

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Koleksi sampel

Sampel diambil dari beberapa jenis tanaman legum yaitu kacang tanah (*Arachis hypogea*), kacang panjang (*Vigna sinensis*) dan tanaman penutup pada perkebunan kelapa sawit yaitu *Centrocema pubescent*. Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada 3 daerah dan masing-masing daerah dilakukan 3 pencuplikan dengan 3 ulangan .

4.2. Isolasi *Rhizobium* spp.

Isolasi *Rhizobium* dilakukan dengan mengambil nodul efektif berwarna merah muda. Nodul yang diperoleh disterilisasi permukaan dengan cara mencucinya dengan alkohol 70 % selama 5-10 menit dan disteril permukaan dengan NaClO_3 selama 10 menit. Nodul tersebut dibilas dengan akuades steril sebanyak 6 kali (Martina, 2003). Nodul tersebut dipotong dan bagian tengahnya yang berwarna merah dihancurkan dengan bantuan skalpel dan jarum steril. Jaringan nodul dibuat suspensi dengan penambahan 1 ml akuades steril. Suspensi inokulum diinokulasi pada cawan petri berisi medium selektif untuk *Rhizobium* yaitu Yeast Manitol Agar (YMA) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 2-4 x 24 jam. Isolat yang diperoleh disubkultur. Hal ini dilakukan beberapa kali sehingga diperoleh isolat *Rhizobium* murni.

4.3. Identifikasi *Rhizobium*

Isolat yang tumbuh pada seleksi tahap I, didapat diamati morfologi dan warna koloni serta dilakukan pewarnaan Gram, bakteri *Rhizobium* dicirikan dengan bentuk batang, gembung, pleomorfik dan gram negatif. Identifikasi isolat dilanjutkan dengan uji

biokimia meliputi fermentasi karbohidrat dan penggunaan sumber nitrogen (Holt *et al.*, 1994 ; Prescott dan Harley, 1994).

4.4. Seleksi isolat *Rhizobium* spp pendegradasi herbisida atrazin

Seleksi isolat bakteri murni pendegradasi atrazin dilakukan melalui 2 tahap.

4.4.1. Seleksi Tahap I

Isolat bakteri murni dibuat suspensi dengan larutan fisiologis. Kertas cakram berdiameter 0,5 cm dicelupkan ke dalam suspensi dan ditumbuhkan pada cawan petri berisi medium garam mineral (MS) yang terdiri dari 10 mM K_2HPO_4 ; 3mM NaH_2PO_4 , 1mM $MgSO_4$ dan 10 ml larutan stok bebas klorida dengan komposisi (mg/l) ; $CaSO_4$, 200 ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 200 ; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 20 ; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 ; $CuSO_4$, 20 ; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 ; H_3BO_3 , 2. (de Souza, 1998). Medium MS dimodifikasi dengan penambahan atrazin 5 mg/l. Isolat bakteri yang tumbuh dinyatakan sebagai isolat bakteri terpilih I. Setiap perlakuan isolat dilakukan 3 replikasi.

4.4.2. Seleksi Tahap II

Isolat bakteri terpilih I sebanyak 10^6 sel/ml melalui kertas cakram ditumbuhkan ke dalam medium selektif II berupa medium MS dengan penambahan atrazin 100 mg/l dan Bromothymol blue 20 mg/l. Kultur diinkubasi pada suhu 28°C sampai tampak pertumbuhan koloni bakteri disekitar kertas cakram. Degradasi atrazin oleh *Rhizobium* ditandai dengan terbentuknya zona perubahan warna dari biru menjadi kuning disekitar kertas cakram. Pada zona perubahan warna diukur diameternya untuk mengetahui tingkat kemampuan *Rhizobium* spp mendegradasi atrazin. Setiap perlakuan isolat dilakukan 3 replikasi. Perubahan zona warna yang terbentuk diukur diameternya setiap hari sampai hari ke delapan.

4.5. Analisis Data

Kemampuan degradasi dan pertumbuhan isolat *Rhizobium* sp dari *V. sinensis*, *A. hyogea* dan *C. pubescent* dianalisis berdasarkan perhitungan median yang dibagi atas tinggi, sedang dan rendah

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Morfologi Bakteri *Rhizobium* sp.

Isolat *Rhizobium* sp yang tumbuh pada seleksi pertama terdapat 29 isolat. Morfologi koloni isolat yang ditumbuhkan dalam medium Agar Manitol Ekstrak khamir terdapat pada Gambar 3.



Gambar 3. Morfologi *Rhizobium* sp pada medium YMA diinkubasi 5 hari

Isolat *Rhizobium* yang tumbuh pada medium YMA berbentuk bulat dengan tepi rata, diameter antara 2-6 cm, warna putih susu semi translusen, mengkilat, elevasi cembung dengan permukaan licin. Hal ini sesuai dengan pendapat Usman (1983) dan Holt *et al.*, (1994) bahwa karakteristik koloni *Rhizobium* sp pada medium YMA adalah koloni bulat, permukaan licin, berlendir, agak bening, tepinya rata dan diameter 1 - 4 mm pada inkubasi 3 - 5 hari.

