Menara Perkebunan, 2009, 77(2), 110-124.

Potensi *Pseudomonas fluorescens* strain KTSS untuk bioremediasi merkuri di dalam tanah

The Potential use of Pseudomonas fluorescens *KTSS strain formercury bioremediation in the soil*

Laksmita Prima SANTI & Didiek Hadjar GOENADI

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor 16151, Indonesia

Summary

Heavy metals are widespread pollutants in soil and become environmental concern as they are non-degradable and highly persistent. Solid and/or liquid wastes containing toxic heavy metals may be generated in various industrial or mining processes. A heavy metal resistant bacterium may be present in the soil and mining site. As they already preconditioned by abundant heavy metals contaminant, the use of these bacterium is assumed to be effective in improving metals reduction. To obtain bacterial isolates highly capable of mercury (Hg) reduction, isolation activities have been conducted at selected sites of mining locations in South Sumatera. The highly potential bacteria possessing mercury reducing capability has been isolated from this site i.e. Pseudomonas fluorescens *KTSS strain. Inoculating of 25% (v/w) suspension of* P. fluorescens *KTSS strain in soil material added 5000 ppb of mercury, could reduced about 53.3% of mercury soil contents. Best vegetative growth performance of cocoa seedlings was shown by the application of 15-15-15 NPK conventional fertilizers in combination with the addition of 1.6 – 3.25 g of* P. fluorescens *KTSS bio-ameliorant/seed. A Greenhouse experiment results of cocoa seedlings were in concordance with those obtained from field trials of paddy.*

[*Key words*: Soil bio-ameliorant, heavy metal, cacao seedling, paddy.]

Ringkasan

Logam berat merupakan jenis polutan yang terdistribusi secara luas di dalam tanah dan mendapat perhatian secara khusus karena sifatnya yang tidak dapat terdegradasi serta dapat bertahan lama di dalam lingkungan. Limbah padat dan/atau cair yang dihasilkan dari berbagai proses industri dan pertambangan mengandung logam berat toksik. Jenis bakteri yang resisten terhadap logam berat mungkin berada di dalam tanah dan di lokasi tambang. Apabila bakteri tersebut dapat beradaptasi pada lingkungan dengan tingkat kontaminasi logam berat yang tinggi, maka diasumsikan bahwa penggunaan bakteri tersebut sangat efektif dalam meningkatkan reduksi logam berat. Untuk memperoleh isolat bakteri yang memiliki kemampuan mereduksi merkuri (Hg), maka satu rangkaian kegiatan isolasi telah dilakukan di lokasi tambang terpilih di Sumatera Selatan. Bakteri potensial pereduksi merkuri yang telah diisolasi dari lokasi ini diidentifikasi sebagai *Pseudomonas fluorescens* strain KTSS. Inokulasi sebanyak 25% (v/b) suspensi *P. fluorescens* strain KTSS ke dalam bahan tanah yang telah ditambah dengan 5000 ppb merkuri, dapat mereduksi sekitar 53,3% kandungan merkuri di dalam tanah. Pertumbuhan terbaik dari bibit kakao diperoleh dari perlakuan pupuk NPK 15-15-15 yang dikombinasikan dengan 1,6 – 3,25 g bioamelioran *P. Fluorescens* strain KTSS/bibit. Pengujian bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS di lapang pada tanaman padi memberikan pola keefektifan yang sama dengan hasil pengujian terhadap bibit kakao yang dilakukan di rumah kaca.

Pendahuluan

Upaya penanggulangan bahaya pencemaran yang diakibatkan oleh merkuri telah banyak dilakukan. Berdasarkan asumsi bahwa baik tanaman maupun bakteri merupakan agens biologi penting yang dapat digunakan untuk bioremediasi, maka beberapa tahun terakhir ini bidang mikrobiologi terapan dan biologi molekular menjadi dasar pengembangan teknologi bioremediasi dengan memanfaatkan bakteri yang dapat mereduksi merkuri. Hasil penelitian Benyehuda *et al*. (2003) menunjukkan respons penghambatan pertumbuhan yang sangat bervariasi dari bakteri aerobik kemoheterotrop yang diisolasi dari dasar permukaan sedimen di dalam medium pepton – tripton – yeast - glukosa (PTYG) dengan kertas cakram yang mengandung 2 µmol Cr(VI), 50 nmol Hg(II), dan 500 nmol Pb(II). Hal ini diduga karena bakteri Gram positif dan Gram negatif secara prinsip memiliki perbedaan satu dengan lainnya dalam hal interaksi dengan logam (Giller *et al*., 1998). Bakteri Gram negatif menunjukkan toleransi terhadap logam yang lebih besar daripada Gram positif karena memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks yang mampu mengikat dan mengimobilisasi ion logam termasuk Hg^{2+}. Ahmad *et al.* (2005) mengemukakan bahwa kemampuan bakteri menghasilkan polisakarida ekstraselular dapat melindungi sel dari pengaruh toksik logam berat. Hasil penelitiannya memberikan indikasi bahwa bakteri heterotrof yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung merkuri dengan konsentrasi 150-200 µg/g akan mengalami penurunan viabilitas setelah 21 hari inkubasi. Kontaminasi yang diakibatkan oleh logam berat di alam tidak bersifat *biodegradable*. Namun demikian, sejumlah logam berat dan metaloid pengkontaminan penting bersifat kurang larut dan lebih volatil dalam bentuk tereduksi apabila dibandingkan dalam bentuk teroksidasi. Reaksi reduksi merkuri merupakan salah satu contoh reaksi reduksi logam larut menjadi bentuk volatil dengan persamaan reaksi sebagai berikut:

