



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

KARAKTERISASI BAKTERI ENDEMIK PEMFIKSASI NITROGEN PADA RHIZOSFIR *Tithonia diversifolia* DALAM MENDEGRADASI GLIFOSAT

SKRIPSI



**MEGA TRI INDAH PERMATA SARI
1910212068**

**JURUSAN AGROEKOTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2015**

**KARAKTERISASI BAKTERI ENDEMIK PEMFIKSASI NITROGEN
PADA RHIZOSFIR *Tithonia diversifolia* DALAM MENDEGRADASI
GLIFOSAT**

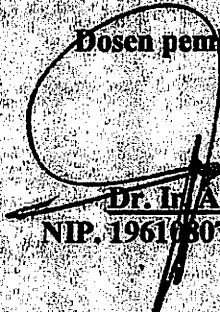
SKRIPSI

OLEH

**MEGA TRI INDAH PERMATA SARI
0910212068**


MENYETUJUI:

Dosen pembimbing 1




Dr. Ir. Agustian
NIP. 196106071986031006

Dosen Pembimbing 2



Ir. Lusi Maira, M. Agr. Sc.
NIP. 196405281990032001

**Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Andalas**




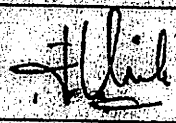
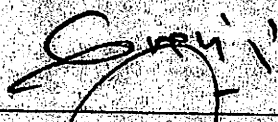


Prof. Ir. H. Ardi, MSc
NIP. 195312161980031004

**Ketua Program Studi Agroekoteknologi
Fakultas Pertanian
Universitas Andalas**



Dr. Jumsu Trisno, SP, MSi
NIP. 196911211995121001

Skripsi ini telah diuji dan dipertahankan di depan Sidang Panitia Ujian Sarjana
Fakultas Pertanian Universitas Andalas, pada tanggal 29 Januari 2015

No	NAMA	TANDA TANGAN	JABATAN
1	Dr. Ir. Teguh Budi Prasetyo, MS		Ketua
2	Ir. Oktanis Emalinda MP		Sekretaris
3	Dr. Gusmini, SP, MP		Anggota
4	Dr. Ir. Agustian		Anggota
5	Ir. Lusi Maira, M. Agr.Sc		Anggota

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan Nama Allah Yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang

"Manjadda wajadda (barang siapa yang bersungguh-sungguh pasti akan mendapatkannya)"

"Sebenarnya, Al Qur'an itu adalah ayat-ayat yang nyata didalam dada orang-orang yang diberi ilmu. Dan tidak ada yang mengingkari ayat-ayat kami kecuali orang-orang yang zalim"
(QS: Al' Ankabut; 49)

Sesungguhnya Allah maha tau dan dialah pemilik semua ilmu
Syukurku tak hingga padamu ya Allah
Atas nikmat iman dan islam serta kemudahan yang telah engkau berikan
Beri aku kemampuan untuk mengamalkan ilmuku ya Allah
Sehingga bisa berguna sebagaimana mestinya.
Subhanallah...

Supersambahkan karya kecil ini untuk orang-orang tercinta.

Teristimewa kepada kedua orang tuaku papa Yusman dan mama Yulha Tri Wati (yang telah penuh kasih sayang selalu mendampingi untuk masa depan yang lebih baik). Terima kasih atas support dan bantuannya untuk kakak ku Dessy Indah Permata Sari S.Pd dan abang ipar Hendri Syam, Abangku satu-satunya Harry Iswandi S.Pd dan kakak ipar Novelia Herlianti S.Pd dan terima kasih buat my twin yang selalu menemani di labor dan dikampus

Makasih buat papa Tarniri dan mama Ernawati S. yang slalu membantu n memberikan support dr awal masuk kuliah sampai tamat. makasih juga buat Kk Erni Yunita SP dan bg Hendri Zal. Buat Fahru Gunardi, My Husband si ahli komputer makasih atas semua bantuannya sayang.

Terima kasih Teruntuk

Pembimbingku bapak Dr. Ir. Agustian dan Ibunda Ir. Lusi Maira, M. Agr. Sc. Atas bimbingan, diskusi dan arah yang telah diberikan. Maafkan atas kesalahan mega baik disengaja maupun tidak sengaja selama proses bimbingan ya bapak dan ibunda. Tak lupa mega ucapkan terima kasih kepada dosen dan pegawai fakultas pertanian.

For Aget Makasih buat teman satu team dalam penelitian yang slalu membantu Parwanto SP dan Chainn Nisa SP. Makasih buat cici, selly, yesni dan Kk fina yang slalu menemani di lab. "Kk fina akhirmyo wak samo juo wisuda KK" dan seluruh teman-teman agro 09 yang tak bisa disebutkan namanya satu persatu serta aget angkatan 08,010,011,012 makasih support dan bantuannya.

For BF KKN makasih Selfia Anwar S.St, Yulian Sharah S.Pt, Rima Handayani S.H dan Risa Sundari S.Ip (akhirmyo samo juo wak wisuda puk..)

*For CR_v Team Padang kk hafidz n kk fita makasih akak atas nasihatnyo.
Terakhir terimalah karya tulis ini sebagai bentuk dedikasi*

BIODATA

Penulis dilahirkan di Padang, Sumatera Barat pada tanggal 03 Mei 1991 sebagai anak ketiga dari empat bersaudara, dari pasangan Yusman dan Yulna Tri Wati. Pendidikan Sekolah Dasar (SD) ditempuh di SD Kartika 1-11 Padang (1997 - 2003). Sekolah Menengah Pertama (SMP) ditempuh di SMP Negeri 9 Padang (2003 - 2006). Kemudian dilanjutkan dengan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 15 Padang (2006 - 2009). Pada tahun 2009 penulis diterima di Fakultas Pertanian Universitas Andalas Program Studi Agroekoteknologi, Padang.

Padang, April 2015

MTIPS

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, dengan mengucapkan puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga Penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“KARAKTERISASI BAKTERI ENDEMIK PEMFIKSASI NITROGEN PADA RHIZOSFIR *Tithonia diversifolia* DALAM MENDEGRADASI GLIFOSAT”**.

Penulisan skripsi ini adalah untuk memenuhi sebagian dari syarat-syarat guna mencapai gelar Strata-1 (S1) pada Jurusan Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Penelitian ini terlaksana dengan menggunakan dana penelitian Hibah Fundamental Dikti yang diterima Dr. Ir. Agustian selaku pembimbing I. Ucapan terima kasih saya tujukan kepada Bapak Dr. Ir. Agustian dan Ibu Ir. Lusi Maira, M.Agr.Sc. atas segala petunjuk, arahan dan bimbingan yang diberikan selama penulisan skripsi ini. Semua Dosen Agroekoteknologi yang telah memberi ilmu yang bermanfaat kepada penulis. Bapak, Ibu dan saudaraku yang telah memberikan kasih sayang, do'a dan dukungannya yang tiada henti. Serta semua pihak yang telah memberikan bantuan dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulis menyadari jika didalam skripsi ini masih jauh untuk dikatakan sempurna. Untuk itu penulis sangat mengharapkan masukan atau koreksi dari semua pihak yang nantinya dapat digunakan sebagai acuan dan bahan pertimbangan demi kelengkapan skripsi ini.

Padang, April 2015

MTIPS

KARAKTERISASI BAKTERI ENDEMIK PEMFIKSASI NITROGEN PADA RHIZOSFIR *Tithonia diversifolia* DALAM MENDEGRADASI GLIFOSAT

Abstrak

Penelitian mengenai “Karakterisasi Bakteri Endemik Pemfiksasi Nitrogen Pada Rhizosfir *Tithonia diversifolia* Dalam Mendegradasi Glifosat” telah dilakukan pada bulan April sampai Oktober 2014 di Laboratorium Biologi Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas Padang. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri endemik pada rhizosfir titonia yang dapat mendekomposisi glifosat tetapi juga mampu melakukan fiksasi N dan untuk mengetahui kondisi terbaik bagi pertumbuhan rhizobakteria pemfiksasi N serta aktifitasnya dalam dekomposisi glifosat. Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 ulangan.

Hasil penelitian didapatkan tiga isolat rhizobakteria dari rhizosfir Titonia yakni Isolat 1, Isolat 2 dan Isolat 12 mampu melakukan aktivitas fiksasi N dan mendegradasi glifosat secara optimum pada media pH 6,0 dan mampu berkembang dengan baik pada media dengan menggunakan sumber karbon dekstroza. Pada pengujian suhu kondisi optimum bagi pertumbuhan isolat bakteri untuk Isolat 1 dan Isolat 2 adalah 25°C sedangkan pada Isolat 12 adalah 20°C. Hasil pengujian dengan berbagai macam sumber karbon ternyata pertumbuhan ketiga isolat bakteri terbaik terdapat pada media dengan sumber karbon dekstroza. Pengujian kemampuan rhizobakteria dalam degradasi glifosat pertumbuhan bakteri pada media B (tanpa C dan N) lebih tinggi dibandingkan media lain. Kandungan fosfor dalam media sangat mempengaruhi ketiga isolat bakteri dalam menggunakan sumber karbon dan N dari glifosat.

Kata kunci : bakteri, fiksasi N, degradasi, glifosat

CHARACTERIZATION OF ENDEMICALLY N FIXING BACTERIA AT RHIZOSPHERE OF *Tithonia diversifolia* IN DEGRADING GLYPHOSATE

Abstract

A research on “Characterization of Endemically N Fixing Bacteria rhizosphere of *Tithonia diversifolia* In degrading Glyphosate” was conducted in the Laboratory of Soil Biology, Faculty of Agriculture, University of Andalas, Padang from April to October 2014. This research aimed to get the endemic bacterial isolates at of that could decompose glyphosate and also able to fix N, then to know the best conditions for growth of rhizobacteria fixing N and the activity in the decomposition of glyphosate. Method used in this research random (ral) a complete with make-up 3. The results of the study showed that there were three isolates of rhizobacteria at rhizosphere of *tithonia* namely isolates 1, isolate 2 and isolate 12 which successfully grew and degraded glifosat with in malic acid um at pH 6. The optimum temperature for growth of the 3 isolates was found at 25°C for isolates 1 and isolates 2, while for isolate 12 the optimum temperature was 20°C. Based on the medium used dextrose C source gave best growth for isolates. Rhizobacteria cultural in C and N removed malic acid glyphosate showed the best in degrading. The content of phosphorus in the media greatly affected all the three isolates of the bacteria in using the C and N source of glyphosate.

Keywords : *bacteria, N fixation, degradation, glyphosate*

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBARAN PENGESAHAN	i
BIODATA.....	ii
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Pada Rhizosfir Titonia.....	4
B. Fiksasi Nitrogen.....	5
C. Biodegradasi Glifosat dalam Tanah.....	6
D. Penggunaan Glifosat dan Dampaknya Terhadap Lingkungan.....	8
BAB III. BAHAN DAN METODA.....	10
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	10
B. Bahan dan Alat.....	10
C. Pelaksanaan Penelitian.....	10
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
A. Hasil Analisis Sifat Kimia Tanah Rhizosfir Titonia.....	15
B. Hasil Pengujian Bakteri Resisten Glifosat.....	16
C. Hasil Pengujian Isolat Pendegradasi Glifosat Yang Mampu Memfiksasi Nitrogen.....	18
D. Pengujian Kemampuan Rhizobakteria Dalam Degradasi Glifosat.....	20
E. Pengujian Pengaruh pH Media Kultur Terhadap Pertumbuhan Isolat Rhizobakteria.....	23
F. Pengujian Pengaruh Variasi Temperatur Terhadap Pertumbuhan	

Isolat Rhizobakteria Dalam Media Malic Acid Mengandung Glifosat 14,4 mg/ml.....	24
G. Hasil Pengujian Pengaruh Beberapa Sumber Karbon Terhadap Pertumbuhan Rhizobakteria.....	25
BAB V. PENUTUP.....	27
A. Kesimpulan	27
B. Saran	27
RINGKASAN.....	28
DAFTAR PUSTAKA.....	30

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Sifat dan ciri kimia sampel tanah rhizosfir <i>Tithonia diversifolia</i>	15
2	Pengaruh laju pertumbuhan bakteri pemfiksasi nitrogen pada variasi suhu yang berbeda setelah 5 hari kultur.....	24
3	Sidik Ragam Isolat 1.....	46
4	Sidik Ragam Isolat 2.....	46
5	Sidik Ragam Isolat 12.....	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1	Struktur dan ikatan kimia glifosat.....	7
2	Grafik pertumbuhan populasi 6 isolat rhizobakteria pada berbagai konsentrasi glifosat (2,8 mg/ml-14,4 mg/ml) setelah 7 hari kultur.....	17
3	Morfologi koloni isolat rhizobakteria berkemampuan memfiksasi nitrogen (a Isolat 1, b Isolat 2 dan c Isolat 12).....	19
4	Pertumbuhan populasi ke-3 isolat bakteri dalam pengujian penggunaan sumber C, N dan P dari glifosat.	20
5	Degradasi glifosat oleh mikroba melalui sarcosin atau AMPA (Borggaard dan Gimsing, 2008).....	22
6	Diagram pertumbuhan populasi bakteri pada media dengan rentang pH berbeda setelah 7 hari kultur.....	23
7	Pertumbuhan populasi ke-3 isolat rhizobakteri dengan sumber karbon yang berbeda setelah 7 hari kultur.....	25
8	Sampel tanah rhizosfir titonia.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Jadwal Kegiatan Penelitian dari Bulan April – Oktober 2014.....	37
2	Alat dan Bahan Untuk Analisis.....	38
3	Prosedur Pengambilan Sampel dan Pembuatan Media Kultur.....	40
4	Penetapan Konsentrasi Glifosat dan Pengamatan Kultur.	44
5	Tabel Sidik Ragam Analisis Statistik Pengujian Pada Suhu Inkubasi.....	46

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tanah merupakan suatu ekosistem dimana di dalamnya dihuni oleh berbagai biota tanah baik makro dan mikrofauna serta berbagai mikroflora. Setiap kelompok biota tanah tersebut mempunyai perannya masing-masing dalam melanjutkan berbagai siklus hara di alam ini (Hardjowigeno, 2010). Sebagian besar biota tanah berperan memberikan keuntungan bagi pertumbuhan tanaman berfungsi dalam siklus hara dalam tanah seperti: nitrifikasi, immobilisasi, fiksasi nitrogen, transformasi unsur serta proses-proses lainnya (Wahyudi, 2002) dan hanya sebahagian kecil saja yang merupakan patogen bagi tanaman (Srikandi, 2010).