Pada pewarnaan Gram, bakteri *Rhizobium* sp merupakan bakteri gram negatif, berwarna merah muda dan bersifat pleomorfik dengan bentuk basil, kokus dan kokoid (Gambar 4.). Holt *et al.*, (1994) menyatakan bahwa bakteri *Rhizobium* sp adalah bakteri batang, umumnya bersifat pleomorfik dengan ukuran lebar 0,5 - 0,9 μm dan panjang 1,2 - 3 μm .



Gambar 4. Morfologi *Rhizobium* sp dengan pewarnaan Gram (600 X).

5.2. Seleksi Bakteri Pendegradasi Herbisida Atrazin pada medium MS I

Pada seleksi I terdapat 22 isolat yang mampu tumbuh pada medium mengandung atrazin dengan konsentrasi 5 mg/l.(Tabel 1)

Tabel 1. Kemampuan hidup isolat *Rhizobium* pada medium MS I pada inkubasi 7 hari.

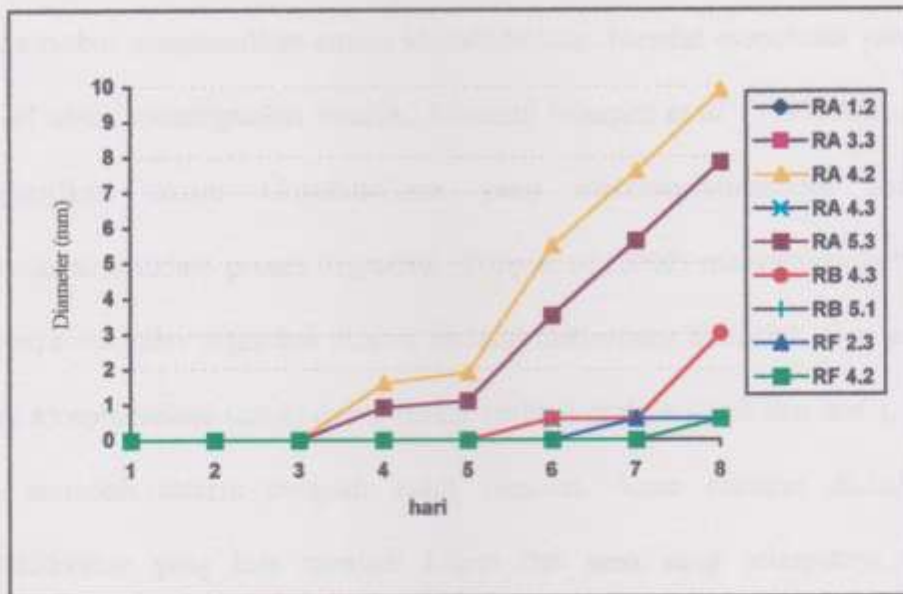
No	Isolat	Kemampuan hidup
1	RA 1.1	+++
2	RA 1.2	++++
3	RA 2.3	+++
4	RA 3.3	+++
5	RA 4.2	+++
6	RA 4.3	++
7	RA 5.3	+++
8	RF 1.1	+++
9	RF 1.2	++
10	RF 1.3	++
11	RF 2.1	++
12	RF 2.2	+++
13	RF 2.3	++++
14	RF 3.1	++
15	RF 3.2	++
16	RF 3.3	+
17	RF 4.1	+++
18	RF 4.2	+++
19	RF 4.3	+++
20	RF 5.1	++
21	RF 5.2	++
22	RF 5.3	++

Keterangan : RA : Isolat *Rhizobium* sp dari *V. sinensis*
RB : Isolat *Rhizobium* sp dari *A. hypogea*
RF : Isolat *Rhizobium* sp dari *C. pubescent*
+ : sedikit
++ : cukup
+++ : banyak
++++ : sangat banyak

Isolat yang mampu tumbuh pada medium I merupakan isolat yang mampu beradaptasi pada medium mengandung 5 mg/l atrazin sebagai satu-satunya sumber karbon dan nitrogen. Proses metabolisme atrazin ini menghasilkan energi dan N untuk pembentukan protein yang dapat dimanfaatkan untuk pertumbuhannya. Menurut Bollag dan Bollag (1992) hasil utama pada jalur metabolisme daiani proses biodegradasi adalah berupa energi yang dapat dimanfaatkan oleh mikroba untuk pertumbuhannya.

5.3. Degradasi Herbisida Atrazin oleh *Rhizobium* sp.

Kemampuan isolat *Rhizobium* sp. mendegradasi herbisida atrazin dapat dilihat pada Gambar 5.