$Hg(II)+[H_2] \rightarrow Hg(0)+2\ H^-$ (Alloway, 1995).

Merkuri merupakan salah satu jenis polutan yang bersifat toksik. Umumnya merkuri dihasilkan dari sumber emisi industri, dan didistribusikan secara global dari sumber pengendapannya melalui atmosfer ke permukaan bumi. Bergantung pada kondisi redoks, merkuri terbentuk dalam tiga tingkatan valensi yang berbeda, yaitu sebagai Hg^o, Hg_2^{2+}, dan Hg^{2+}. Sifat penting merkuri lainnya adalah kemampuannya dalam mengikat ion sulfida secara kuat. Di dalam larutan tanah, fraksi Hg^{2+} hanya terbentuk dalam beberapa menit saja. Fraksi utama akan terikat dalam mineral tanah atau dijerap pada permukaan tanah, serta senyawa anorganik dan organik lainnya. Kadar merkuri di dalam tanah sangat bervariasi dan tergantung tingkat kedalaman khususnya pada tanah-tanah alami. Hal ini berarti bahwa kedalaman pengambilan contoh tanah merupakan suatu pedoman yang penting untuk memperoleh akurasi data. Pada tanah yang diolah, kadar merkuri dalam lapisan olah dengan kedalaman 0-20 cm cukup homogen karena adanya pengelolaan tanah (Alloway, 1995).

Sejumlah bakteri resisten terhadap merkuri telah diisolasi dari berbagai jenis lingkungan. Umumnya bakteri tersebut termasuk dalam kelompok baik bakteri Gram

negatif maupun Gram positif (Nascimento & Chartone-Souza, 2003). Bakteri ini memiliki mekanisme untuk mendetoksifikasi merkuri [operon resisten merkuri (*mer*)] berdasarkan pada mekanisme reduksi intraselular Hg^{2+} menjadi bentuk non-toksik Hg^{o} oleh enzim merkuri reduktase. Pilot plant untuk pengembangan teknologi bioremediasi merkuri pada limbah industri dilaporkan oleh Dobler (2003) dengan memanfaatkan *Pseudomonas putida*. Beberapa bakteri aerobik dan fakultatif mengkatalisasi proses reduksi Hg(II) menjadi Hg(0) seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* dan *Vibrio*. *Pseudomonas maltophilia* dapat mereduksi Cr^{6+} yang bersifat *mobile* dan toksik menjadi bentuk *immobile* dan nontoksik Cr^{3+} serta meminimumkan mobilitas ion toksik lainnya di lingkungan seperti Hg^{2+}, Pb^{2+} dan Cd^{2+} (Blake *et al*., 1993; Park *et al.,* 1999). Reduksi oleh bakteri tersebut dapat digunakan sebagai strategi remediasi untuk endapan terkontaminasi (Mullen, 1998). Percepatan laju reduksi Hg(II) oleh bakteri sangat memungkinkan untuk digunakan dalam teknik bioremediasi *in situ* di tanah atau air yang tercemar (Barkay *et al.,* 1991; Goldstein *et al*., 1988). Siklus dasar reaksi merkuri di dalam tanah dilakukan oleh bakteri dan hasilnya meliputi transformasi aerobik dan anaerobik yaitu dari Hg(II) ke monometil Hg dan selanjutnya menjadi metana dan Hg(0). Proses metilasi ini merupakan awal proses detoksifikasi bagi bakteri bersangkutan yang kemudian dilanjutkan dengan proses reduksi Hg(II) menjadi Hg(0). Dinamika merkuri di dalam tanah sangat dipengaruhi oleh nilai Eh. Pada Eh >0,4 v, merkuri larut berada dalam bentuk Hg(II) dan dalam kondisi reduksi lemah 0,2-0,4 v, sebagai Hg(0) atau Hg(II) dan semakin reduktif menjadi Hg(0) atau HgS (Klein & Thayer, 1995).

