>yeast extract</i>	59
22. Kromatogram KMCPA formula 80 $\mu\text{g}/100$ ml dengan bakteri M waktu inkubasi 41 hari pada medium SBS + <i>yeast extract</i>	60
23. Kromatogram KMCPA formula 80 $\mu\text{g}/100$ ml dengan bakteri B waktu inkubasi 41 hari pada medium SBS + <i>yeast extract</i>	61

DAFTAR LAMPIRAN

1. Penghitungan nilai DT_{50}
2. Penghitungan nilai K_s
3. Penghitungan laju pertumbuhan spesifik (μ)
4. Penghitungan dS/sX
5. Pertumbuhan bakteri M pada medium SBS + KMCPA formula
6. Biodegradasi KMCPA pada konsentrasi $40 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ dan $100\mu\text{g}/100\text{ml}$
7. Kromatogram standar analitik MCPA
8. Persamaan garis regresi linear antara luas area dan konsentrasi MCPA standar

I. PENDAHULUAN

Senyawa organoklorin adalah bahan yang digunakan untuk berbagai keperluan industri seperti pelarut, pembersih, senyawa kimia untuk industri, pestisida dan bahan pengawet kayu (Morgan et al, 1989). Senyawa organoklorin bersifat rekalsitran (sulit terdegradasi) sehingga apabila masuk ke lingkungan dapat menimbulkan masalah lingkungan. Sifat rekalsitran antara lain ditentukan oleh macam strukturnya. Struktur kimia penyusun organoklorin terdapat substituen klor pada atom C sehingga tahan di lingkungan.

Salah satu senyawa organoklorin yang dipergunakan untuk bahan utama herbisida adalah 2-metil-4-klor fenoksi asetat formula (KMCPA). KMCPA terdiri atas cincin aromatik yang mengikat satu klor. Meski hanya tersubstitusi 1 klor, KMCPA stabil di dalam tanah sampai 48 minggu (1 tahun) (Smith & Aubin, 1991). Kestabilan KMCPA di alam mempunyai potensi terakumulasi sehingga KMCPA dapat menjadi polutan di lingkungan.

Hanya beberapa mikrobia yang memiliki kemampuan untuk meakukan biodegradasi senyawa organoklorin. Mikrobia yang memiliki kemampuan mendegradasi organoklorin khususnya KMCPA umumnya memiliki berbagai enzim yang mengkatalisis reaksi degradasi senyawa toksik tersebut. Salah satu enzim kunci yang ada di dalam mikrobia yang mendegradasi KMCPA adalah dehalogenase. Dehalogenase adalah enzim yang memotong ikatan antara karbon dan halogen. Proses pemotongan ikatan antara karbon dan halogen disebut dehalogenasi. Dehalogenasi akan menghasilkan ion klorida terlepas dari senyawa organoklorin. Mekanisme dehalogenasi pada senyawa kloroaromatik meliputi mekanisme oksidasi, reduksi, hidrolisis (Hagblom, 1992).

Salah satu mikrobia yang mampu melakukan degradasi 2,4,5-T adalah *Pseudomonas cepacia* AC 1100 (Hagblom, 1992). Mikrobia yang memiliki kemampuan mendegradasi 2,4-D adalah *Arthrobacter sp* (Hagblom, 1992). Mikrobia yang memiliki berbagai enzim yang mengkatalisis degradasi 2-metil-4-kloro fenoksi asam propionat (mecoprop) adalah *Alcaligenes denitrificans* (Vanessa dkk, 1997). Kemampuan mikrobia dalam mendegradasi senyawa organoklor dapat digunakan sebagai agensia pembersih lingkungan. Beberapa bakteri memiliki karakteristik spesifik sehingga memiliki kemampuan mendegradasi senyawa dengan struktur kompleks dan sulit terdegradasi (Roelof, 1994).