Dalam praktek pertanian dewasa ini, untuk meningkatkan produksi sering digunakan senyawa sintetik pengendali hama dan penyakit serta tumbuhan pengganggu (Taiwo dan Oso, 1997). Salah satu bahan utama herbisida sintetik yang biasa digunakan adalah senyawa glifosat. Penggunaan senyawa glifosat yang berulang dan pada waktu yang lama dari hasil penelitian menunjukkan tanaman sering terserang jamur, serta adanya gangguan dalam pembentukan bintil akar pada tanaman kedelai (Santos *et al.*, 2009).

Glifosat dengan nama kimia *phosphonomethyl aminoacetic acid* merupakan herbisida organofosfat. Dimana herbisida non selektif yang dapat mengendalikan gulma semusim maupun tahunan di daerah tropika. Glifosat memiliki rumus kimia $C_3H_8NO_5P$ atau $COOH-CH_2-NH_2+CH_2-HPO_3$ (Knuutila, 1985). Modus aktivitas herbisida glifosat pada gulma didasarkan pada inaktivasi enzim plastidic 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfat synthase (EPSPS) (EC 2.5.1.19), enzim pada kloroplas yang berperan dalam metabolisme tanaman yaitu pada lintasan asam shikimic (Amrhein *et al.*, 1980).

Lintasan ini merupakan lintasan utama dan mendasar dalam metabolisme pada tanaman, jamur dan bakteri untuk biosintesis asam amino esensial fenilalanin, tirosin dan triptofan (Shaner dan Bridges, 2003). Hambatan pada lintasan ini akan mengganggu biosintesis protein dan produk sekunder (phytoalexins, asam folat, asam

sinamat, prekursor lignin, flavonoid, plastoquinone, dan senyawa fenolik lainnya) yang berasal dari asam-asam amino aromatik (Dewick, 1998). Oleh sebab itu penggunaan herbisida glifosat yang terus menerus merugikan kehidupan biota tanah. Daerah rhizosfir dengan aktivitas mikroorganisme yang tinggi (Bais *et al.*, 2006), karena dipengaruhi oleh adanya eksudat akar sebagai faktor pertumbuhan bagi mikroorganisme (Vlastimil dan Kunch, 1988) berkemungkinan besar sangat dipengaruhi dengan penggunaan glifosat. Waktu paruh glifosat dalam tanah yang bisa mencapai 47 hari (Arhens, 1994) merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi populasi bakteri pemfiksasi N yang hidup bebas di daerah rhizosfir. Penelitian Caslisle and Trevor (1988), Malik *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa rhizobakteria pemfiksasi N ada yang resisten terhadap glifosat dan mampu mendegradasi glifosat.

Pengaruh jasad renik tanah (*rhizobakteria*) terhadap pertumbuhan tanaman sangat penting dalam meningkatkan produktivitas tanaman dan mempertahankan kesuburan tanah karena dapat membawa perubahan pada pertumbuhan tanaman, terutama yang bersifat mendorong pertumbuhan Kloepper (1994) dan Glick (1995). Pertumbuhan populasi rhizobakteria pada rhizosfir erat kaitannya dengan perkembangan akar tanaman (Fuhrmann, 1998), adanya populasi jasad renik yang meningkat serta menggambarkan adanya suplai makanan atau energi yang cukup dan kondisi ekologis lain yang mendukung bagi kehidupan rhizobakteria tersebut (Cattelan *et al.*, 1999).

Titonia (Tithonia diversifolia) merupakan tumbuhan semak famili *Asteraceae* yang mempunyai keunggulan sebagai tanaman pupuk hijau. *Titonia* dapat memperbanyak diri secara vegetatif dan generatif (Jama *et al.*, 2000), dan dapat bertahan hidup dalam lingkungan yang agak ekstrim seperti tanah yang miskin hara (Hakim dan Agustian, 2003) dapat dijadikan pagar lorong (Hakim dan Agustian, 2004, 2005a,b) sehingga tanaman ini selalu ada dilapangan berdekatan dengan tanaman pokok yang kemungkinan besar sewaktu menyangi menggunakan glifosat. Asman (2009) membuktikan bahwa rhizosfir *titonia* terdapat beberapa rhizobakteria seperti bakteri pemfiksasi nitrogen, pelarut fosfat dan bakteri penghasil fitohormon. Hasil penelitian Syafei (2012) menunjukkan bahwa rhizosfir *titonia* terdapat juga bakteri pemfiksasi nitrogen.

Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukan penelitian yang berjudul **“KARAKTERISASI BAKTERI ENDEMIK PEMFIKSASI NITROGEN PADA RHIZOSFIR *Tithonia diversifolia* DALAM MENDEGRADASI GLIFOSAT”**.

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri endemik pada rhizosfir titonia yang dapat mendekomposisi glifosat tetapi juga mampu melakukan fiksasi N dan untuk mengetahui kondisi terbaik bagi pertumbuhan rhizobakteria pemfiksasi N serta aktifitasnya dalam dekomposisi glifosat.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Pada Rhizosfir Titonia

Mikroorganisme tanah atau biota tanah adalah jasad yang berukuran kecil dari dua mikron, tidak bisa dilihat dengan menggunakan mata telanjang, tapi harus dengan menggunakan mikroskop. Di dalam tanah yang paling besar jasanya terhadap tingkat kesuburan tanah adalah mikroorganisme ini. Peranan utama mikroorganisme ini adalah untuk menguraikan bahan organik, baik segar maupun setengah segar, atau sedang melapuk, sehingga menjadi senyawa yang sederhana dan bermanfaat bagi kesuburan tanah (Hakim *et al.*, 1986). Disamping ini mikroorganisme juga berperan dalam siklus hara dalam tanah seperti nitrifikasi, immobilisasi, fiksasi nitrogen, transformasi unsur dan proses-proses lainnya (Wahyudi, 2002).

Mikroorganisme yang menghuni tanah tersebut dikelompokkan menjadi bakteri, aktinomisetes, jamur, algae dan protozoa. Bakteri merupakan suatu kelompok mikroorganisme dalam tanah yang paling dominan dan juga mungkin meliputi separuh dari biomassa mikrobial dalam tanah. Bakteri terdapat dalam segala macam tipe tanah tetapi populasinya menurun dengan bertambahnya kedalaman tanah. Dalam kondisi anaerob (tidak ada oksigen), bakteri mendominasi tempat dan melaksanakan kegiatan mikrobiologi dalam tanah karena jamur dan aktinomisetes tidak dapat tumbuh baik tanpa adanya oksigen (Rao, 1994).

Bakteri yang dapat memfiksasi nitrogen lebih banyak dijumpai pada rhizosfir dari pada daerah non-rhizosfir (Franche *et al.*, 2009). Kondisi rhizosfir yang optimal bagi pertumbuhan bakteri pemfiksasi N seperti suhu, pH dan sumber karbon akan menyebabkan N yang ditambatnya semakin maksimal. Lingkungan rhizosfir yang sangat mempengaruhi kehidupan bakteri pemfiksasi N adalah ketersediaan senyawa karbon (C) yang dibutuhkan (Curl dan Bryan, 1985).

B. Fiksasi Nitrogen

Nitrogen adalah unsur yang diperlukan untuk membentuk senyawa penting di dalam sel, termasuk protein, DNA dan RNA. Nitrogen memiliki banyak bentuk kimia, baik organik maupun anorganik. Nitrogen organik berasosiasi dengan karbon, sedangkan nitrogen anorganik berasosiasi dengan elemen lain selain karbon. Beberapa anorganik diantaranya, yaitu nitrat (NO_3^-) dan nitrit (NO_2^-), amonium (NH_4^+), dan amonia (NH_3) (Barsanti and Gualtieri, 2006).

Dalam tanah fiksasi nitrogen umumnya dilakukan oleh bakteri. Bakteri ini melaksanakan fiksasi nitrogen baik dengan hidup bebas atau hidup bersimbiosis dalam akar tanaman legum seperti kedelai, clover, dan buncis. Fiksasi Nitrogen ini melibatkan penggunaan ATP dan proses reduksi ekuivalen berasal dari metabolisme primer. Semua reaksi yang terjadi dikatalisis oleh nitrogenase (Dewi dan Ratna, 2007).

Sumber utama N berasal dari gas N_2 dari atmosfer. Kadar gas nitrogen di atmosfer bumi sekitar 79% dari volumenya. Walaupun jumlahnya sangat besar tetapi belum dapat dimanfaatkan oleh tanaman tingkat tinggi, kecuali telah menjadi bentuk yang tersedia. Proses perubahan tersebut: (1) Penambatan oleh mikrobia dan jasad renik lain. Jasad renik ada yang hidup simbiosis dengan tanaman legum (kacang-kacangan) maupun tanaman non legum, (2) Penambatan oleh jasad-jasad renik yang hidup bebas di dalam tanah atau yang hidup pada permukaan organ tanaman seperti daun, dan (3) Penambatan sebagai oksida karena terjadi pelepasan muatan listrik di atmosfer. Selama berabad-abad penggunaan legum (kacang-kacangan) dalam pergiliran tanaman serta penggunaan pupuk kandang merupakan cara-cara yang penting dalam penyediaan nitrogen tambahan pada tanaman non legum. Dapat dikatakan bahwa persediaan nitrogen di alam pada dasarnya tidak habis-habisnya (Rosmarkam, 2002). Hubungan antara tanaman dan mikroorganisme terjadi di daerah rhizosfir, mikroorganisme dapat hidup dari substrat yang dikeluarkan oleh tanaman melalui akar ataupun tanaman yang mati. Disamping itu dapat juga merangsang pengeluaran unsur hara dari akar dan dapat menghasilkan senyawa-senyawa yang mempercepat pertumbuhan (Bowen dan Rovira, 1981). Potensi penggunaan

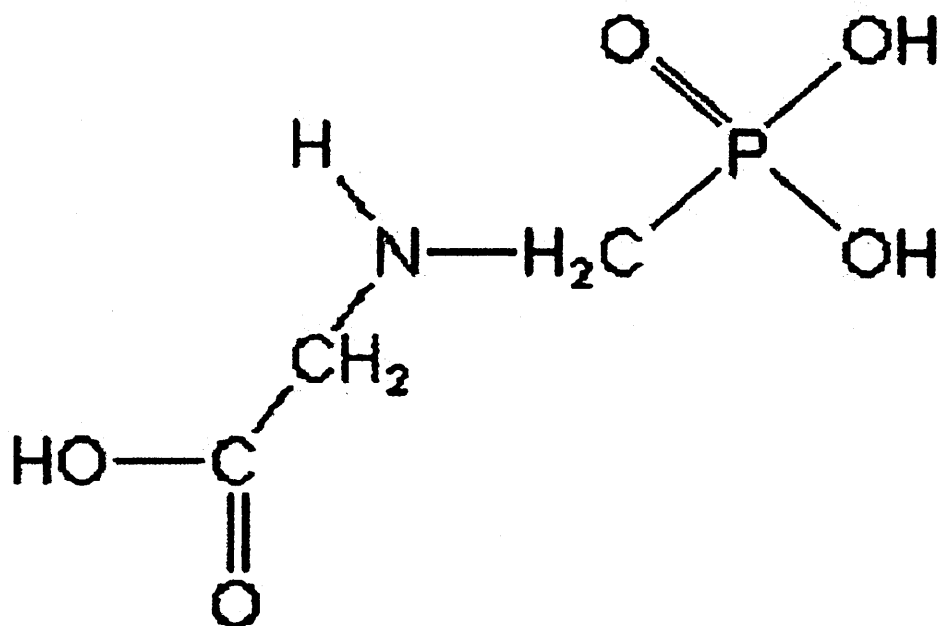
rhizobakteria sebagai inokulan telah banyak mendapat perhatian dari pakar mikrobiologi tanah dan penyakit tanaman, karena sifat dari rhizobakteria ini sangat agresif dalam mengkolonisasi akar menggantikan tempat mikroorganisme yang dapat menimbulkan penyakit pada tanaman (Burr *et al.*, 1978).

Aktivitas mikroorganisme dalam rhizosfir dipengaruhi oleh eksudat yang ada pada rhizosfir (Bais *et al.*, 2006), kandungan eksudat akar inilah yang merupakan salah satu faktor pertumbuhan bagi mikroorganisme (Vlastimil dan Kunch, 1988). Asam organik berupa asam sitrat yang dikeluarkan dari akar titonia (Olivarez *et al.*, 2002) diduga juga dapat memicu pertumbuhan bakteri penambat N sehingga akan terjadi asosiasi antara bakteri penambat N dengan perakaran titonia.

C. Biodegradasi Glifosat dalam Tanah

Di Indonesia, pemakaian herbisida banyak digunakan oleh petani untuk memberantas gulma adalah dengan bahan aktif glifosat (Sastroutomo, 1992). Moenandir (1990) mengemukakan bahwa dengan semakin banyaknya kandungan unsur-unsur toksik yang ada di dalam tanah akibat pemberian herbisida-herbisida yang relatif tahan terhadap biodegradasi akan sangat menghambat fungsi biodegradasi dari mikroorganisme dan bahkan dapat membunuh mikroorganisme yang ada di dalam tanah itu sendiri.

Menurut Lamid dan Azwir (1997) herbisida yang digunakan secara luas di Indonesia adalah herbisida yang mengandung bahan aktif glifosat yaitu 65% dari total herbisida yang beredar. Glifosat adalah herbisida yang mempunyai spektrum pengendali yang luas dan bersifat tidak selektif. Glifosat digunakan untuk mengendalikan gulma tahunan, berdaun lebar digunakan pada peringkat pasca tumbuh. Dosis yang digunakan menurut Wahyudi (2002) berbeda-beda tergantung jenis gulma yang dikendalikan biasanya berkisar antara 6–11 liter ha⁻¹. Senyawa ini diserap melalui daun kemudian diangkut ke dalam semua jaringan tumbuhan



Gambar 1. Struktur dan ikatan kimia glifosat

Cara kerja glifosat adalah menghambat kerja enzim 5-enolpyruvil-shikimate-3-phosphate sintase (EPSPS) dalam pembentukan asam amino aromatic seperti triptofan, tirosin dan fenil alanin (Karyanto, 1996). Belakangan diketahui glifosat juga dapat membunuh bakteri, karena sebagian besar dari bakteri mempunyai enzim EPSPS (Wiersema *et al.*, 1999).