Berdasarkan kegiatan penelitian yang dilakukan di Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, telah diperoleh 17 isolat bakteri yang berpotensi mereduksi logam berat. Bakteri-bakteri tersebut diisolasi dari empat lokasi yang diduga mengandung logam merkuri yaitu Tambang batu bara Bukit Asam-Sumatera Selatan, tambang batu bara dan tambang emas dan intan di Kalimantan Selatan, serta tambang emas Pongkor dan Cikotok Jawa Barat. Hasil seleksi awal menunjukkan bahwa *P. fluorescens* strain KTSS dapat tumbuh baik di dalam medium agar Luria Bertani dengan kandungan 4000 ppm merkuri. Namun demikian, diperlukan pengujian lebih lanjut dengan menggunakan bahan tanah dan kondisi lapang untuk memperoleh gambaran yang lebih nyata mengenai potensi tersebut. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menetapkan potensi *P. fluorescens* strain KTSS yang diisolasi dari tambang batu bara Bukit Asam-Sumatera Selatan dalam mereduksi merkuri di dalam bahan tanah serta potensi pengembangannya sebagai bioamelioran untuk tanah bermasalah terhadap merkuri.

Bahan dan Metode

Mikroorganisme

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *P. fluorescens* strain KTSS yang diisolasi dari tambang batu bara wilayah penambangan PT Tambang Batu Bara Bukit Asam, Sumatera Selatan. Identifikasi isolat ini diperoleh berdasarkan

sifat fisiologinya menggunakan *Microbact Identification Kits*. Biakan dipelihara di dalam agar miring berisi medium Luria Bertani (per liter medium): 1,0 g Tripton, 0,5 g ekstrak khamir, 0,5 g NaCl, 1,5 g bacto agar, pH 7,2.

Penyiapan inokulum

Isolat bakteri yang akan diuji ditumbuhkan dalam 50 mL medium cair Luria Bertani (LB) selama 48 jam pada suhu 28°C di atas mesin pengocok dengan kecepatan 200 rpm.

Penyiapan bioamelioran

Bahan pembawa yang digunakan sebagai bioamelioran terdiri dari zeolit berdiameter 1-3 mm, biochar (80 mesh), $MgSO_4$ kalsinasi (100 mesh), dan bahan aktif (*Pseudomonas fluorescens* strain KTSS) dengan perbandingan 9 : 0,5 : 0,5 : 0,6. Masing-masing bahan pembawa disterilisasi terlebih dahulu di dalam oven bersuhu 105°C selama empat jam. Zeolit granul digunakan sebagai inti, sementara biochar dan $MgSO_4$ kalsinasi masing-masing digunakan sebagai pelapis dan pengikat. Perbanyakan inokulan bakteri dilakukan di dalam medium LB. Pencampuran bahan dilakukan dengan menggunakan *double-cone mixer* selama lima menit dan disertai dengan inokulasi 6% (v/b) *Pseudomonas fluorescens* strain KTSS ke dalam bahan pembawa dengan menggunakan sprayer bertekanan tinggi. Bioamelioran ini memiliki spesifikasi bentuk granul berdiameter 1-3 mm berwarna abu-abu gelap, pH 7,3, kadar air 16,3 dan jumlah populasi *Pseudomonas fluorescens* strain KTSS sebanyak 10^{7} - 10^{8} CFU/gram contoh.

Penetapan potensi P. fluorescens *strain KTSS.*

Lima puluh gram bahan tanah dimasukkan ke dalam 100 mL Erlenmeyer. Sterilisasi bahan tanah dilakukan menggunakan autoklaf 121^{0}C selama satu jam dalam tiga hari berturut-turut. Selanjutnya ke dalam 10 buah Erlenmeyer yang berisi bahan tanah steril tersebut masing-masing ditambahkan 5000 ppb merkuri dan diinkubasi dalam kondisi statis selama 24 jam. Setelah itu sebanyak 0, 25, dan 50% (v/b) suspensi bakteri dengan populasi 10^{8}–10^{12} koloni/mL (CFU) diinokulasikan ke dalam bahan tanah steril yang telah mengandung merkuri. Inkubasi dilanjutkan dalam kondisi statis selama tujuh hari pada suhu 28°C. Pada akhir inkubasi, konsentrasi merkuri terlarut air yang terdapat di dalam bahan tanah dianalisis dengan menggunakan *Atomic Absorbtion Spectrophotometer* (AAS). Dalam pengujian ini digunakan strain unggul bakteri pereduksi merkuri lainnya yang berasal dari Kalimantan Selatan (SAKS) sebagai pembanding.

Analisis merkuri terlarut air

Sebanyak 5 g bahan tanah yang mengandung suspensi *P. fluorescens* dimasukkan ke dalam 100 mL botol kocok plastik, kemudian ditambah 50 mL air suling dan dikocok selama dua jam dengan kecepatan 200 rpm. Inkubasi dilanjutkan selama 24 jam pada suhu 28°C. Pada akhir inkubasi, suspensi tersebut dikocok selama 30 menit kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 93 dan Sartorius 0,45 µM untuk memperoleh larutan jernih dan mencegah suspensi bakteri terikut dalam

penetapan merkuri terlarut air. Penetapan merkuri dilakukan dengan menggunakan *Atomic Absorbtion Spectrophotometer* (AAS, Shimadzu AA6300) (AOAC, 2000).

