

## KEMAMPUAN TUMBUH *PSEUDOMONAS PUTIDA* STRAIN 071 PADA MEDIUM DIAZINON

**Isna Rasdianah Aziz\***

\*) Dosen Pada Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi  
UIN Alauddin Makassar  
email : [isna.rasdianah@gmail.com](mailto:isna.rasdianah@gmail.com).

**Abstract:** *Diazinon is an organophosphate pesticide used by farmers in increasing agricultural production because it's ability to control various pests. Excessive diazinon has potential as a pollutant in the environment. It residues are not soluble in water and difficult degraded. Also diazinon is toxic. This is a fatal effect on non target's body. This research aims to study and test the growth ability Pseudomonas putida strain 071 in medium containing 0.5% diazinon substrate. This study begins with the purification of Pseudomonas putida strain 071 isolates with scratch techniques. The growth ability tested through growth experiments using liquid basal medium containing 0.5% diazinon. Each interval of time, the growth observed using spectrophotometry ( $A = 620\text{nm}$ ).*

*The results obtained that the Pseudomonas putida 071 were able to grow in liquid basal medium containing diazinon. The splitting speed containing diazinon is 0,197 and 0,187 without diazinon. Generation time of Pseudomonas putida 071 use diazinon 5.2 hours and 5.4 hours without diazinon. Pseudomonas putida 071 that grow in liquid basal medium containing diazinon showed that diazinon residues can be used by this bacteria as a growth substrate. This bacteria has potential as pesticide degrading agents that can be used as a biopesticide active ingredients.*

**Key words:** *Diazinon, Pesticide, Pseudomonas putida.*

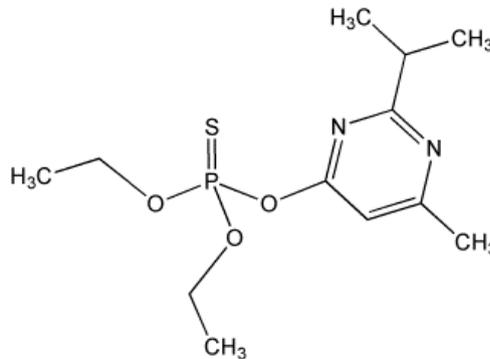
### I. PENDAHULUAN

Diazinon adalah jenis pestisida organofosfat yang banyak digunakan oleh para petani dalam peningkatan produksi pertanian dan pengawetan hasil hutan. Pestisida tersebut memiliki kemampuan untuk mengendalikan berbagai jenis hama, seperti serangga, kutu daun, kecoa, dan ngengat (Kegley *et al*, 2005). Diazinon yang berlebihan di dalam tanah, mempunyai potensi sebagai polutan di lingkungan karena sifat residu pestisida tersebut yang tidak mudah larut dalam air. Salah satu alternatif dalam pengendalian penggunaan hama adalah penggunaan biopestisida, yaitu dengan menggunakan musuh alami serangga hama untuk mengurangi kepadatan populasi. Salah satu organisme yang sering dipakai sebagai sumber biopestisida adalah mikrobia (Montesinos, 2003). Hanya beberapa

mikrobia yang mampu menggunakan pestisida tersebut sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan. Bakteri tanah khususnya *Pseudomonas* sp mampu mendegradasi diazinon karena memiliki enzim yang berperan dalam proses tersebut. Oleh karena itu, bakteri tersebut dapat dipertimbangkan untuk dimanfaatkan sebagai agensia pendegradasi pestisida diazinon (Best *et al*, 1985; Lei *et al*, 2005).

#### **A. Diazinon dan Sifat Karakteristik**

Diazinon (dietil-2-isopropil-4-metil-6-pirimidil fosforotioat) merupakan salah satu jenis senyawa organik sintetik golongan organofosfat yang paling banyak digunakan untuk mengendalikan hama serangga dan arthropoda lain. Diazinon bersifat racun aktif yang berbahaya. Jenis molekul kimia penyusun diazinon adalah tiofosfat (Hassal, 1990; Aydin and Köprücü, 2005). Diazinon pada umumnya berbentuk cairan berwarna merah kecoklatan, sedikit larut dalam air, mudah teroksidasi dan terdekomposisi pada temperatur tinggi, terhidrolisis cepat dalam asam kuat dan kondisi basa. Struktur kimia diazinon adalah  $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$  (Gambar 1) dengan berat molekul 304,35 dan titik didih 83-84°C (Natawigena, 1985). Nama kimia diazinon 0,0-dietil 0-isopropil 1-6 piriminil fosforotiat dengan nama dagang basudin, diazajet, diazol, dazzel, diagan, dassitox dan Gardentox (Sudarmo, 1992).