Moenandir (1993) menyatakan bahwa persistensi herbisida dalam tanah merupakan tanda-tanda yang penting bagi herbisida pra-tumbuh. Dekomposisi yang cepat bahan kimia yang fitotoksik tidak akan merusak biji yang dorman. Selanjutnya molekul herbisida dalam larutan tanah juga dapat diabsorpsi atau dimetabolisir oleh mikroorganisme, karena herbisida menyediakan sumber karbon bagi mikroorganisme itu sendiri. Hal ini akan bisa mempercepat proses dekomposisi herbisida yang dapat mengurangi persistensi herbisida dalam tanah itu sendiri. Tingginya persistensi bahan aktif yang dimiliki oleh herbisida akan memberikan efek terhadap populasi mikroorganisme dalam tanah.

D. Penggunaan Glifosat dan Dampaknya Terhadap Lingkungan

Penggunaan herbisida secara besar-besaran dan bersifat terus menerus di alam dapat menyebabkan terakumulasinya residu bahan-bahan kimiawi di dalam tanah. Seperti halnya herbisida sintetik lainnya permasalahan yang muncul akibat penggunaan herbisida glifosat yang tidak terkontrol akan mengakibatkan terjadinya akumulasi glifosat dalam tanah atau air. Hal ini diperparah dengan tingginya persistensi glifosat di lingkungan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa glifosat terdegradasi dalam tanah secara alamiah dengan waktu paruh 100 hari (Leung dan Tri Pham, 2000).

Terdapat banyak pendapat tentang pengaruh glifosat biota tanah, karena glifosat diaplikasikan pada tumbuhan pengaruh terhadap tanah maupun biotanya tidak terlalu besar dampaknya. Glifosat dapat meracun pada cacing tanah dengan jumlah 158-500 mg glifosat/ kg tanah (Taylor *et al.*, 1999) dan dapat menurunkan populasi cacing tanah (Springget and Gray, 1992). Jumlah populasi bakteri *heterotropik* dalam tanah berkurang setelah pemakaian glifosat, penurunan juga terjadi pada populasi fungi dalam tanah (Busse *et al.*, 2001).

Penggunaan herbisida glifosat terus meningkat sejak dikembangkan program budidaya pertanian olah tanah konservasi (OTK) di lahan kering tahun 1987, sejalan dengan upaya peningkatan produksi pangan, serat dan bahan mentah hasil pertanian lainnya. Pelaksanaan program OTK di lahan kering maupun lahan basah selalu menggunakan herbisida untuk memberantas gulma. Penggunaan herbisida dilakukan terus-menerus dua kali setiap menjelang musim tanam. Pertama, herbisida pasca-tumbuh untuk memberantas gulma melalui daun, dan kedua herbisida pra-tumbuh untuk mematikan biji gulma baru yang sudah berkecambah di atas tanah (Wardoyo *et al.*, 2001).

Dari penelitian ditemukan bahwa, penggunaan herbisida mencapai 49,6% dari volume penjualan pestisida dunia (Merrington *et al.*, 2002). Permintaan pestisida dunia diproyeksikan meningkat dari \$ 26 milyar tahun 2004 menjadi \$ 28.4 milyar di tahun 2009 dengan laju pertumbuhan 1.7% per tahun (Irianto dan Johanis, 2009). Menurut Direktorat Sarana Produksi Pertanian, jumlah herbisida terdaftar di

Indonesia tahun 2006 sebanyak 40 golongan, terdiri atas 80 bahan aktif, dan 374 formulasi. Penggunaan herbisida yang meningkat secara signifikan dewasa ini tidak lepas dari usaha memenuhi permintaan dunia akan pangan, pakan dan energi (*food, feed dan fuel*) secara berkelanjutan. Tiga bahan aktif herbisida paling banyak digunakan adalah glifosat (*N-phosphonomethyl glycine*), paraquat (*paraquat dichloride*), dan 2,4-D (*2, 4 dichloro phenoxy acetic acid*).

BAB III BAHAN DAN METODA

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan April sampai Oktober 2014 di Laboratorium Biologi Tanah Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Jadwal pelaksanaan penelitian selengkapnya ditampilkan pada Lampiran 1.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah rhizosfir titonia, aquadest, media NA, media Malic Acid padat, media Malic Acid cair, media Nutrient Broth dan Glifosat dengan nama dagang Roundup.

Sedangkan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Erlenmeyer, petri dish, pipet tetes, gelas ukur, pH meter, inkubator, jarum ose, kertas label, mikroskop dan plastik wrap. Selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.

C. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah dari rhizosfir titonia diambil dari titonia yang tumbuh secara alami disekitar Kebun Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Kampus Limau Manis Padang. Bongkahan kecil tanah yang masih melekat pada perakaran halus tanaman digunakan dalam penelitian ini dan diambil secara komposit. Prosedur pengambilan contoh tanah merujuk pada Wollum (1994) dapat dilihat pada Lampiran 3.

2. Sterilisasi Alat

Kegiatan ini merupakan tahapan awal penelitian, kegiatan ini meliputi sterilisasi alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini seperti petridish, erlenmeyer, test tube, botol schoot dan alat-alat lainnya. Sterilisasi dilakukan pada suhu 120°C dengan tekanan 1 atm selama ± 30 menit untuk memastikan matinya mikroorganisme yang terdapat pada alat-alat tersebut.

Proses sterilisasi lainnya yaitu sterilisasi media kultur dan aquadest, dimana media yang telah dibuat selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu dan tekanan yang sama yaitu 120°C dan tekanan 1 atm, namun kondisi ini dipertahankan lebih lama dibandingkan sterilisasi alat yakni selama ± 45 menit karena sterilisasi media kultur dan aquadest ini dalam volume yang besar dan media lebih rentan terkontaminasi mikroorganisme.

3. Pembuatan Media Kultur

Ada beberapa jenis media kultur yang digunakan pada penelitian ini dari awal proses isolasi sampai pada proses karakterisasi bakteri. Adapun media kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah media Nutrient Agar (NA) (Lampiran 3b) dan Media Nutrient Broth (NB) (Lampiran 3c) yang digunakan untuk membiakkan bakteri dari sampel rhizosfir titonia sehingga didapatkan kultur induk dan pengujian isolate bakteri terhadap kemampuan mendegradasi glifosat. Sedangkan untuk seleksi bakteri pemfiksasi nitrogen digunakan media DL Malic Acid Agar dan media DL Malic Acid Broth (Lampiran 3d).

2. Tahap Isolasi Bakteri

a. Kultur Bakteri dari Rhizosfir Titonia

Tahap awal proses isolasi bakteri dari rhizosfir titonia adalah pengambilan sampel tanah rhizosfir titonia berpedoman pada metoda yang dikemukakan oleh Moneke et al., 2010. Sampel dibawa ke laboratorium dan dikering anginkan, kemudian disaring dengan ayakan 500 mikron. Pemiakkan isolasi bakteri dari sampel tanah rhizosfir dilakukan dengan cara menimbang sampel tanah seberat 0,5 gr. Sampel tanah tersebut kemudian dikulturkan ke dalam media Nutrient Broth (NB) di dalam test tube yang sudah steril. Untuk menjaga dari kontaminasi, pengerjaan dilakukan pada *laminar flow*. Media kemudian dikocok dengan menggunakan *shaker* selanjutnya dilakukan pengamatan jumlah populasi. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menggunakan *haemocytometer* pada mikroskop dengan melakukan pengenceran rentang 10^{-1} sampai 10^{-7} .

b. Isolasi Bakteri Resisten Glifosat dari Rhizosfir *Titonia*

Setelah didapatkan kultur bakteri dari sampel tanah rhizosfir, maka selanjutnya dilakukan pengujian kultur bakteri tersebut pada media yang ditambahkan glifosat. Isolat bakteri dibiakkan dalam 10 ml media NB yang mengandung glifosat dengan konsentrasi glifosat yang berbeda yakni 2,8 mg/ml; 4,5 mg/ml; 7,2 mg/ml; 11,2 mg/ml; 14,4 mg/ml dengan dikemukakan dari Moneke *et al.*, 2010. Kultur bakteri dipipet sebanyak 200 μ l dan dimasukkan kedalam test tube yang telah terisi media NB dan glifosat ditumbuhkan selama 1 minggu dengan pengocokan 120 rpm menggunakan shaker. Bakteri yang bertahan hidup dalam media NB yang mengandung glifosat tersebut kemudian dibiakkan dalam media agar NA dengan metoda spread plate (cawan tuang). Koloni bakteri yang tumbuh pada media NA merupakan bakteri yang tahan dan berkemampuan dalam degradasi glifosat. Selanjutnya isolat yang diperoleh dikultur ulang pada media tanpa N untuk seleksi bakteri yang berkemampuan dalam fiksasi N non simbiotik.

c. Isolat dan Seleksi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen

Isolat bakteri pemfiksasi nitrogen ini dibiakkan dengan menggunakan media DL Malic Acid Agar. Prosedur pembuatan media DL Malic Acid dapat dilihat pada Lampiran 3d. Media DL Malic Acid Agar ini menggunakan metode Cawan Gores (*steak plate*). Media DL Malic Acid dituangkan secara aseptis kedalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Setelah media memadat, sampel isolat bakteri dari media NA diambil dengan menggunakan jarum ose. Sebelum digunakan dari satu isolat ke isolat berikutnya jarum ose harus disterilkan dahulu dengan cara membakar jarum ose dengan menggunakan lampu bunsen, selanjutnya penggoresan dilakukan kembali. Kemudian diberi kode/ nomor isolat pada setiap isolat dan diinkubasi di dalam inkubator. Karakterisasi lebih lanjut terhadap isolat pendegradasi glifosat dan berkemampuan dalam fiksasi N dilakukan menggunakan media cair DL-Malic acid yang mengandung glifosat 14,4 mg/ml.

3. Karakterisasi Bakteri

Dari hasil isolasi bakteri yang mempunyai kemampuan mendegradasi glifosat masih perlu diuji lanjut kemampuannya dalam kondisi lingkungan yang berbeda. Kemampuan bakteri dalam mendegradasi glifosat dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan. Untuk itu perlu pengujian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan isolat tersebut. Karakterisasi isolat bakteri dilakukan untuk mendapatkan temperatur tumbuh optimum dari isolat, pH optimum, dan sumber karbon yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan berfungsi dalam membantu degradasi glifosat.

a. Uji pH optimum pertumbuhan isolat

Untuk uji pH ini isolat bakteri yang dibiakan pada media DL Malic Acid Broth disiapkan dengan tingkatan pH yang berbeda. Adapun caranya dengan menambahkan larutan KOH untuk media yang bersifat basa dan HCl untuk media yang bersifat asam. Kemudian ditambahkan glifosat dengan konsentrasi 14,4 mg/ml. Tingkatan pH yang diuji dengan tingkat 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 dan 7,0. Kemudian diamati total populasi *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm.

b. Uji temperatur optimum pertumbuhan isolat

Untuk uji temperatur ini isolat bakteri dibiakan pada media NB dan DL Malic Acid Broth yang ditambahkan glifosat dengan konsentrasi 14,4 mg/ml. Kemudian di uji dengan perlakuan temperatur yang berbeda-beda yakni pada suhu 20°C, 25°C, 30°C, 35°C dan 40°C. Dalam pengujian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 kali ulangan dan uji lanjut dengan DMRT 5 %. Isolat bakteri diinkubasi dalam inkubator dengan kondisi temperatur yang diujikan selama seminggu. Total populasi *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm.

c. Uji sumber karbon yang dapat dimetabolisir

Untuk uji penambahan gula hampir sama dengan cara uji pH, dan temperatur hanya pada uji sumber karbon ini dilakukan dengan menggantikan sumber karbon pada media DL-Malic Acid dengan sumber karbon yang berbeda yakni sukrosa, maltosa,

dektosa, galaktosa dan glukosa. Dalam media tersebut mengandung glifosat dengan konsentrasi 14,4 mg/ml Masing-masing bakteri dipindahkan ke media-media yang telah disiapkan. Lalu dikocok dengan menggunakan *shaker* selama seminggu. Total populasi diukur melalui pengukuran *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm.

C. Uji kemampuan isolat dalam hidrolisis ikatan glifosat

Pengujian kemampuan bakteri dalam hidrolisis glifosat dilakukan dengan cara melihat peran dari glifosat sebagai sumber nitrogen, sumber P dan sumber C. Media yang digunakan adalah DL Malic Acid, tetapi dimodifikasi dengan cara menghilangkan sumber karbon, fosfor dan nitrogen pada media tersebut, dan dengan media kontrol DL Malic Acid lengkap+glifosat 14.4 mg/ml.

Modifikasi media yang berbeda yakni A (media DL Malic Acid lengkap+glifosat 14.4 mg/ml), B (media DL Malic Acid lengkap {tanpa malic acid dan yeast extract} (-C, -N)+glifosat 14.4 mg/ml), C (media DL Malic Acid lengkap {tanpa malic acid dan tanpa K_2HPO_4 } (-C, -P)+glifosat 14.4 mg/ml) dan D (media DL Malic Acid lengkap {tanpa malic acid, tanpa K_2HPO_4 dan yeast ekstrak}(-C, -P, -N)+glifosat 14.4 mg/ml. Untuk lebih lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 3.

Masing-masing media kemudian di kulturkan 1 ml isolat bakteri dan di kocok dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selanjutnya diukur total populasi berdasarkan *Optical Density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm.