Analisis total merkuri di dalam bahan tanah dan tanaman

Sebanyak 1 g bahan tanah atau bagian tanaman (daun) kering oven dimasukkan ke dalam 100 mL Erlenmeyer, kemudian ditambah dengan 5-7 mL HNO_3 pekat dan 1 mL $HCLO_4$ pekat. Erlenmeyer ditutup dengan kaca penutup dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Selanjutnya suspensi bahan tanah atau daun di dalam Erlenmeyer dipanaskan secara perlahan (100-150°C) selama lebih kurang tiga jam sampai uap berwarna cokelat berkurang. Suhu alat pemanas dinaikkan hingga mencapai 200°C sampai terbentuk uap putih di dalam suspensi tersebut. Setelah uap putih berkurang, sebanyak 1 mL suspensi yang tertinggal di dalam Erlenmeyer didinginkan hingga mencapai suhu ruang, kemudian dipindahkan ke dalam 50 mL labu ukur (pyrex), dan volume ditepatkan menjadi 50 mL dengan penambahan aquades dan dilakukan pengocokan sampai homogen. Suspensi disaring terlebih dahulu dengan kertas saring Whatman 93 sebelum penetapan total merkuri dengan *Atomic Absorbtion Spectrophotometer* (AAS, Shimadzu AA6300). Metode penetapan merkuri dengan AAS dilakukan tanpa nyala api, tetapi dihibridisasi dengan $SnCl_2$ dan H_2O membentuk kabut dalam alat *vapour generation accesories* (VGA). Lampu katoda merkuri dipasang pada panjang gelombang (λ) 253,5 nm dan cahayanya diarahkan supaya dapat menembus kabut dari larutan tersebut (AOAC, 2000).

Penetapan potensi reduksi merkuri dengan bioindikator bibit kakao di rumah kaca.

Kegiatan penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan lima ulangan. Sebagai medium tanam digunakan bahan tanah asal desa Bantar Karet, Kecamatan Nanggung, Leuwiliang-Jawa Barat. Pengambilan bahan tanah dilakukan di kedalaman 0-20 cm. Bahan tanah selanjutnya diayak menggunakan ayakan 5 mm dan diaduk hingga homogen. Sebanyak 10 kg bahan tanah homogen dimasukkan ke dalam ember plastik berkapasitas 15 L yang telah dilubangi bagian bawahnya. Setiap ember plastik ditanami dengan satu bibit kakao lindak klon *Upper Amazon Hybrid* (UAH) umur dua minggu. Pengamatan pertumbuhan vegetatif bibit kakao dilakukan setiap bulan selama tiga bulan. Peubah yang diamati meliputi: (i) tinggi bibit, (ii) jumlah daun, (iii) panjang akar, dan (iv) berat basah dan kering batang, daun, dan akar bibit kakao. Seluruh perlakuan memperoleh pemupukan masing-masing 18 g (100%) dan 9 g (50%) pupuk NPK 15-15-15. Aplikasi bio-amelioran berbahan aktif *P. fluorescens* strain KTSS dilakukan bersamaan dengan aplikasi pupuk NPK 15-15-15. Analisis bahan tanah meliputi kadar N (metode Kjeldahl) , P_2O_5 dan K_2O (terekstrak HCl 25%), C organik (Walkley-Black), pH, KTK-metode Bower (*US Salinity Lab. Staff* 1954) dan konsentrasi total merkuri (AAS).

Adapun rancangan perlakuan sebagai berikut:

A. 100% dosis pupuk NPK.
B. 100% dosis pupuk NPK +1,60g bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS/ bibit.
C. 100% dosis pupuk NPK + 3,25 g bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS/bibit.
D. 50% dosis pupuk NPK + 3,25 g bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS/bibit.
E. Tanpa pupuk (Blanko).

Data yang diperoleh diolah dengan analisis sidik ragam dan untuk membandingkan hasil dari tiap perlakuan dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan taraf 5% (Steel & Torrie, 1980).