Gambar 1. Rumus bangun diazinon (Mc Ewen and Stephenson, 1979)

Diazinon dapat terabsorpsi melalui saluran pencernaan, pernapasan dan kulit (Casareff and Doull, 1979). Dalam jaringan hewan dan tumbuhan, diazinon dikonversikan menjadi diaxoxon yang aktif ( $C_{12}H_{21}N_2O_4P$ ) tetapi mudah terhidrolisis (Mc Ewen and Stephenson, 1979). Berdasarkan keputusan Departemen Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 1996, kadar maksimum residu diazinon untuk berbagai komoditas pangan adalah sebesar 0,1-0,7 mg/kg. Kadar tersebut sering melebihi kadar maksimum yang telah ditetapkan, sehingga mengakibatkan dampak yang tidak diinginkan (Yuda *et al*, 2005).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa degradasi diazinon dapat terjadi melalui hidrolisis yang dikatalisis enzim khusus menjadi senyawa yang lebih sederhana oleh beberapa jenis bakteri antara lain *Anthrobacter* sp, *Flavobacterium* sp dan *Pseudomonas* sp (Brown, 1988). *Flavobacterium* sp mampu mendegradasi diazinon secara langsung sebagai sumber karbon dan energi, sedangkan *Pseudomonas* sp, *Arthrobacter* sp dan *Corynebacterium* sp tidak mampu menggunakan diazinon langsung tetapi melalui kometabolisme. *Streptomyces* sp dan *Arthrobacter* sp bekerja sama dalam menggunakan diazinon melalui sinergisme (Kanekar *et al*, 2004).

Bakteri antagonis patogen maupun non patogen merupakan sumber bahan aktif biopestisida alternatif untuk pengendalian hama dan penyakit tanaman. *Pseudomonas putida* merupakan bakteri antagonis non patogen yang memiliki peranan penting dalam dekomposisi, biodegradasi, dan siklus karbon dan nitrogen (Kegley *et al*, 2005). Kedua bakteri ini termasuk dalam famili Pseudomonadaceae. Bakteri tersebut banyak ditemukan pada air, tanah dan khususnya pada daerah rhizofeora tanaman yang kadang kala membantu proses pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman (Kenneth, 2005).

Berdasarkan latar belakang penelitian dan tinjauan pustaka, permasalahan yang perlu diteliti adalah residu diazinon yang bersifat toksik, apakah dapat digunakan sebagai substrat pertumbuhan *Pseudomonas putida* strain 071. Tujuan penelitian adalah menguji kemampuan tumbuh *Pseudomonas putida* strain 071 pada medium yang mengandung substrat 0,5% diazinon.

## II. METODE PENELITIAN

### Purifikasi *Pseudomonas putida* strain 071

Purifikasi isolat dilakukan dengan menggunakan teknik koloni sel tunggal (Soetarto, 1985). Satu ose kultur padat digoreskan merata pada permukaan medium agar yang mengandung 6 ml/L diazinon dan diinkubasikan pada suhu 37°C sampai terjadi pertumbuhan. Tiap hari koloni yang tumbuh diamati. Koloni yang tumbuh terpisah sepanjang goresan terutama pada akhir ujung goresan diambil sebagai kultur murni dan dipindahkan pada medium nutrisi agar miring untuk percobaan lebih lanjut.

Percobaan kultivasi bakteri pada medium cair yang ditambah diazinon

Uji kemampuan tumbuh *Pseudomonas putida* strain 071 pada medium cair dilakukan melalui percobaan kultivasi sebagai berikut:

### 1. Penyiapan inokulum

Kultur bakteri muda (24-48 jam) yang tumbuh pada nutrisi agar miring yang mengandung diazinon diambil dan ditumbuhkan pada 100 mL nutrisi cair yang diberi 6 ml/L diazinon, diinkubasikan pada suhu kamar sampai terjadi pertumbuhan. Kultur tersebut digunakan sebagai inokulum.