4. Rancangan Percobaan

Dalam penelitian ini rancangan percobaan yang digunakan hanya untuk faktor temperatur. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Data dianalisis lanjut dengan uji F, jika F hitung lebih besar dari F tabel, maka dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf 5 %. Perlakuan temperatur yang dilakukan adalah 20, 25, 30, 35 dan 40°C.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Analisis Sifat Kimia Tanah Rhizosfir *Titonia*

Hasil analisis sampel tanah rhizosfir *Tithonia diversifolia* yang diteliti dengan menunjukkan bahwa tanah tersebut mempunyai ciri dasar tanah Ultisol pada pH H₂O tergolong agak masam dan pH (KCl) tergolong masam (Tabel 1). Tanah Ultisol pada umumnya memiliki pH (H₂O) tergolong masam dan kandungan C-organik yang rendah sampai sangat rendah, dengan kejenuhan Aluminium yang tinggi.

Namun dari hasil analisis didapatkan pH tanah H₂O agak masam dan kandungan C organik tinggi. Hal ini dapat diakibatkan karena tanah yang dianalisis berada pada rhizosfir yang merupakan daerah yang dipengaruhi langsung oleh eksudat akar tanaman. Daerah ini dipengaruhi oleh adanya eksudat akar dan aktifitas populasi mikroorganisme yang lebih tinggi dibandingkan zona luar rhizosfir (Vlastimil dan Kunch, 1988).

Tabel 1. Sifat dan ciri kimia sampel tanah rhizosfir *Tithonia diversifolia*

Ciri kimia tanah	Nilai	Kriteria*
pH H ₂ O (1:1)	5,7	Agak masam
pH KCl(1:1)	4,75	Masam
C-org (%)	3,23	Tinggi
N-total (%)	0,15	Rendah
P tersedia (ppm)	17,09	Sedang
KTK (me/100 g)	37,2	Tinggi
K (me/100 g)	0,10	Rendah
Na (me/100 g)	0,82	Tinggi
Ca (me/100 g)	0,20	Sangat Rendah
Mg (me/100 g)	0,86	Rendah
Al-dd (me/100 g)	0,41	-
Kej. Al (%)	17,15	Rendah
KB (%)	5,32	Sangat rendah

*Sumber kriteria: Pusat Penelitian Tanah *cit.* Hardjowigeno (2003).

Berdasarkan hasil penelitian memperlihatkan bahwa tingginya kandungan bahan organik dari rhizosfir tanah berpengaruh terhadap ciri kimia tanah lainnya. Pada tanah ordo Ultisol biasanya jumlah Al-dd dan kejenuhan Al tinggi, tetapi disini membuktikan bahwa jumlah Al-dd dan kejenuhan Al rendah.

Kandungan C-organik yang tinggi (3,23%) membuktikan bahwa tanah ini memiliki bahan organik yang tinggi. Bahan organik merupakan salah satu unsur yang sangat penting dalam menentukan tingkat kesuburan tanah karena bahan organik ini berfungsi sebagai energi bagi mikroorganisme.

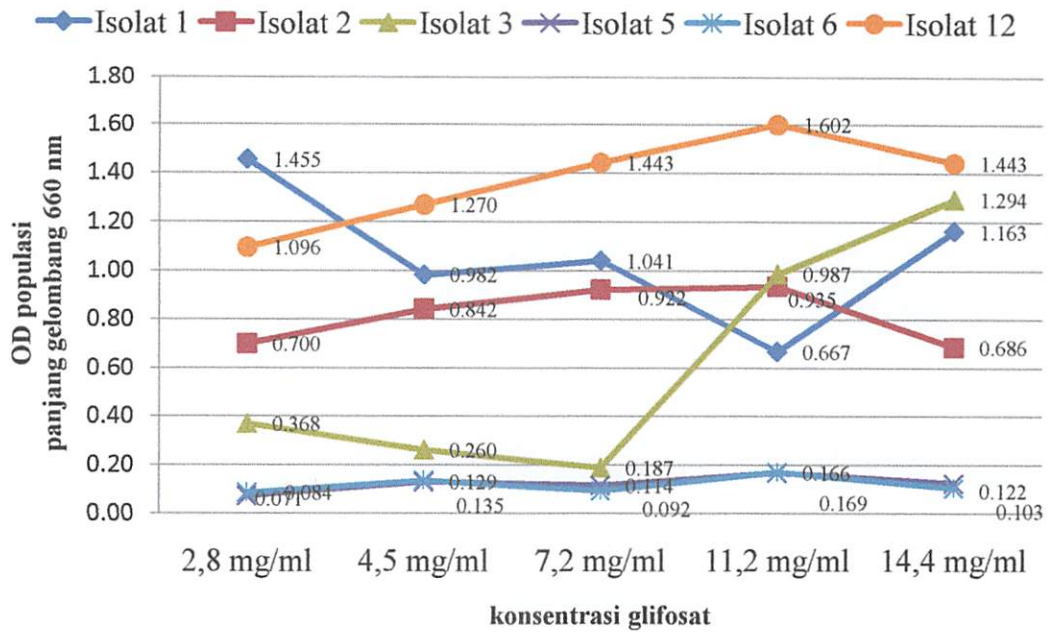
Rhizosfir merupakan daerah yang ideal bagi tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme tanah. Keadaan ini didukung oleh fungsinya, yaitu sebagai penyedia nutrisi dan juga sebagai tempat tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme. Beberapa macam nutrisi disekresikan di dalam rhizosfir, yang sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan di dalam tanah. Menurut Soomers *et al.*, (2004) eksudat akar mengandung karbon dan beberapa sumber nutrisi yang berguna bagi pertumbuhan mikroba.

Beberapa bakteri penyedia hara yang terdapat pada rhizosfir akar disebut rhizobakteri pemacu tanaman atau dikenal sebagai PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Bashan dan Holguin, 1998 *cit* Tarigan 2010). PGPR memiliki peranan penting bagi tumbuhan, misalnya sebagai pengendali biologi melalui kompetisi, produksi antibiotik, induksi resistensi tanaman, produksi fitohormon dan peningkatan ketersediaan hara melalui fiksasi nitrogen (Aryantha, 2004 *cit* Tarigan 2011).

B. Hasil Pengujian Bakteri Resisten Glifosat

Isolat bakteri Rhizosfir *tithonia* resisten glifosat ditumbuh ulang pada media Nutrient Broth (NB) yang mengandung glifosat. Secara umum keenam isolat bakteri ini masih mampu tumbuh pada media yang mengandung glifosat dari konsentrasi 2,8 mg/ml sampai 14,4 mg/ml. Setelah didapatkan kultur bakteri dari sampel tanah rhizosfir, selanjutnya dilakukan pengujian kultur bakteri dengan menambahkan glifosat. Isolat bakteri dibiakkan dalam media NB+glifosat (10 ml) dengan

konsentrasi glifosat yang berbeda yakni 2,8; 4,5; 7,2; 11,2; 14,4 mg/ml. Hasil pengujian bakteri didapatkan 6 isolat bakteri yang mampu tumbuh pada media yang mengandung glifosat dari konsentrasi 2,8 mg/ml sampai 14,4 mg/ml.



Gambar 2. Grafik pertumbuhan populasi 6 isolat rhizobakteria pada berbagai konsentrasi glifosat (2,8 mg/ml-14,4 mg/ml) setelah 7 hari kultur.

Dari grafik dapat dilihat bahwa pada umumnya semua isolat mampu bertahan pada setiap konsentrasi glifosat yang diberikan. Pada isolat 1 dan 12 dapat menunjukkan bahwa isolat ini cukup baik. Konsentrasi 2,8 mg/ml pada isolat 1 cukup tinggi dan pada konsentrasi 4,5–11,2 mengalami penurunan. Namun pada konsentrasi 14,4 pada isolat 1 ini mengalami peningkatan. Selanjutnya dari konsentrasi 2,8- 11,2 mg/ml pada isolat 12 pertumbuhannya meningkat. Namun pada konsentrasi 14,4 mg/ml mengalami penurunan. Sedikit perubahan yang terjadi pada pertumbuhan konsentrasi berbeda, yaitu pada konsentrasi 2,8-11,2 pada isolat 2 juga mengalami kenaikan dan konsentrasi 14,4 mg/ml sedikit mengalami penurunan. Konsentrasi 2,8-7,2 pada isolat 3 mengalami pertumbuhan yang cukup kecil, namun pertumbuhan meningkat seiring meningkatnya konsentrasi pada 11,2 dan 14,4 mg/ml pada isolat 3

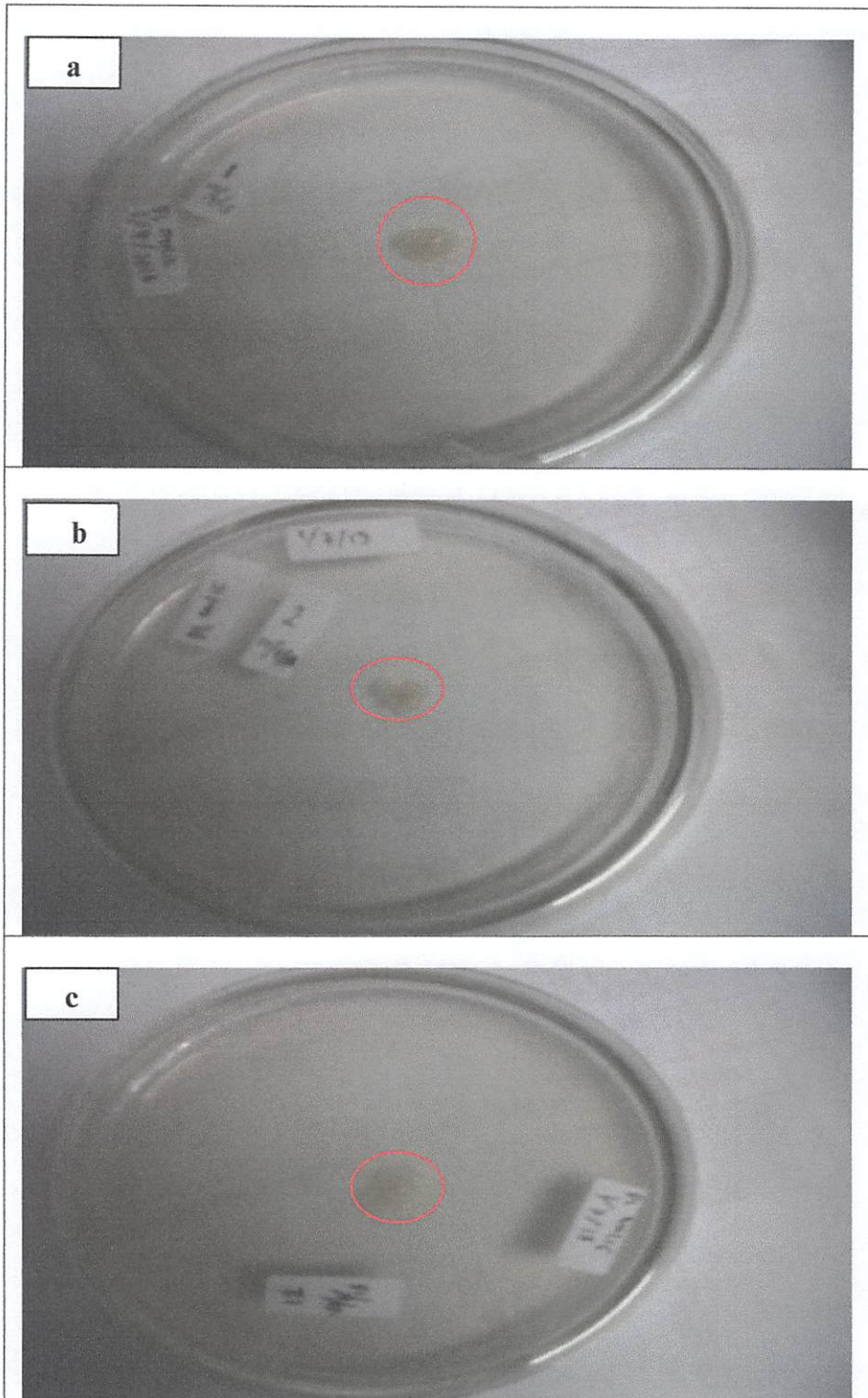
tersebut. Pada isolat 5 dan 6 terlihat pertumbuhannya cukup rendah dan stabil pada berbagai konsentrasi glifosat.

Adanya pengaruh glifosat terhadap pertumbuhan masing-masing isolat yang disebabkan karena terjadinya variasi pertumbuhan. Beberapa bakteri ini tidak mampu tumbuh pada konsentrasi glifosat yang tinggi karena glifosat mempunyai sifat toksik pada mikroorganisme.

C. Hasil Pengujian Isolat Pendegradasi Glifosat Yang Mampu Memfiksasi Nitrogen

Kemampuan isolat resisten glifosat dalam fiksasi nitrogen dapat diketahui dengan membiakan isolat pada media DL Malic Acid. Hasil pengujian menunjukkan terdapat 3 isolat yang mampu tumbuh pada media DL Malic Acid yaitu isolat 1, 2 dan 12 sedangkan 3 isolat lainnya tidak mampu tumbuh dalam media tersebut. Isolat ini dikatakan mampu memfiksasi nitrogen dan dapat mendegradasi glifosat karena di dalam media DL Malic Acid tersebut tidak ada sumber N sama sekali. Ketiga isolat tersebut diberi nama Isolat 1, 2 dan 12 (bentuk koloninya bulat dan berwarna putih kekuningan).

Pengaruh jasad renik tanah (*rhizobakteria*) terhadap pertumbuhan tanaman sangat penting dalam meningkatkan produktivitas tanaman dan mempertahankan kesuburan tanah karena dapat membawa perubahan pada pertumbuhan tanaman, terutama yang bersifat mendorong pertumbuhan Kloepper (1994) dan Glick (1995). Pertumbuhan populasi rhizobakteria pada rhizosfir erat kaitannya dengan perkembangan akar tanaman (Fuhrmann, 1998), adanya populasi jasad renik yang meningkat serta menggambarkan adanya suplai makanan atau energi yang cukup dan kondisi ekologis lain yang mendukung bagi kehidupan rhizobakteria tersebut (Cattelan *et al.*, 1999). Asman (2009) membuktikan bahwa rhizosfir titonia terdapat beberapa rhizobakteria seperti bakteri pemfiksasi nitrogen, pelarut fosfat dan bakteri penghasil fitohormon. Isolat tersebut dikarakterisasi dengan melihat morfologi koloni isolat rhizobakteria yang mampu memfiksasi nitrogen seperti dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Morfologi koloni isolat rhizobakteria berkemampuan memfiksasi nitrogen (a Isolat 1, b Isolat 2 dan c Isolat 12).