Penetapan potensi reduksi merkuri dengan bioindikator padi varietas Ciherang di lapang

Kegiatan penelitian dilakukan di desa Bantar Karet, Kecamatan Nanggung, Leuwiliang (Jawa Barat). Hasil analisis tanah yang dilakukan pada saat penelitian sebagai berikut : 0,26% N; 0,003% P_2O_5; 0,006% K_2O; 2,64% C-organik; 16,46 meq/ 100g KTK, 21,1 ppm Hg dan pH 4,4. Penelitian menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dan tiga ulangan dengan perlakuan :

A. 100% dosis pupuk NPK
B. 100% dosis pupuk NPK + 37,5 kg Bioamelioran *P.fluorescens* strain KTSS /ha
C. 100% dosis pupuk NPK + 75,0 kg bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS/ha
D. 50% dosis pupuk NPK + 75,0 kg bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS/ha
E. Tanpa pupuk (Blanko)

Dosis pupuk anjuran lapang adalah 300 kg NPK Phonska (15-15-15) + 200 kg urea/ha. Bioamelioran diberikan satu hari sebelum tanam dengan cara pembenaman ke dalam tanah. Sementara itu, 300 kg NPK Phonska (15-15-15) diberikan sekaligus pada tujuh hari setelah tanam (HST). Selanjutnya 200 kg pupuk urea diberikan secara sebar (*broadcast*) sebanyak tiga kali pemupukan pada umur tanaman 7, 21 dan 42 HST. Ukuran petak: 5 x 6 m dengan pembatas petak berupa pematang dengan lebar 20-30 cm, tinggi 30 cm. Padi varietas Ciherang ditanam-pindah pada umur 15 hari setelah pembibitan, dan selanjutnya ditanam dengan sistem legowo 2 : 1 berjarak tanam 12,5 x 25 x 50 cm, dengan dua bibit per lubang tanam. Pengambilan sampel tanah dilakukan pada 15 titik lalu dikompositkan untuk dianalisis sifat kimia tanah dan kandungan merkuri. Pengamatan terhadap perkembangan jumlah anakan (rumpun) dan tinggi tanaman (cm) pada 7, 14, 21, 42, dan 63 HST dilakukan dengan mengukur sampel tanaman sebanyak 10 rumpun per petak perlakuan. Sementara itu, peubah yang diamati untuk mengetahui produktivitas tanaman meliputi: (i) jumlah anakan produktif, (ii) malai isi, (iii) gabah kering panen (GKP), dan (iv) gabah kering giling (GKG). Data yang diperoleh diolah dengan analisis sidik ragam dan untuk membanding-kan hasil dari tiap perlakuan dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan taraf 5% (Steel & Torrie, 1980).

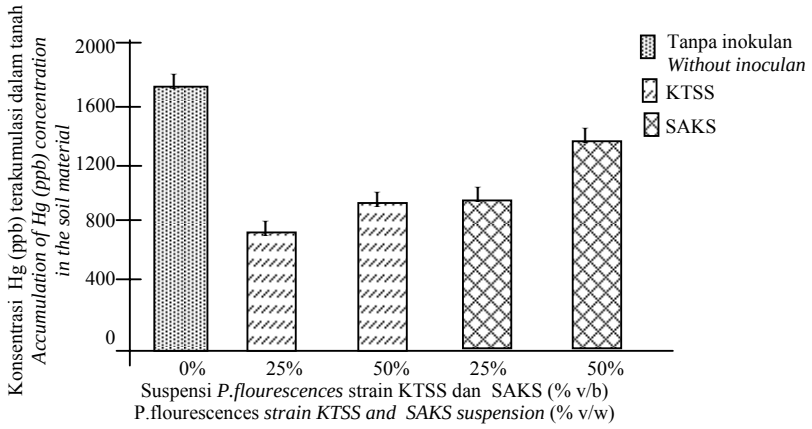
Hasil dan Pembahasan

Penetapan potensi Pseudomonas fluorescens *dalam mereduksi merkuri di dalam bahan tanah*

Berdasarkan hasil penelitian ini, pemberian inokulan *P. fluorescens* strain KTSS sebanyak 25% (v/b) ke dalam 50 g bahan tanah steril dengan masa inkubasi selama tujuh hari pada suhu 28°C dapat menurunkan konsentrasi merkuri lebih banyak jika dibandingkan dengan tanpa inokulan ataupun perlakuan dengan *P. fluorescens* strain SAKS (isolat pembanding). Jumlah suspensi *P. fluorescens* strain KTSS maupun SAKS yang ditambahkan ke dalam bahan tanah dengan konsentrasi 25% (v/b) lebih optimal menurunkan konsentrasi merkuri jika dibandingkan dengan 50% (v/b) (Gambar 1).