### 2. Percobaan pertumbuhan isolat *Pseudomonas putida* strain 071

Kultur cair yang telah disiapkan diambil sebanyak 10 ml secara aseptis, diinokulasikan masing-masing ke dalam 90 mL medium basal cair yang mengandung 0,5% diazinon dan tanpa diazinon sebagai kontrol, diinkubasikan di atas shaker pada suhu kamar. Tiap interval waktu tertentu (24 jam), pertumbuhan diukur berdasarkan kekeruhan ( $A = 620 \text{ nm}$ ). Kerapatan sel pada kekeruhan (UD) tertentu dihitung berdasarkan jumlah sel menggunakan teknik taburan pada media sesuai. Data yang diperoleh kemudian ditabulasikan untuk membuat kurva pertumbuhan, menentukan kecepatan pertumbuhan, dan waktu generasi. Persamaan yang digunakan dalam pengukuran pertumbuhan adalah sebagai berikut:

a. Jumlah generasi ( $n$ ):

$$n = \frac{\log Nt - \log No}{0,301}$$

b. Konstanta rerata laju pertumbuhan ( $k$ )

$$k = \frac{n}{t}$$

$$k = \frac{\log Nt - \log No}{0,301 t}$$

c. Waktu generasi ( $g$ )

$$g = \frac{1}{k}$$

d. Kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ )

$$\mu = 0,69 k$$

dengan  $t$  : waktu pertumbuhan

$No$ : populasi bakteri awal I mula-mula .

$Nt$  : populasi bakteri akhir

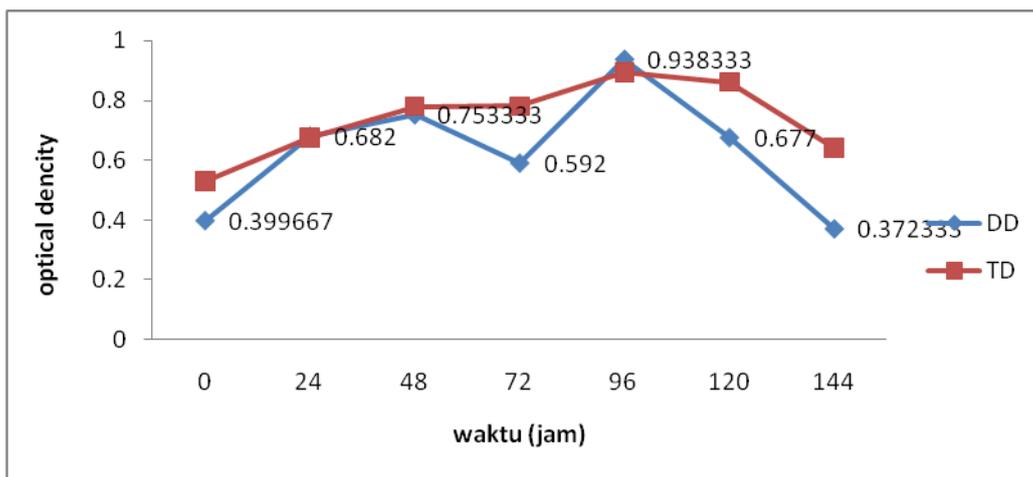
### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Purifikasi

*Pseudomonas putida* strain 071 yang tumbuh pada medium agar yang mengandung diazinon menunjukkan koloni yang kecil, tepinya tidak rata, permukaan koloni licin dan berwarna kehijau-hijauan. *Pseudomonas putida* 071 mampu menghasilkan pigmen flourouscen pyoverdin, sehingga menyebabkan perubahan warna pada medium (Kenneth, 2005).

#### B. Kemampuan tumbuh bakteri pada media basal cair

Kemampuan tumbuh *Pseudomonas putida* 071 diuji melalui percobaan kultivasi pada medium cair. Pertumbuhan bakteri tersebut terjadi setelah 48 jam inkubasi. Kekeruhan kultur cair merupakan hasil perkembangbiakan bakteri. Pertumbuhan *Pseudomonas putida* 071 mempunyai pola pertumbuhan yang terjadi pada umumnya (Gambar 2).



**Gambar 2.** Pertumbuhan *Pseudomonas putida* 071 dalam medium basal cair yang mengandung diazinon (▲) dan tanpa diazinon (■)

*Pseudomonas putida* 071 pada medium tanpa/dengan diazinon langsung memasuki fase pertumbuhan eksponensial dan tumbuh maksimal setelah mencapai 96 jam (Gambar 2). Setelah itu mengalami fase stationer. Pada fase stationer, bakteri mempertahankan diri dan cekaman lingkungan dengan memproduksi suatu senyawa, sehingga masih tetap bertahan hidup.

Pada medium yang mengandung diazinon dan tanpa diazinon, *Pseudomonas putida* 071 mampu tumbuh dengan waktu generasi dan kecepatan membelah yang berbeda (Tabel 1).