D. Pengujian Kemampuan Rhizobakteria Dalam Degradasi Glifosat

Pengujian kemampuan rhizobakteria dalam mendegradasi glifosat maka dilakukan pengujian melalui pendekatan dengan cara memodifikasi media DL Malic Acid. Media DL Malic Acid yang mengandung glifosat 14,4 mg/ml dimodifikasi dengan cara menghilangkan sumber C, N, P. Adapun bentuk dari modifikasi media DL Malic Acid adalah sebagai berikut :

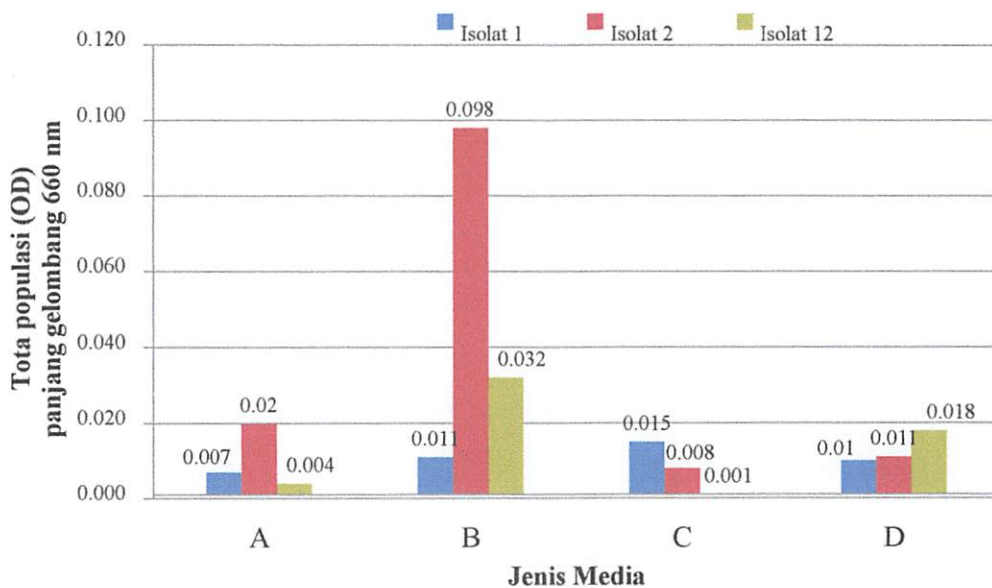
A = Media DL Malic Acid lengkap mengandung glifosat 14,4 mg/ml (tanpa sumber N)

B = Media DL Malic Acid mengandung glifosat 14,4 mg/ml tanpa sumber C dan N.

C = Media DL Malic Acid mengandung glifosat 14,4 mg/ml tanpa sumber C dan P

D = Media DL Malic Acid mengandung glifosat 14,4 mg/ml tanpa sumber C, N dan P

Dengan modifikasi media kultur (DL Malic Acid) tersebut maka dapat dilihat kemampuan isolat rhizobakteria dalam mendegradasi glifosat dengan cara memanfaatkan glifosat sebagai sumber C, P dan N dari hasil degradasinya. Dari hasil pengujian (Gambar 4) dapat dilihat bahwa secara umum ketiga isolat bakteri tersebut mampu tumbuh pada semua jenis media (A-D).



Gambar 4. Pertumbuhan populasi ke-3 isolat bakteri dalam pengujian penggunaan sumber C, N dan P dari glifosat

Pada media A isolat bakteri yang tumbuh adalah Isolat 1 dengan pembacaan OD yaitu 0,007, Isolat 2 yaitu 0,02 dan Isolat 12 yaitu 0,004. Pada media A mekanisme ketiga isolat bakteri tersebut mendegradasi glifosat tidak bisa dilihat secara jelas, karena di dalam media kultur tersebut masih terdapat sumber C, P, N.

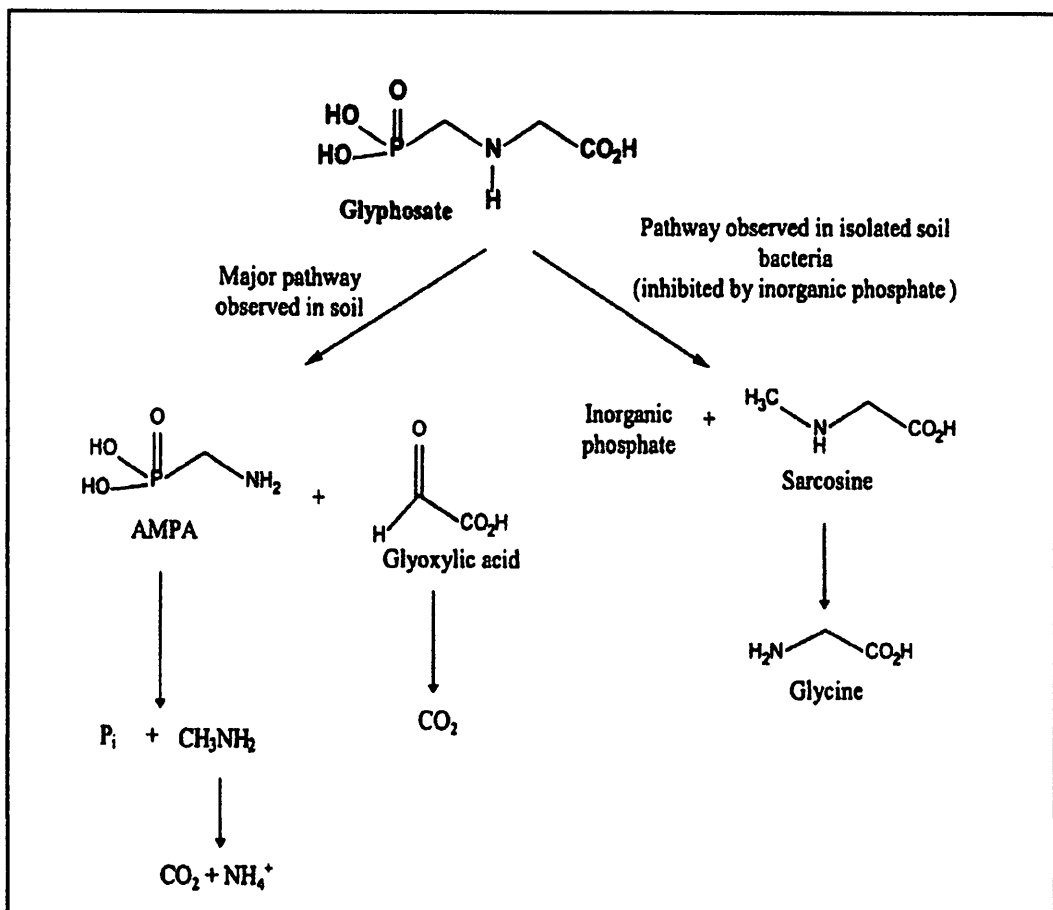
Pada media B isolat bakteri yang tumbuh adalah Isolat 1 dengan pembacaan OD yaitu 0,011, Isolat 2 yaitu 0,098 dan Isolat 12 yaitu 0,032. Degradasi glifosat pada media B diyakini lebih mengarah kepada pembentukan AMPA, karena pada media B tidak terdapat sumber C dan N. Pola degradasi glifosat melalui proses metabolisme sehingga glifosat bukan sebagai sumber makanan utama melainkan hanya sebagai sumber alternatif jika sumber makanan utama tidak tersedia (Sprankle *et al.*, 1975). Ketiga isolat bakteri akan memanfaatkan glifosat sebagai sumber karbon dengan cara memotong ikatan C-N dan produk yang dihasilkan berupa asam aminomethyl phosphonic acid (AMPA).

Pada media C isolat bakteri yang tumbuh pada Isolat 1 dengan pembacaan OD yaitu 0,015, Isolat 2 yaitu 0,008 dan Isolat 12 yaitu 0,001. Tidak adanya sumber C dan P pada media ini namun terlihat adanya pelepasan P yang terukur pada media kultur C dari ketiga isolat menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri mendegradasi glifosat cenderung mengarah kepada jalur produksi glisina yakni dengan cara memutus ikatan C-P. Kedua isolat bakteri memanfaatkan glifosat sebagai sumber C atau P.

Pada media D isolat bakteri yang tumbuh pada Isolat 1 dengan pembacaan OD yaitu 0,01, Isolat 2 yaitu 0,011 dan Isolat 12 yaitu 0,018. Tidak adanya sumber C, P dan N maka bakteri akan memanfaatkan glifosat sebagai sumber C, P dan N. Untuk mendapatkan sumber C, P dan N dari glifosat maka bakteri mendegradasi glifosat melalui dua jalur degradasi yakni melalui produksi glisina dan pembentukan (AMPA). Ada beberapa spesies bakteri yang mempunyai kemampuan mendegradasi glifosat melalui kedua jalur degradasi antara lain *Ochrobactrum anthropi* GPK3 (Sviridov *et al.*, 2011) dan *Pseudomonas sp* (Jacob *et al.*, 1988). Namun menurut Moore *et al.*, (1983), meskipun bakteri dapat mendegradasi glifosat tetapi bakteri

tidak mampu menggunakannya sebagai sumber karbon dan sumber fosfor secara bersamaan.

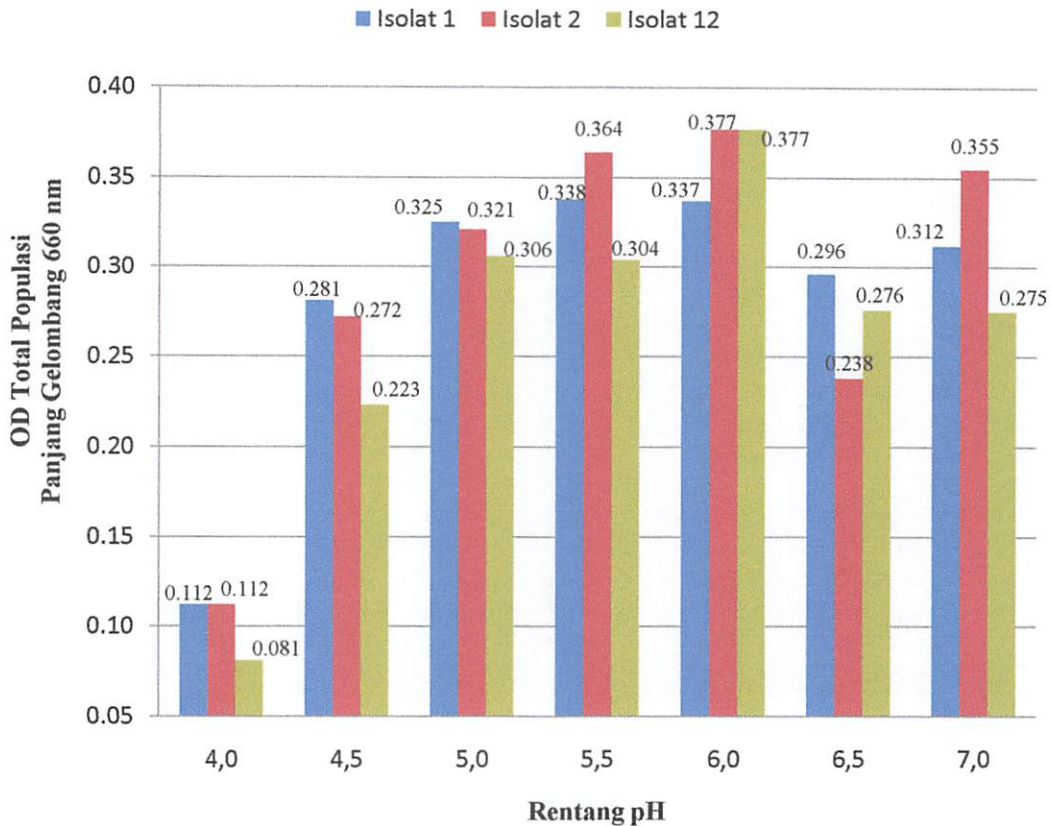
Menurut Borggaard dan Gimsing (2008) bakteri mendegradasi senyawa glifosat melalui dua cara yang pertama bakteri akan memutuskan ikatan C-P dari senyawa glifosat dan menghasilkan fosfonat dan sarkosin. Fosfonat ini yang dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber fosfor untuk kehidupannya. Sedangkan cara yang kedua bakteri memutus ikatan C-N pada struktur glifosat dan mengambilnya sebagai sumber karbon dengan menghasilkan produk asam Amino Methyl Phosphonic Acid (AMPA). Secara umum proses degradasi glifosat oleh bakteri dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Degradasi glifosat oleh mikroba melalui sarcosin atau AMPA (Borggaard dan Gimsing, 2008).

E. Pengujian Pengaruh pH Media Kultur Terhadap Pertumbuhan Isolat Rhizobakteria

Salah satu faktor penting dalam pertumbuhan bakteri adalah nilai pH. Pada umumnya pertumbuhan bakteri sangatlah berpengaruh terhadap nilai pH. Pertumbuhan bakteri ini sangat memerlukan adanya pengujian pH optimum yang tumbuh dengan optimal.



Gambar 6. Diagram pertumbuhan populasi bakteri pada media dengan rentang pH berbeda setelah 7 hari kultur.

Secara umum semua isolat bakteri ini dapat tumbuh pada rentang pH media yang diujikan yaitu 4,0–7,0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum semua isolat rhizobakteria dapat tumbuh pada rentang pH media yang diujikan. Namun ketiga isolat rhizobakteria ini lebih dianggap tumbuh optimum pada pH media 6,0, hal ini dapat

dilihat bahwa pada pH media tersebut total populasi ketiga isolat rhizobakteri lebih tinggi dibandingkan dengan populasi rhizobakteri pada pH media lainnya.