Apabila dibandingkan dengan tanpa inokulan, maka potensi reduksi merkuri oleh *P. fluorescens* strain KTSS dan SAKS masing-masing sebesar 53,3 dan 40,1% untuk 25% (v/b) serta 41,9 dan 16,3% untuk 50% (v/b) suspensi inokulan. Namun demikian, hasil ini perlu dikaji lebih lanjut untuk penerapan atau penelitian di lapang. Pada kondisi lapang, merkuri mungkin berada dalam tiga tingkat valensi yang berbeda. Hal ini sangat tergantung pada kondisi redoks yang memungkinkan sebagai Hg^0 dan Hg^{2+}. Bentuk Hg^0 dan Hg^{2+} sering dijumpai di dalam tanah. Lebih lanjut dikemukakan bahwa redoks potensial, pH dan konsentrasi Cl^- merupakan peubah kunci dalam menetapkan spesifikasi bentuk merkuri di dalam larutan tanah (Alloway, 1995). Hanya beberapa menit saja fraksi Hg^{2+} berada di dalam tanah, sebagian besar fraksi akan terikat di dalam mineral tanah atau diabsorbsi pada permukaan padat, bahan an-organik dan organik. Oleh karena itu di dalam kegiatan penelitian ini, konsentrasi merkuri yang dapat diukur kembali di dalam bahan tanah dengan perlakuan tanpa inokulan berkurang cukup signifikan jika dibandingkan dengan pemberian awal sebesar 5000 ppb. Namun konsentrasi merkuri terlarut air yang tersisa di dalam bahan tanah tanpa inokulan bakteri ini masih lebih tinggi (1670 ppb) jika dibandingkan dengan perlakuan inokulasi 25% (v/b) suspensi *P. fluorescens* strain KTSS dan SAKS yaitu masing-masing 780 dan 1000 ppb.

Mengenai mekanisme transformasi merkuri yang dilakukan oleh bakteri, Barkay (2000) menjelaskan ada empat jenis mekanisme enzimatis terkait dengan hal tersebut yaitu: (i) reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0, (ii) pemecahan senyawa organomerkuri (termasuk $MeHg^+$), yang menghasilkan bentuk Hg^0, (iii) metilasi Hg^{2+}, dan oksidasi Hg^0 menjadi Hg^{2+}. Reaksi reduksi dan pemecahan senyawa organomerkuri dilakukan oleh enzim dan protein (*mer*) operon dari bakteri yang resisten terhadap merkuri dengan produk akhir Hg^0. Operon *mer* memiliki situs pelekatan spesifik untuk protein (merT, merP, dan merC) yang mentransport Hg^{2+} ke dalam sitoplasma dan mencegah penghancuran sel. Di dalam sel, Hg^{2+} direduksi oleh NADPH menjadi Hg^0 oleh enzim merkuri reduktase (merA). Beberapa operon *mer* bakteri mengandung gen *merB* yang mengkodekan enzim merkuri liase. Enzim ini dapat mendetoksifikasi senyawa organomerkuri termasuk $MeHg^{2+}$ dan Me_2Hg.



Gambar 1. Pengaruh dosis inokulan *P. fluorescens* strain KTSS dan SAKS terhadap konsentrasi merkuri terakumulasi di dalam bahan tanah setelah tujuh hari inkubasi pada suhu ruang. Tanda bar (I) adalah standar error (SE).

Figure 1. The effect dosage of P. fluorescens KTSS and SAKS strain on mercury accumulation in the soil after seven days incubation at ambient temperature. Bar (I) is an error standard (ES).

Penetapan potensi reduksi merkuri dengan bioindikator bibit kakao di rumah kaca

Berdasarkan pengamatan diketahui bahwa tinggi, jumlah daun, dan panjang akar bibit kakao memberikan hasil pertumbuhan yang baik dengan perlakuan 100% dosis pupuk NPK yang dikombinasikan 3,25g bioamelioran/bibit (perlakuan C). Penimbangan terhadap berat basah dan berat kering batang, daun, dan akar bibit menghasilkan data yang konsisten terhadap hasil pengukuran pertumbuhan vegetatif bibit kakao lindak klon *UAH* (Tabel 1).

Berdasarkan data yang diperoleh pada Tabel 1 maka penetapan akumulasi merkuri di dalam bahan tanah dan daun bibit kakao dilakukan dengan menganalisis akumulasi merkuri pada perlakuan C, perlakuan A (pemberian pupuk NPK) dan perlakuan E (tanpa pupuk). Hasil yang diperoleh disajikan pada Tabel 2. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa dengan pemberian bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS pada bahan tanah sebagai media tanam bibit kakao maka dalam jangka waktu tiga bulan setelah tanam, akumulasi merkuri terkonsentrasi di daerah sekitar perakaran bibit. Konsentrasi merkuri total yang terdapat di dalam bahan tanah dengan perlakuan bioamelioran (perlakuan C) lebih tinggi jika dibandingkan perlakuan pemberian NPK 15-15-15 saja (perlakuan A) ataupun tanpa pupuk (perlakuan E). Hal ini diduga bahwa dengan pemberian bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS dapat menghambat

Tabel 1. Pertumbuhan bibit kakao lindak klon *UAH* umur tiga bulan setelah tanam dengan perlakuan bioamelioran berbahan aktif *P. fluorescens* strain KTSS.

Table 1. Seedlings growth of cacao UAH clone with NPK fertilizer and bio-ameliorant of P. fluorescens KTSS strain treatments, three months after planting.