Tabel 1. Pengukuran konstanta laju pertumbuhan (k), waktu generasi (g) dan kecepatan tumbuh spesifik ( $\mu$ ) *Pseudomonas putida* 071 pada medium basal cair yang mengandung substrat diazinon (DD) dan tanpa diazinon (TD)

Isolat	Perlakuan	k	g (jam)	$\mu$
<i>Pseudomonas putida</i> strain 071	TD	0,187	5,4	0,130
	DD	0,194	5,2	0,134

Dari tabel 1, dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan lama waktu generasi dan kecepatan tumbuh bakteri *Pseudomonas putida* strain 071 pada medium cair yang mengandung diazinon dan tanpa diazinon. Bakteri tersebut menunjukkan kecepatan membelah dan waktu generasi yang lebih cepat pada medium diazinon (DD). Waktu generasi yang ditunjukkan oleh *Pseudomonas putida* 071 pada medium yang diberi diazinon adalah 5,2 jam dengan kecepatan membelah 0,134, sedangkan tanpa diazinon memiliki waktu generasi 5,4 jam dengan kecepatan membelah 0,130. Bakteri tersebut memiliki waktu generasi yang cepat karena memiliki kemampuan untuk dapat tetap hidup pada kondisi ekstrim, dimana hanya beberapa mikrobial saja yang dapat toleran (Kenneth, 2005).



**Gambar 3.** Morfologi sel *Pseudomonas putida* strain 071 (A) yang tumbuh pada medium basal cair yang mengandung 0,5 % diazinon setelah 144 jam inkubasi dengan pengecatan gram (Perbesaran 10x100)

Pertumbuhan *Pseudomonas putida* pada medium yang mengandung diazinon menandakan bahwa bakteri tersebut dapat mendegradasi residu diazinon dengan menggunakannya sebagai sumber karbon dan energi untuk proses

pertumbuhannya. Kedua bakteri tersebut berpotensi sebagai agen biopestisida untuk mengatasi dampak pencemaran lingkungan akibat pemakaian bahan kimia yang bersifat toksik.

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *Pseudomonas putida* strain 071 mampu tumbuh pada medium cair yang mengandung 0,5% diazinon sebagai sumber karbon dengan waktu generasi (g) masing-masing 5,2 jam dan kecepatan tumbuh ( $\mu$ ) 0,134 jam.

#### V. SARAN

Kemampuan *Pseudomonas putida* strain 071 sebagai pendegradasi diazinon perlu diteliti lebih lanjut, terutama dalam skala besar dan konsentrasi diazinon yang maksimal.

#### DAFTAR RUJUKAN

- Aydin, R and Köprücü, K, 2005. Acute toxicity of diazinon on the common carp embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 82 (2005): 220-225
- Best, D.J., Jones, J and Starfford, D. 1985. *Biotechnology, Principles and Application*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. London. p: 107-108
- Brown, A.W.A. 1988. *Ecology of Pesticides*. John Wiley and Sons. New York. p:52
- Casarett, L.J and J.Doul. 1979. *Toxicology, The Basic Science of Poisons*. Mac Millan Publishing Co.Inc. New York. p: 365-367
- Hassall, K.A. 1990. *The Biochemistry and Uses of Pesticides*. 2' ed. Mac Millan Press Ltd. London
- Kanekar, P., Bhadbhade, B., Deshpande, N. M and Ssarnaik, S. 2004. Biodegradation of Organophosphorus Pesticides. *Proc. Indian natn Sci Acad. B70* (1): 57-70
- Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme, S and Choi, A.H. 2005. Diazinon, Identification, Toxicity, Use, Water Polution Potential, Ecology Toxicology, and Regulatory Information. *PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network* (<http://www.pesticideinfo.org>, diakses 2005)

- Kenneth, T. 2005. *Pseudomonas and Related Bacteria*. <http://www.edpsciences.org/> Februari 2006
- Lei. Yu., Mulchandani, P., Chen, W and Mulchandani, A. 2005. Direct Determination of p-Nitrophenyl Substituent Organophosphorus Nerve Agents Using a Recombinant *Pseudomonas putida* JS444-Modified Clark Oxygen Electrode. *J. Agric: Food Chem* 53 (3): 524-527
- Mc Ewen, F.L and G.R.Stephenson. 1979. The Use Significance of Pesticides in The Enviroment. John Wiley and Sons. New York. p: 179-182
- Montesinos, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int Microbiol* 6: 245-252
- Natawigena, H. 1985. *Pestisida dan Penggunaannya*. Cetakan II. CV.Armico. Bandung. hal 2-4
- Sudarmo, S. 1992. *Pestisida Untuk Tanaman*. Kanisius. Yogyakarta. hal 19; 33
- Yuda, P., Kuncoro, A.J dan Aida, Y. 2005. *Residu Diazinon*. (<http://www.deptan.go.id>, diakses Februari2006)