Pada pH 6,0, total populasi untuk ketiga isolat ini yaitu pada Isolat 1 mencapai OD 0.337, Isolat 2 mencapai OD 0.377 dan Isolat 12 mencapai OD 0.377, sedangkan pertumbuhan bakteri terendah terdapat pada pH media 4.0 dimana total populasi untuk Isolat 1 mencapai OD 0.112, Isolat 2 mencapai OD 0.112 sedangkan Isolat 12 mencapai OD 0.081. Hal ini dapat disimpulkan bahwa tingkat degradasi glifosat tergantung pada karakteristik tanah dan aktifitas mikroba dalam tanah, pH tanah, aerasi dan kandungan bahan organik dapat member efek pada laju degradasi glifosat. Shushkova *et al.*, (2012) menyatakan bahwa degradasi glifosat paling efektif pada pH 6,0-7,0 dengan sumber yang sesuai yaitu karbon dan nitrogen.

F. Pengujian Pengaruh Variasi Temperatur Terhadap Pertumbuhan Isolat Rhizobakteria Dalam Media Malic Acid Mengandung Glifosat 14,4 mg/ml

Bakteri mempunyai kemampuan untuk tumbuh pada kondisi suhu yang sangat luas. Hasil uji statistik yaitu uji F pada taraf 5 % menunjukkan berbeda. Secara umum semua isolat bakteri ini mampu untuk tumbuh pada suhu inkubasi yang diujikan (20°C-40°C). Pada Tabel 2 ini dapat dilihat bahwa ketiga isolat rhizobakteria terlihat memberikan respon berbeda terhadap suhu inkubasi.

Tabel 2. Pengaruh laju pertumbuhan bakteri pemfiksasi nitrogen pada variasi suhu yang berbeda setelah 5 hari kultur

Suhu inkubasi	OD Populasi (660 nm)		
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 12
20°	0.24a	0.25a	0.32a
25°	0.26a	0.26a	0.27a
30°	0.13b	0.13b	0.15b
35°	0.16b	0.15b	0.16b
40°	0.02c	0.01c	0.02c
	KK= 9.97%	KK= 6.06%	KK=13.43%

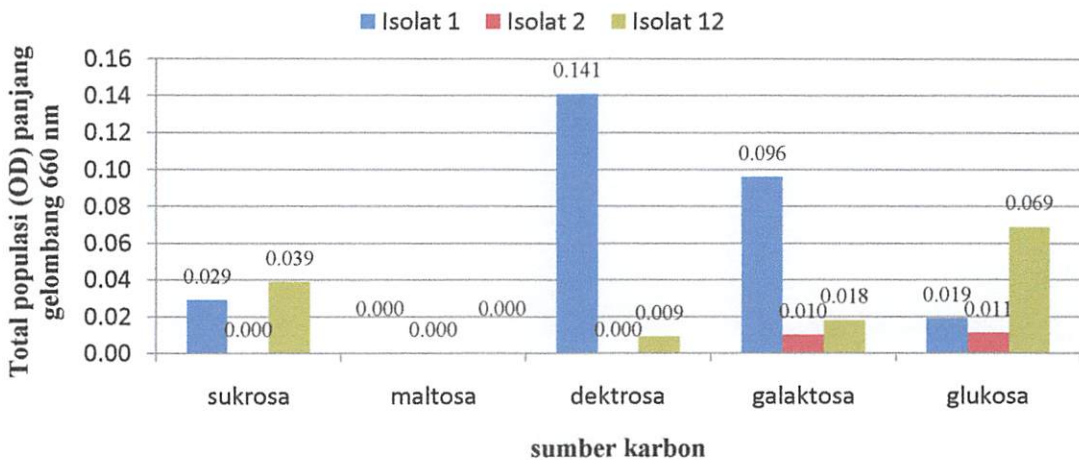
*Angka-angka pada lajur diatas yang diikuti oleh huruf kecil yang sama adalah berbeda tidak nyata menurut DMRT pada taraf 5%.

Pada Isolat 1 dan Isolat 2 pertumbuhan bakteri optimum pada suhu 25° C yakni dimana total populasi Isolat 1 dan Isolat 2 ini sama-sama mempunyai jumlah populasi mencapai OD 0.26 sedangkan pada Isolat 12 pertumbuhan bakteri optimum pada suhu 20° C dengan jumlah populasi mencapai OD 0.32.

Jika dilihat dari pertumbuhan dan kemampuan ketiga rhizobakteria ini mendegradasi glifosat dan memfiksasi nitrogen dapat dikategorikan pada kelompok bakteri mesofilik. Bakteri mesofilik ini dapat dan mampu tumbuh pada rentang suhu 20°-40°C. Knob dan Carmona (2008), menyatakan bahwa suhu sangat mempengaruhi kecepatan pertumbuhan bakteri, kecepatan sintesis enzim dan kecepatan inaktivasi enzim. Setiap mikrobia termasuk bakteri mempunyai suhu optimum, maksimum dan minimum untuk pertumbuhannya.

G. Hasil Pengujian Pengaruh Beberapa Sumber Karbon Terhadap Pertumbuhan Rhizobakteria

Pada umumnya bakteri memerlukan salah satu sumber nutrisi terhadap pertumbuhannya yaitu sumber karbon. Dari hasil pengujian pada gambar 7 dengan berbagai macam sumber karbon yang berbeda menunjukkan bahwa pengaruh terhadap pertumbuhan ketiga isolat tersebut.



Gambar 7. Pertumbuhan populasi ke-3 isolat rhizobakteria dengan sumber karbon yang berbeda setelah 7 hari kultur.

Pada Gambar 7 terlihat bahwa ternyata pertumbuhan ketiga isolat bakteri terbaik terdapat pada media dengan sumber karbon dekstrosa dimana OD pada Isolat 1 mencapai 0,073, pada Isolat 2 mencapai 0,039 dan pada Isolat 12 mencapai 0,080. Sedangkan pada media dengan sumber karbon maltosa pertumbuhan ketiga isolat bakteri terlihat tidak ada sama sekali.

Matheson (1996) menyatakan bahwa dekstrosa berfungsi sebagai sumber energi dan natrium klorida berfungsi mempertahankan keseimbangan osmotik. Dekstrosa ini lebih disukai oleh Isolat 1 untuk pertumbuhannya sedangkan isolat 2 hanya dapat tumbuh dengan sumber karbon galaktosa dan glukosa. Isolat 12 cenderung menyukai glukosa tetapi masih dapat tumbuh dengan sumber karbon sukrosa, dekstrosa dan galaktosa walaupun pertumbuhannya jauh lebih rendah dibandingkan dengan glukosa. Hasil ini menunjukkan bahwa ke-3 isolat cenderung menggunakan sumber karbon dalam bentuk monosakarida, jika diberikan dalam bentuk disakarida (sukrosa dan maltosa) pertumbuhan menurun dan dalam bentuk maltosa pertumbuhan tidak ada sama sekali.

BAB V PENUTUP

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Tiga isolat rhizobakteria dari rhizosfir *Tithonia* yakni Isolat 1, Isolat 2 dan Isolat 12 mampu melakukan aktivitas fiksasi nitrogen dan mendegradasi glifosat secara optimum pada media pH 6,0 dan mampu berkembang dengan baik pada media dengan menggunakan sumber karbon dekstroza.
2. Pada pengujian suhu kondisi optimum bagi pertumbuhan isolat bakteri untuk Isolat 1 dan Isolat 2 adalah 25°C sedangkan pada Isolat 12 suhu optimum pertumbuhan pada 20°C. Secara umum bakteri ini dikelompokkan kedalam bakteri mesofilik.
3. Dari hasil pengujian dengan berbagai macam sumber karbon yang berbeda menunjukkan bahwa ternyata pertumbuhan ketiga isolat bakteri terbaik terdapat pada media dengan sumber karbon dekstroza. Dimana OD pada Isolat 1 mencapai 0,073, pada Isolat 2 mencapai 0,039 dan pada Isolat 12 mencapai 0,080. Sedangkan pada media dengan sumber karbon maltosa pertumbuhan ketiga isolat bakteri terhenti.
4. Pada pengujian kemampuan rhizobakteria dalam degradasi glifosat pertumbuhan bakteri pada media B (tanpa C dan N) lebih tinggi dibandingkan media lain. Hal ini menunjukkan kandungan fosfor dalam media sangat mempengaruhi ketiga isolat bakteri dalam menggunakan sumber C dan N dari glifosat.
5. Ketiga isolat bakteri terlihat mempunyai kemampuan terutama dalam memutuskan ikatan C-P dari senyawa glifosat dan menghasilkan fosfonat dan sarkosin dibandingkan ikatan C-N pada struktur glifosat yang menghasilkan produk asam Amino Methyl Phosphonic Acid (AMPA).

B. Saran

Dari hasil penelitian disarankan perlunya identifikasi lebih lanjut terhadap isolat yang diperoleh untuk mendapatkan spesies yang pasti melalui teknik biomolekuler.

RINGKASAN

Tanah merupakan sesuatu ekosistem dimana di dalamnya dihuni oleh berbagai biota tanah baik makro dan mikrofauna serta berbagai mikroflora. Biota tanah berperan memberikan keuntungan bagi pertumbuhan tanaman berfungsi dalam siklus hara dalam tanah. Salah satunya adalah fiksasi nitrogen.

Meningkatnya produksi hasil pertanian sering menggunakan senyawa simtetik untuk mengendalikan hama dan penyakit serta tumbuhan pengganggu. Salah satu bahan utama senyawa sintetik yang biasa digunakan adalah senyawa glifosat. Penggunaan senyawa glifosat yang berulang dan pada waktu yang lama dari hasil penelitian menunjukkan tanaman sering terserang bakteri. Salah satu tanaman yang terserang yaitu tanaman titonia.

Titonia (*Tithonia diversifolia*) merupakan tumbuh semak family *Asteraceae* yang mempunyai keunggulan sebagai tanaman pupuk hijau. Titonia dapat memperbanyak diri secara vegetatif dan generatif serta dapat bertahan hidup dalam lingkungan yang agak ekstrim seperti tanah yang miskin hara dan dapat dijadikan pagar lorong sehingga tanaman ini selalu ada dilapangan berdekatan dengan tanaman pokok yang berkemungkinan besar sewaktu menyang menggunakan glifosat.

Bakteri yang dapat memfiksasi nitrogen lebih banyak dijumpai pada rhizosfir dari pada daerah non-rhizosfir (Franche *et al.*, 2009). Kondisi rhizosfir yang optimal bagi pertumbuhan bakteri pemfiksasi N seperti suhu, pH dan sumber karbon akan menyebabkan N yang ditambahnya semakin maksimal. Lingkungan rhizosfir yang sangat mempengaruhi kehidupan bakteri pemfiksasi N adalah ketersediaan senyawa karbon (C) yang dibutuhkan (Curl dan Bryan, 1985).

Berdasarkan latar belakang maka dilakukan penelitian yang berjudul "KARAKTERISASI BAKTERI ENDEMIK PEMFIKSASI N PADA RHIZOSFIR *Tithonia diversifolia* DALAM MENDEGRADASI GLIFOSAT". Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri endemik pada rhizosfir titonia yang dapat mendekomposisi glifosat tetapi juga mampu melakukan fiksasi nitrogen dan untuk mengetahui kondisi terbaik bagi pertumbuhan rhizobakteria pemfiksasi nitrogen serta aktifitasnya dalam dekomposisi glifosat.

Penelitian ini telah dilaksanakan di Kebun Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang untuk pengambilan sampel rhizosfir titonia dan pengamatan bakteri dilaksanakan di Laboratorium Biologi Tanah Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Pengambilan sampel tanah dari rhizosfir titonia diambil dari titonia yang tumbuh secara alami disekitar Kebun Percobaan. Bongkahan kecil tanah yang masih melekat pada perakaran halus tanaman digunakan dalam penelitian ini dan diambil secara komposit. Pengamatan bakteri di Laboratorium Biologi Tanah dengan mengkarakterisasi bakteri.

Data yang diperoleh dari penelitian ini secara sederhana disusun dalam bentuk grafik, tabel dan gambar. Isolat bakteri yang dihasilkan akan ditampilkan berupa foto disertai keterangan yang menjadi dasar pertumbuhan terhadap bakteri pemfiksasi nitrogen. Untuk analisis statistik pada karakterisasi uji temperatur dilakukan pada data yang paling bagus dari tiap perlakuan dengan menggunakan rancangan acak lengkap yang kemudian dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf nyata 5 %.