Perlakuan *Treatments*	Peubah *Parameters*								
	Tinggi (cm) *Height* (cm)	Jumlah Daun (helai) *Number of leaf*	Panjang Akar (cm) *Root length* (cm)	Berat basah batang (g) *Wet weight of stem* (g)	Berat basah daun (g) *Wet weight of leaf* (g)	Berat basah akar (g) *Wet weight of root* (g)	Berat kering batang (g) *Dry weight of stem* (g)	Berat kering daun (g) *Dry weight of leaf* (g)	Berat kering akar (g) *Dry weight of root* (g)
A	30,2 ab*)	18,3 a	39,0 ab	4,7 a	7,1 b	2,8 d	1,6 abc	2,7 b	1,7 ab
B	34,2 a	18,0 a	42,7 a	5,6 a	8,1 ab	4,4 bc	2,1 a	3,0 ab	1,6 bc
C	34,2 a	18,3 a	45,7 a	5,2 a	10,3 a	6,1 a	1,8 ab	3,4 a	2,0 a
D	33,5 a	18,0 a	30,3 b	5,1 a	9,7 a	4,6 b	1,5 bc	3,3 ab	1,4 bc
E	25,2 b	13,7 b	36,8 ab	4,2 a	6,6 b	3,8 c	1,3 c	2,7 b	1,3 c

*) Angka dalam kolom yang sama yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak ganda Duncan (P>0,05).

*) *Figures in the same column followed by similar letter (s) are not significantly different according to Duncan Multiple Range Test (P>0.05).*

Keterangan (*Explanation*) :

(A) 100% dosis pupuk NPK.
(B) 100% dosis pupuk NPK + 1,60 g bio-amelioran *P. fluorescens* strain KTSS/bibit.
(C) 100% dosis pupuk NPK + 3,25 g bio-amelioran *P. fluorescens* strain KTSS/bibit.
(D) 50% dosis pupuk NPK + 3,25 g bio-amelioran *P. fluorescens* strain KTSS/bibit.
(E) Tanpa pupuk (Blanko).

translokasi merkuri ke jaringan daun bibit kakao. Konsentrasi merkuri pada daun bibit kakao dengan perlakuan *P. fluorescens* strain KTSS jauh lebih rendah (< 0,2 ppb) apabila dibandingkan dengan perlakuan pupuk NPK 15-15-15 (404,8 ppb) dan tanpa pupuk (66,3 ppb). Hasil penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya sebagai-mana dikemukakan oleh Alloway (1995) bahwa ketersediaan merkuri di dalam tanah yang ditranslokasikan ke dalam jaringan tanaman akan rendah karena pada umumnya ada kecenderungan merkuri akan teraku-mulasi di akar atau daerah sekitar perakaran. Fenomena ini mengindikasikan bahwa akar tanaman akan menyimpannya sebagai barier untuk pengambilan merkuri. Peran *P. fluorescens* strain KTSS dalam hal ini cukup signifikan terhadap terjadinya proses aku-mulasi merkuri di daerah sekitar perakaran (bahan tanah) melalui penjerapan logam tersebut ke dalam sel bakteri, sehingga konsentrasi total merkuri yang terukur pada jaringan daun bibit kakao sangat rendah. Beberapa strain *P. fluore-scens* lebih dikenal sebagai *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR) yang memiliki kemampuan menghasilkan aktivitas deaminase 1-amino siklopropana-1-karboksilat (ACC), asam indol asetat (IAA)

Tabel 2. Rata-rata total merkuri yang terdapat di dalam bahan tanah dan daun bibit kakao tiga bulan setelah tanam.
Table 2. *Means of total mercury in the soil material and cocoa seedling leaf, three months after planting.*

Perlakuan *Treatments*	Rata-rata total merkuri *Means of total mercury*	
	bahan tanah (ppb) *soil material (ppb)*	daun bibit kakao (ppb) *cacao seedling leaf (ppb)*
100% dosis pupuk NPK *Full rate of 15-15-15 NPK fertilizer dosages*	915	404,8
100% dosis pupuk NPK 15-15-15 + 3,25 g bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS/bibit *Full rate of 15-15-15 NPK fertilizer dosages +3,25 g bioameliorant/seed*	2439	< 0,2
Tanpa pupuk (Blanko) *Blank*	797,3	66,3

dan siderofor (Shilev *et al*., 2007). Dengan kemampuan adaptasi yang tinggi dari bakteri ini akan memungkinkan terbentuk simbiosis dengan tanaman sebagai mikrosimbion. Mikrosimbion penting dalam meminimalisir pengaruh polutan di dalam tanah terutama polutan logam berat yang bersifat *mobile.* Indikasi adanya akumulasi Pb dan Cd pada bagian tanaman kakao, khususnya dalam biji telah dilaporkan oleh Goenadi *et al*. (1993).