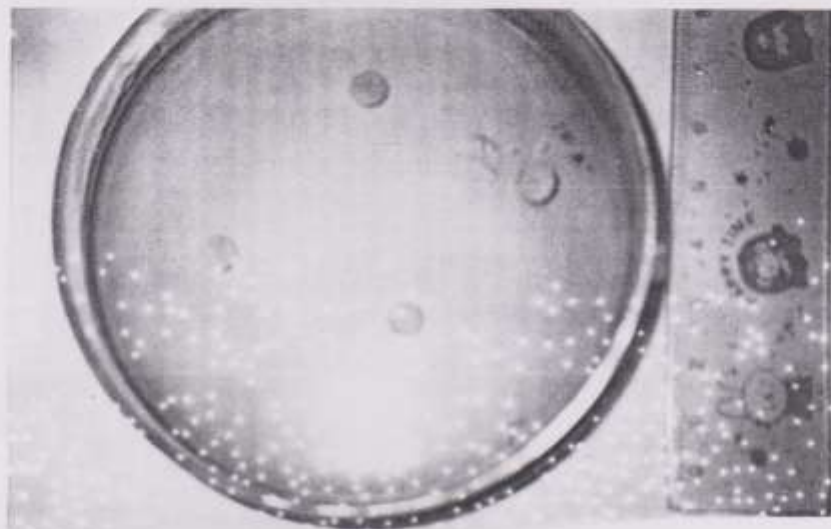


Gambar 5. Diameter zona warna (mm) *Rhizobium* spp isolat lokal pada medium MS II diinkubasi 8 hari pada suhu kamar.

Pada medium dengan konsentrasi atrazin 10 mg/l , hanya 9 isolat yang mampu tumbuh dan membentuk zona perubahan warna yaitu RA 1.2, RA 3.3, RA 4.2, RA 4.3, RA 5.3, RB 4.3, RB 5.1, RF 2.3 dan RF 4.2.. Ketiga belas isolat lainnya ternyata tidak mampu tumbuh pada medium dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Hal ini berarti isolat tersebut tidak mampu mendegradasi atrazin pada konsentrasi 10 mg/l. Konsentrasi atrazin yang meningkat dapat menghambat pertumbuhan sel. Selain itu, aktivitas bakteri mendegradasi herbisida dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemampuan bakteri beradaptasi, daya degradasi dan kadar herbisida.

Isolat yang mampu tumbuh dan mendegradasi atrazin pada konsentrasi yang lebih tinggi menunjukkan kemampuannya tinggi dalam menguraikan atrazin sehingga mampu

memanfaatkan sumber karbon dan nitrogen pada atrazin tersebut. Transformasi enzimatik yang tinggi ini dapat dilihat dengan terbentuknya zona perubahan warna pada medium yang mudah dibedakan. (Gambar 6). Kemampuan isolat menggunakan atrazin disebabkan isolat tersebut menghasilkan enzim klorohidrolase bersifat eksoenzim yang disekresikan oleh sel untuk mendegradasi atrazin. Menurut Bouqard *et al.* (1997) *Rhizobium* sp dapat menghasilkan enzim klorohidrolase yang mentransformasikan atrazin menjadi hidroksiatrazin dalam proses degradasi. Topp *et al* (2000) menyatakan bahwa bakteri ini umumnya memulai degradasi atrazin melalui deklorinasi hidrolitik. Gen yang mengkode atrazin klorohidrolase (*atzA*) dan 2 reaksi amidohidrolitik (*atzB* dan *atzC*), akan bersama-sama merubah atrazin menjadi asam sianurat. Asam sianurat diubah oleh enzim amidohidrolase yang lain menjadi biuret dan urea yang selanjutnya dimineralisasi. Selanjutnya dari penelitian Topp *et al.* ternyata beberapa isolat bakteri pendegradasi atrazin dari famili Rhizobiaceae yang mengandung *atzABC* mampu dengan sempurna memineralisasi atrazin menjadi CO₂. Kelima atom N yang terdapat pada atrazin digunakan untuk pertumbuhan.



Gambar 6. Zona perubahan warna oleh isolat RA 4.2.pada medium MS II pada suhu kamar

Isolat RA 4.2. memiliki zona perubahan warna yang paling tinggi dan tercepat dengan diameter 9,89 pada inkubasi 8 hari. Zona perubahan warna sudah terbentuk pada hari ke 4. Hal ini disebabkan aktivitas enzim klorohidrolasanya lebih tinggi daripada isolat lain sehingga isolat RA4.2 dapat memutuskan gugus Cl dari atrazin lebih cepat dan dimanfaatkan sebagai satu-satunya sumber karbon dan nitrogen .

Isolat RA 1.2, RA 3.3, RB 5.1, RF 2.3 dan RF 4.2 merupakan isolat dengan zona perubahan warna yang paling rendah dan pembentukan zona terjadi pada hari ke 8. Hal ini mungkin disebabkan aktivitas enzim klorohidrolase yang rendah, konsentrasi atrazin yang lebih tinggi dapat menyebabkan aktivitas kerja enzim tidak optimal atau isolat membutuhkan waktu yang lebih lama untuk beradaptasi.