Hasil data yang diperoleh pada penelitian ini adalah isolat rhizobakteria yang tumbuh dengan menggunakan media DL Malic Acid yaitu tiga isolat rhizobakteria yakni Isolat 1, Isolat 2 dan Isolat 12 mampu melakukan aktifitas memfiksasi nitrogen dan mendegradasi glifosat pada media optimum pada pH 6,0 dan mampu berkembang dengan baik pada media dengan menggunakan sumber karbon dekstrosa. Pada pengujian suhu kondisi optimum bagi pertumbuhan isolat yang tumbuh baik yaitu 25°C pada isolat 1 dan 2 sedangkan pada isolat 12 suhu optimum pertumbuhan bakteri yaitu 20°C. Bakteri ini dikelompokkan kedalam bakteri mesofilik. Pengujian kemampuan rhizobakteria dalam degradasi glifosat menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri pada media kultur asam malat dengan tanpa sumber C dan N dalam media lebih tinggi dibandingkan media lain yang dicobakan. Kandungan fosfor dalam media sangat mempengaruhi ketiga isolat bakteri dalam menggunakan sumber C dan N dari glifosat

DAFTAR PUSTAKA

- Agustian. 2008. *Isolasi dan Karakterisasi Rhizobakteria Penghasil IAA dari Rhizosfir Titonia (Tithonia diversifolia)*. Artikel Penelitian Program Penelitian Fundamental. Laboratorium Biologi Tanah Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang. 14 hal.
- Agustian., R. Syafei., dan L. Maira. 2012. *Keragaman Bakteri Penambatan N Pada Rhizosfir Titonia (Tithonia diversifolia) Yang Tumbuh Pada Tanah Masam Ultisol*. Jurnal Solum (9:2), 98–105.
- Amrhein, N., B. Deus, P. Gehrke, and H. C. Steinrücken. 1980. *The Site of The Inhibition of The Shikimate Pathway By Glyphosate*. Plant Physiol. 66:830–834.
- Arhens, W.H. 1994. *Herbicide Handbook. 7th Edition*. Weed Science Society of America. Champaign. I.L. pp. 149-152.
- Aryantha, I.NY.P., P.L Dian. & P.D.P Nurmi. 2004. *Potensi Isolat Bakteri Penghasil IAA dalam Peningkatan Pertumbuhan Kecambah Kacang Hijau Pada Kondisi Hidroponik*. Mikrobiol Indones. 9: 43-46.
- Asman, A. 2009. *Isolasi Rhizobakteria Dari Titonia (Tithonia diversifolia) dan Reinokulasinya Sebagai Inokulan Untuk Memacu Pertumbuhan Dalam Budidaya Titonia Pada Ultisol*. Tesis S2, Program Pascasarjana. Universitas Andalas. Padang.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilory and J. M. Vivanco. 2006. *The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms*. Annu. Rev. Plant Biol. 57, 233-66 doi: 10.1146/ annurev.arplant 57.032905.105159.
- Barsanti, L., and P. Gualteri. 2006. *Algae, Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, Taylor & Francis Group. USA:301 hal.
- Bashan, Y., & Holguin, G. 1998. *Proposal for The Division of Plant Growth Promoting Rhizobacteria into Two Classifications Biocontrol PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB*. Soil Biol Biochem. 30: 1225-1228.
- Borggaard, O.K., and A.L. Gimsing. 2008. *Fate of Glyphosate In Soil and The PossiBility of Leaching to Ground and Surface Waters*. Pest Management Science. 64 (4). 441-456.

- Bowen, G.D., and A.D. Rovira. 1981. *The Effect of Microorganisms on Plant Growth. I. Development of Root Hairs In Sand and Agar*. Plant soil, 15: 166 – 186.
- Burr, T.J., M.N. Scroth., and T. Suslow., 1978. *Increased Potato Yields by Treatment of Seed Pieces With Specific Strains of Pseudomonas Fluorescens and P. Putida*. Phytopathology. 68: 1377-1383.
- Busse M.D., A.W. Ratcliff., C.J. Shestak., R.F. Powers., 2001. *Glyphosate Toxicity and the Effects of Long Term Vegetation Control on Soil Microbial Communities*. Soil Biol. Biochem., 33: 1777-1789.
- Carlisle, S. M., and J. T. Trevors. 1988. *Glyphosate In The Environment*. Water Air Soil Pollut.39:409-420.
- Cattelan, A.J., P.G. Hartel, and J.J. Fuhrmann. 1999, *Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth*. SSSAJ 63;
- Curld, E., dan T. Bryan. 1985. *The Rhizosphere Springer Verlag*. Berlin Heidelberg New York. Tokyo. Pp 290.
- Cycon, M. and S. P. Zofia. 2007. *Effect of Selected Pesticides on Soil Microflora Involved In Organic Mater and Nitrogen Transformations : Pot Experiment*. Polish Journal of Ecology, 55 (2) : 207-220.
- Dewi A., I. Ratna. 2007. *Fiksasi N Biologis Pada Ekosistem Tropis*. Program Pasca Sarjana. Universitas Padjadjaran Bandung. Bandung.69 hal.
- Dewick, P. M. 1998. *The Biosynthesis of Shikimate Metabolites*. Nat. Prod. Rep. 15:17–58.
- Franché, C., K. Lindstrom., and C. Elmerich. 2009. *Nitrogen-Fixing Bacteria Associated With Leguminous and Non-Leguminous Plants*. Plant Soil.321 : 35–59–DOI 10.1007/S 11104–008–9833–8.
- Fuhrmann, J. J. 1998. *Microbial Metabolisms*. In Principles and Applications of Soil Microbiology (Editors: Sylvia D. M., JJ Fuhrmann, P. G. Hartel, D. A Zuberer) Prentice Hall, New Jersey, pp 189-217.
- Glick, B.R. 1995. *The Enhancement of Plant Growth by Free-Living Bacteria*. Can J. Microbiol. 41: 109-117.

- Hakim, N dan Agustian. 2003. *Gulma Titonia dan Pemanfaatannya Sebagai Unsur Hara untuk Tanaman Hortikultura*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI/I Perguruan Tinggi. Fakultas Pertanian Universitas Andalas. 62 hal.
- Hakim, N., Agustian., Oksana. E.Fitra., and R. Zamora. 2004. *Amelioration of Acid Soil Infertility by (Titonia diversifolia) Green Manure and Lime Application*. In Proceeding 6th International Symposium Plant-Soil Interaction at low pH (PSILPH) on 1-5 August 2004 in Sendai Japan. pp 366-367.
- Hakim, N dan Agustian. 2005a. *Cultivation of (Titonia diversifolia) as a Sources of Organic Matter and Plant Nutrients*. In Proceeding 15th International Plant Nutrition Colloquium on 14-19 September, 2005. C.J.Li *et al* (eds). Plant Nutrition for Food Security, Human Health and Environmental Protection.. Tsinghua University Press. Beijing-China. pp 996-997.
- Hakim, N dan Agustian. 2005b. *Budidaya Titonia dan Pemanfaatannya Dalam Usaha Tani Tanaman Hortikultura dan Tanaman Pangan Secara Berkelanjutan Pada Ultisol*. Laporan Penelitian Tahun III Hibah Bersaing XI/III. Proyek Peningkatan Penelitian Perguruan Tinggi DP3M Ditjen Dikti. Lembaga Penelitian Unand. Padang.61 hal.
- Hakim, N. dan Agustian. 2012. *Titonia untuk Pertanian Berkelanjutan*. Universitas Andalas. Padang.351 hlm.
- Hakim, N., M. Y. Nyakpa., A. M. Lubis., S. G. Nugroho., M. R. Saul., M. A. Diha., G. B. Hong., dan H. H. Bailey. 1986. *Dasar-Dasar Ilmu Tanah*. Universitas Lampung. 488 hlm.
- Hardjowigeno, S. 2010. *Ilmu Tanah*. Akademika Pressindo. Jakarta.151 hal.
- Irianto, M. Y. dan M. Johannis. 2009. *Peranan Herbisida dalam Sistem Olah Tanah Konservasi untuk Menunjang Ketahanan Pangan*. Prosid. Konf.XVIII Himpunan Ilmu Gulma Indonesia (HIGI), Bandung 30-31 Oktober 2009. p.184 -197
- Jama, B., C. A. Palm, R.J. Buresh, A. Niang, C. Gachengo, G. Nziguheba, B. Amadalo. 2000. *Tithonia diversifolia as a Green Manure for Soil Fertility Improvement in Western Kenya: a Review*. *Agroforest. System* 49 : 201-221.
- Karyanto, A. 1996. *Rekayasa Tanaman Resisten terhadap Herbisida : Konsep, Masalah dan Prospek*. Prosiding Konferensi XII/ dan Seminar Ilmiah HIGI:531-539. Bandar Lampung, 5-7 Nov. 1996.

- Kloepper, J.W., M.S.Reddy., D.S. Kenney, C. Vavrina., N. Kokalis-Burelle., and N. Martinez-Ochoa. 2004. *Applications for Rhizobacteria in Transplant Production and Yield Enhancement*. Acta Hort. 631: 219-229
- Knob, A and E.C. Carmona. 2008. *Xylanase Production by Penicillium sclerotiorum and Its Characterization*. World Applied Sciences Journal 4(2): 277-283.
- Knuutila, P., dan H. Knutila. 1985. *Molecular and Crystalline Structure Glyphosate*. Pp. 18–22. In E. Grossband and D. Atkinson. *The Herbicide Glyphosate* Butterworths Co. London.
- Lamid, Z., dan Azwir. 1997. *Tingkat Penggunaan Herbisida Dewasa Ini dan Dampaknya Terhadap Sumberdaya Lingkungan*. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sukarami. Solok.
- Leung, Sandra, and Tri Pham. 2000. "Glyphosate Metabolism in Bacteria and Plants". *Herbicides Resistance*. Toronto. <http://www.google.com> (14 Juni 2013).
- Malik, J., G. Barry and G. Kishore.1989. *A Mine-Review of The Herbicide Glyphosate*". *Biofactors* 2 (1) : 17-25.
- Matheson, K.L. 1996. "Surfactant Raw Material: Clasification, Synthesis, and Uses". In: Spitz, L. (Edl. *Soap and Detergent: A Theoretical and Pratical Review*. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Merrington, G., L. Winder, R. Parkinson and M. Redman. 2002. *Agricultural Pollution Environmental Problem and Oractical Solution*. Spon press. London. 243 p.
- Moenandir, J. 1990. *Fisiologi Herbisida*. Rajawali Press. Jakarta. 143 hal.
- Moenandir, J. 1993. *Pengantar Ilmu dan Pengendalian Gulma*. Rajawali Press. Jakarta. 122 hal.
- Moneke, A.N., G.N. Okpala., and C.U. Anyanwu 2010. *Biodegradation of Glyphosate Herbicide In Vitro Using Bacterial Isolates From Four Rice Fields*. Department of Microbiology, University of Nigeria, Nsukka, Enugu State, Nigeria. (jurnal).Vol. 9 (26).
- National Pesticide Telecommunications Network. November 2000. *Glyphosate (General Fact Sheet)*. Oregon State University. 333 Weniger Hall, Corvallis, Oregon. 97331-6502.

- Olivares, E., E. Pena, G. Agular. 2002. *Metals and Oxalate in Thitonia diversolia (Asteraceae): Concentrations in Plants Growing in Contrasting Soils, and Al Induction of Oxalate Exudation by Roots*. *J. of Plant Physiol.*, 159 (7), p. 743-749.
- Pipke, R., N. Amrhein, 1987. *Degradation of The Phosphonat Herbicide Glyphosate by Athrobacter antrocyaeus ATTC 13752*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 54 (5).
- Rao, N.S.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman. Edisi kedua*. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 353 halaman.
- Rosmarkam, A. 2002. *Ilmu Kesuburan Tanah*. Yogyakarta: Penerbit Kanisus.
- Santos, J. B., EA. Ferreira., C.M.T. Fialho Fialho, Santos, E.A., Galon. L., Conceco., Asiazu, I., Silva, A.A. 2009. *Biodegradation of Glyphosate in Rhizospheric Soil Cultivated With Glycine max, Canavalia ensiformis E Stizolobium aterrimum*. *Palanta Daninha, Vicosa-MG (27:4)* p. 781-787.
- Sastroutomo, S. Soetikno. 1992. *Pestisida, Dasar-Dasar dan Dampak Penggunaannya*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 186 hal.
- Shaner, D. and D. Bridges. 2003. *Inhibitors of Aromatic Amino Acid Biosynthesis (glyphosate)*. In: *Herbicide Action Course*. West Lafayette: Purdue University,, p. 514-529.
- Shushkova T.V, I.T Ermakova, A.V Sviridov and A.A Leontievsky. 2012. *Biodegradation of glyphosate by soil bacteria: Optimization of cultivation and the method for active biomass storage*. *Microbiol.* 81:44-50.
- Sommers E, J Vanderleyden, M. Srinivasan. 2004. *Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet*. *Crit Rev Microbiol* 30:205–240
- Sprankle, P., W. F. Meggit., D. Penner. 1975. *Absorption, Mobility and Microbial Degradation of Glyphosate In The Soil*. *Weed Sci* 23 : hal 229-234.
- Springett, J., R. Gray. 1992. *Effect of Repeated Low Doses of Biocides On Porrectodea Calignosa In Laboratory Culture*. *Soil Biology and iochemistry* 24(12):1739-1744.

- Srikandi. 2010. *Hubungan Antara Tingkat Residu Pestisida dan Komunitas Biota Tanah Pada Lahan Padi Sawah*. Tesis pada Institut Pertanian Bogor. Bogor. 103 hal.
- Supriadi. 2012. *Pengembangan Formulasi Herbisida Berbasis Asam Asetat untuk Mengendalikan Gulma Pada Tanaman Kelapa Sawit*, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Bogor. Bogor. 31 Hal.
- Surkarminah, Een., Sumanti, M. Debby, dan Hanidah. 2008. Dalam Jurnal Nova Nurfakziawati "Pengaruh Suhu Beku Terhadap Mikroba Pada Bahan Pangan" *Mikrobiologi Pangan*. Penerbit Universitas Padjajaran. Jatinagor. 10 hal.
- Sviridov, A. V., T. V. Shushkova, , N. F. Zelenkova, N. G. Vinokurova, I. G. Morgunov, I. T. Ermakova, and A.A. Leontievsky. 2011. *Distribution of Glyphosate and Methylphosphonate Catabolism Systems In Soil Bacteria Ochrobactrum Anthropic and Achromobacter sp.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 93: 787-796.
- Syafei, R. 2012. *Penapisan dan Karakterisasi Azotobacter dan Rhizosfir Titonia (Tithonia diversifolia) yang Tumbuh di Ultisol*. Skripsi Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang. 68 halaman.
- Tarigan, R.S., Jamilah It, Elimasni. 2010 *Seleksi Bakteri Penambat Nitrogen dan Penghasil Fitohormon IAA dari Rhizosfer Tanah Perkebunan Kedelai (Skripsi)* Universitas Sumatra Utara. Medan. 7 Hal.
- Taiwo, L. B., B. A. OSO., 1997. *The Influence of Some Pesticides on Soil Microbial Flora in Relation to Changes in Nutrient Level, Rock Phosphate Solubilization and P Release Under Laboratory Conditions*. Agric. Ecosyst. Environ., v. 65, n. 1, p. 59-68
- Taylor, N.B., R.L. Fuchs, J. Mac Donald., A. R. Shariff. and S.R Padgette. 1999. *Compositional Analysis of Glyphosate-Tolerant Soybeans Treated With Glyphosate*. Journal Agriculture. Food Chem. 47: 4469-4473.
- Tu, C.M. 1994. *Effects of Herbicides and Fumigants on Microbial Activities in Soil*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 53:12-17.
- Tu, C. M., R. Hur. Robison and J.M. Randall. 2001. *Weed Control Methods Handbook, The Nature Conservancy*. 10 Hal.

- Vlastimil, V dan F. Kunch. 1988. *Soil Microbial Associations*. Prague. Institut of Microbiology of the Czechoslovakia Academy of Sciences. Czechoslovakia. P 84-130.
- Wahyudi, A.P. 2002. *Pengaruh Herbisida Glifosat dan Pengapuran Terhadap Perkembangan Populasi Bakteri dan Jamur serta Pertumbuhan Tanaman (Glycine max (L)Merr) pada Ultisol, Skripsi pada Fakultas Pertanian. Universitas Andalas Padang, Padang.71 hal.*
- Wardoyo. S.S.,O. Haridjaja., Widiatmaka. 2001. *Distribusi Glifosat Didalam Tanahdan Pengaruhnya Terhadap Ciri Tanah Serta Pertumbuhan Kedelai (Jurnal).Institut Pertanian Bogor. Bogor. Vol 10 (2).*
- Wiersema, R., M. Burns., and D. Hersberger. 1999. *Glyphosate Pathway Map. BBD Master@email.labmed.umn.edu Univ.of Minnesota.40 hal.*
- Wollum, A.G. 1994. *Soil Sampling for Microbiological Analysis In Metods of Soil Analysis Part 2 Microbiological and Biochemical Properties ed R.W. Weaver et.al. Soil Sci. Soc. Am. Inc.*

Lampiran 2. Alat dan Bahan Untuk Analisis

Alat Untuk Analisis

No	Alat	Jumlah	Satuan
1	Alat tulis	1	Buah
2	Autoklaf	1	Unit
3	Ayakan 2 mm	1	Buah
4	Botol Schott 250 ml	10	Buah
5	Bunsen	2	Buah
6	Colony Counter	1	Buah
7	Cutter	2	Buah
8	Ember	1	Buah
9	Erlenmeyer 250 ml	4	Buah
10	Gelas Piala 500 ml	2	Buah
11	Gelas Ukur 500 ml	2	Buah
12	Haemacytometer	1	Unit
13	Hotplate	1	Unit
14	Inkubator	1	Unit
15	Jarum ose	5	Buah
16	Kaca perata(spreader)	1	Buah
17	Kamera Digital	1	Unit
18	Laminar Air Flow	1	Unit
19	Mikropipet	20	Unit
20	Mikroskop	1	Buah
21	Petridish	100	Unit
22	pH meter	1	Unit
23	Refrigerator	1	Unit
24	Shaker	1	Unit
25	Standar Test Tube	10	Buah
26	Test tube	400	Buah
27	Timbangan Analitik	1	Unit
28	Spektrofotometer	1	Unit

Bahan Untuk Analisis

No	Bahan	Jumlah	Satuan
1	Agar	60	gram
2	Alkohol	2	liter
3	Aluminium foil	3	kotak
4	Aquadest	5	liter
5	DL Malic Acid	15	gram
6	NA (Nutrient Agar) instans	20	gram
7	FeCl ₃ .6H ₂ O	45	miligram
8	HCl	50	ml
9	K ₂ HPO ₄	1,5	gram
10	Kantong Plastik	1	pak
11	Kertas Label	1	kotak
12	KOH	20	gram
13	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6	gram
14	NaCl	0,3	gram
15	Na ₂ MOO ₄ .2H ₂ O	6	miligram
16	Pepton	15	gram
17	Plastik Wrap	3	kotak
18	Yeast Ektrak	1,5	gram
19	NB (Nutrient Broth) instans	10	gram

Lampiran 3. Prosedur Pengambilan Sampel dan Pembuatan Media Kultur

a. Pengambilan Sampel Rhizosfir Titonia

Rhizosfir merupakan porsi tanah yang langsung dipengaruhi akar tanaman. Batas rhizosfir dimulai dari permukaan akar sampai ke batas dimana akar tidak lagi berpengaruh langsung terhadap kehidupan mikroba (bisa mencapai 5mm). Proses isolasi diawali dengan pengambilan sampel tanah rhizosfir dari *Tithonia diversifolia* yang tumbuh pada tanah masam Ultisol.



Gambar 8. Sampel tanah rhizosfir titonia

Butiran tanah yang masih melekat pada akar tanaman titonia setelah digoyang-goyang kemudian dipisahkan dari akar dan merupakan tanah rhizosfir dari titonia (Gambar 8). Selanjutnya tanah tersebut diayak dan kemudian dimasukkan dalam tabung PV steril dan siap digunakan untuk percobaan selanjutnya. Sampel tanah rhizosfir dalam penelitian ini dipilih dari rhizosfir *Tithonia diversifolia* yang tumbuh pada kebun percobaan Fakultas Pertanian Universitas Andalas di Limau Manis Padang ($0^{\circ}54'36''$ S dan $100^{\circ}28'18''$ E).

Tanah diklasifikasikan sebagai Ultisol dengan tanah bertekstur liat (pH 5.48 dan kejenuhan basa 19,1%). Seluruh perakaran tanaman berikut tanah yang masih berpegang pada akar, secara acak dikumpulkan dari lapangan dan diangkat ke laboratorium. Sampel tanah dari masing-masing rhizosfir (tanah yang melekat

di akar) dicampur dan diaduk merata, dimasukkan ke dalam kantong plastik steril dan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan (Moneke et al., 2010).

Proses berikutnya, dibuat suspensi tanah rhizosfer dengan melarutkan 1 g tanah dalam 9 ml aquades (Moneke et al., 2010) dan selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-6} untuk penghitungan populasi melalui kultur pada petri dish berisi media agar.

b. Prosedur Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Bahan : NA instans dan aquades

Cara kerja : Pembuatan media NA adalah dengan menggunakan bahan NA instan. Ditimbang NA instan sebanyak 16,5 g dan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 900 ml, selanjutnya dikocok sampai homogen dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm selama 1,5 jam pada suhu 121°C selama 20 menit. Selanjutnya media didiamkan (hangat-hangat kuku) lalu dituang pada petri steril (\pm 15 ml media pada setiap cawan petri).

c. Prosedur Pembuatan Media Nutrient Broth (NB)

Bahan : NB instans dan aquadest

Cara kerja : Pembuatan media Nutrient Broth (NB) adalah dengan menggunakan bahan Nutrient Broth (NB) instan. Ditimbang sebanyak 5 g NB instan dan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 900 ml, selanjutnya dikocok sampai homogen. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm selama 1,5 jam pada suhu 121°C. setelah itu di dinginkan dan media sudah bisa digunakan.

d. Prosedur Pembuatan Media DL Malic Acid

Bahan : K_2HPO_4 , NaCL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$, yeast ekstrak, agar, KOH, DL Malic Acid dan aquadest.

Cara Kerja : Pembuatan media DL Malic Acid adalah Ditimbang bahan kimia berikut ini masing-masing seberat: K_2HPO_4 0,5g; NaCL 0,1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 15 mg; $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$ 2 mg; yeast ekstrak 0,5 g; agar 20 g; KOH 4,8 g; DL Malic Acid 5 g; dan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 1 liter, selanjutnya dikocok sampai homogen. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm selama 1,5 jam pada suhu 121°C

selama 20 menit. Selanjutnya media didiamkan (hangat-hangat kuku) lalu dituangkan pada petri steril (± 15 ml media pada setiap cawan petri).

i. Komposisi media DL Malic Acid tanpa C dan N

Bahan : K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$, agar, KOH dan aquadest. Cara Kerja : Pembuatan media DL Malic Acid tanpa C dan N adalah Ditimbang bahan kimia berikut ini masing-masing seberat: K_2HPO_4 0,5g; NaCl 0,1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 15 mg; $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$ 2 mg; agar 20 g; KOH 4,8 g; dan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 1 liter, selanjutnya dikocok sampai homogen. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm selama 1,5 jam pada suhu $121^\circ C$ selama 20 menit. Selanjutnya media didiamkan (hangat-hangat kuku) lalu dituangkan pada petri steril (± 15 ml media pada setiap cawan petri).

ii. Komposisi media DL Malic Acid tanpa C dan P

Bahan : NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$, yeast ekstrak, agar, KOH dan aquadest. Cara Kerja : Pembuatan media DL Malic Acid tanpa C dan P adalah Ditimbang bahan kimia berikut ini masing-masing seberat: NaCl 0,1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 15 mg; $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$ 2 mg; yeast ekstrak 0,5 g; agar 20 g; KOH 4,8 g; dan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 1 liter, selanjutnya dikocok sampai homogen. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm selama 1,5 jam pada suhu $121^\circ C$ selama 20 menit. Selanjutnya media didiamkan (hangat-hangat kuku) lalu dituangkan pada petri steril (± 15 ml media pada setiap cawan petri).

iii. Komposisi media DL Malic Acid tanpa C, P dan N

Bahan : NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$, agar, KOH dan aquadest. Cara Kerja : Pembuatan media DL Malic Acid tanpa C,P dan N adalah Ditimbang bahan kimia berikut ini masing-masing seberat: NaCl 0,1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 15 mg; $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$ 2 mg; agar 20 g; KOH 4,8 g; dan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 1 liter, selanjutnya dikocok sampai homogen. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm selama 1,5 jam pada suhu $121^\circ C$ selama 20 menit. Selanjutnya

media didiamkan (hangat-hangat kuku) lalu dituangkan pada petri steril (± 15 ml media pada setiap cawan petri).

Lampiran 4. Penetapan Konsentrasi Glifosat dan Pengamatan Kultur

a. Perhitungan Jumlah Konsentrasi Glifosat

Roundup berbahan aktif *Isopropilamina* glifosat 486 g/ l setara dengan 360 g/ l glifosat. Dosis penggunaan dilapangan 3-6 l/ha. BM Glifosat = 169 g artinya dalam 1 liter Roundup konsentrasi glifosat adalah $360/169 \text{ M} = 2,130 \text{ M} = 2130 \text{ mM}$. Roundup 360 g/ l = dalam 1 ml terdapat glifosat 0,36 g glifosat = 360 mg glifosat/ml. Untuk mendapat deretan konsentrasi final dalam media kultur (vol 5 ml) padat dan cair: 2,8; 4,5; 7,2; 11, 52; 14,4 mg/ ml media kultur padat dan cair maka diperlukan pengenceran bertingkat dengan cara berikut :

i. Konsentrasi final 14,4 mg/ ml (persiapan 1 isolat dan 10 test tube)

Dipipet sebanyak 2 ml larutan glifosat 360 mg/ml dan kemudian ditambahkan 3 ml H₂O sehingga pengenceran sebanyak 25 kali dengan konsentrasi menjadi 144 mg/ml. Selanjutnya dipipet 0,5 ml glifosat konsentrasi 144 mg/ml kemudian ditambahkan 4,5 ml media kultur sehingga diperoleh pengenceran 10 kali dengan konsentrasi final 14,4 mg/ml.

ii. Konsentrasi final 11,2 mg/ml (persiapan untuk 1 isolat dan 10 test tube)

Dipipet sebanyak 2 ml larutan glifosat 360 mg/ml dan kemudian ditambahkan 4,44 ml H₂O sehingga pengenceran sebanyak 3,21 kali dengan konsentrasi menjadi 112 mg/ml. Selanjutnya dipipet 0,5 ml glifosat konsentrasi 112 mg/ml kemudian ditambahkan 4,5 ml media kultur sehingga diperoleh pengenceran 10 kali dengan konsentrasi final 11,2 mg/ml.

iii. Konsentrasi 7,2 mg/ml (persiapan untuk 1 isolat dan 10 test tube)

Dipipet sebanyak 1 ml larutan glifosat 360 mg/ml dan kemudian ditambahkan 4 ml H₂O sehingga pengenceran sebanyak 5 kali dengan konsentrasi menjadi 72 mg/ml. Selanjutnya dipipet 0,5 ml glifosat konsentrasi 72 mg/ ml kemudian ditambahkan 4,5 ml media kultur sehingga diperoleh pengenceran 10 kali dengan konsentrasi final 7,2 mg/ml.

iv. Konsentrasi 4,5 mg/ml (persiapan untuk 1 isolat dan 10 test tube)

Dipipet sebanyak 1 ml larutan glifosat 360 mg/ml dan kemudian ditambahkan 7 ml H₂O sehingga pengenceran sebanyak 8 kali dengan konsentrasi menjadi 45 mg/ml. Selanjutnya dipipet 0,5 ml glifosat konsentrasi 45 mg/ml kemudian

ditambahkan 4,5 ml media kultur sehingga diperoleh pengenceran 10 kali dengan konsentrasi final 4,5 mg/ml.

v. Konsentrasi 2,8 mg/ml (persiapan untuk 1 isolat 10 test tube)

Dipipet sebanyak 1 ml larutan glifosat 360 mg/ml dan kemudian ditambahkan 11,8 ml H₂O sehingga pengenceran sebanyak 12,8 kali dengan konsentrasi menjadi 2,8 mg/ml. Selanjutnya dipipet 0,5 ml glifosat konsentrasi 28 mg/ml kemudian ditambahkan 4,5 ml media kultur sehingga diperoleh pengenceran 10 kali dengan konsentrasi final 2,8 mg/ml.

Lampiran 5. Tabel Sidik Ragam Analisis Statistik Pengujian Pada Suhu Inkubasi

1. Analisis Statistik Untuk Populasi Bakteri

Tabel 3 Sidik Ragam Isolat 1

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hitung		F-tabel		P-value
						5%	1%	
Perlakuan	4	0.11	0.03	105.19	**	3.48	5.99	0.000
Galat	10	0.00	0.00	KK = 9.97%				
Total	14	0.11						

Tabel 4 Sidik Ragam Isolat 2

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F-hitung		F-tabel		P-value
						5%	1%	
Perlakuan	4	0.13	0.03	327.54	**	3.48	5.99	0.000
Galat	10	0.00	0.00	KK = 6.06%				
Total	14	0.13						

Tabel 5 Sidik Ragam Isolat 12

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hitung		F-tabel		P-value
						5%	1%	p-value
Perlakuan	4	0.16	0.04	65.56	**	3.48	5.99	0.000
Galat	10	0.01	0.00	KK = 3.43%				
Total	14	0.17						