Penetapan potensi reduksi merkuri dengan bioindikator padi varietas Ciherang di lapang

Lokasi penelitian berada di dalam wilayah Kecamatan Nanggung Provinsi Jawa Barat, dekat tambang emas. Berdasarkan analisis awal bahan tanah dari lahan yang digunakan untuk uji penetapan potensi reduksi merkuri oleh isolat *P. fluorescens strain KTSS* tersebut diketahui bahwa kadar merkuri mencapai 21,1 ppm. Kontaminasi merkuri dalam tanah yang terdapat di lokasi ini dapat terjadi karena proses alamiah seperti pelapukan batuan, pengolahan emas dengan cara amalgamasi, dan kegiatan industri lainnya yang menggunakan bahan baku merkuri.

Selama kegiatan penelitian berlangsung, pengamatan pertumbuhan padi dilakukan dalam lima periode hari setelah tanam (HST). Pada pengamatan akhir (63 HST) diketahui bahwa pemberian 100% dosis pupuk NPK 15-15-15 yang dikombinasikan dengan 37,5–75 kg bioamelioran/ha umumnya menghasilkan pertumbuhan vegetatif dan produksi yang lebih baik apabila dibandingkan dengan pemberian 100% dosis pupuk NPK 15-15-15 saja. Indikasi ini terutama terlihat pada jumlah anakan (rumpun) dan malai isi. Sementara itu peubah tinggi tanaman, gabah kering panen

(GKP), anakan produktif, dan gabah kering giling (GKG) walaupun hasil yang diperoleh lebih tinggi, tetapi berdasarkan uji statistik tidak berbeda nyata dengan perlakuan 100% dosis pupuk NPK 15-15-15. Produktivitas padi varietas Ciherang yang ditunjukkan melalui hasil penimbangan GKG untuk perlakuan 100% dosis pupuk NPK 15-15-15 dan 37,5- 75 kg bioamelioran/ha berturut-turut adalah 13,74 dan 13,84 kg/30 m^2. Jika dikonversi dalam satu hektar maka nilai GKG tersebut menjadi 4,58 dan 4,61 ton/ha (Tabel 3).

Pengaruh pemberian bioamelioran berbahan aktif *P. fluorescens* strain KTSS yang diperoleh dari kegiatan di lapang masih memerlukan uji lanjut untuk memperoleh konsistensi data. Pengujian disarankan minimal dalam dua periode musim tanam di tempat yang sama. Selain itu pula konsistensi hasil diperlukan melalui uji multi lokasi dengan kondisi masalah logam berat di dalam tanah. Data analisis laboratorium menunjukkan bahwa ada sedikit peningkatan nilai pH tanah dengan perlakuan pupuk dan bioamelioran jika dibandingkan dengan tanpa pupuk. Sementara itu kadar merkuri di dalam tanah dengan pemberian bioamelioran cenderung lebih rendah jika dibandingkan dengan pemberian pupuk NPK 15-15-15 atau tanpa pupuk (Tabel 4). Di lain pihak, kandungan merkuri di dalam beras dari lokasi uji tidak berbeda antar perlakuan.

Sebagaimana yang dikemukakan oleh Alloway (1995) bahwa jumlah merkuri di dalam tanah pertanian dapat bertambah karena adanya aplikasi pupuk, kapur dan kotoran ternak. Namun demikian, asumsi bahwa pemberian pupuk NPK dapat meningkatkan konsentrasi merkuri di dalam bahan tanah perlu dikaji lebih dalam mengingat banyak faktor di dalam tanah yang dapat mempengaruhi mobilisasi logam ini, antara lain pencucian, jumlah bahan organik (Yin *et al*., 1996), pengikatan oleh ion-ion bermuatan negatif dalam larutan tanah, pH tanah, kondisi redoks, dan penjerapan oleh liat (Alloway, 1995). Tanah di lokasi percobaan memiliki pH 4,4. Pada kondisi tersebut, merkuri diduga dalam bentuk $HgCl_2$. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan Alloway (1995) bahwa pada pH di bawah 5,5 bentuk merkuri yang dominan di dalam larutan tanah adalah $HgCl_2^o$, dan pada pH tersebut bahan organik mungkin juga dapat berperan dalam penjerapan merkuri.

Kadar bahan organik 2,53-3,04% yang termasuk katagori sedang di lokasi penelitian ini akan berdampak meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas *P. fluorescens* strain KTSS. Interaksi antara bahan organik dan bakteri memungkinkan bagi penjerapan dan reduksi konsentrasi merkuri terlarut di dalam tanah. Hasil ini mendukung pernyataan Ettler *et al*. (2007) bahwa kontaminasi merkuri lebih banyak dijumpai pada tanah-tanah masam, dimana konsentrasi total merkuri yang terjerap dalam tanah masam akan lebih tinggi apabila dibandingkan dengan bentuk terlarut.

Tabel 3. Pertumbuhan dan produktivitas padi varietas Ciherang dengan perlakuan bioamelioran berbahan aktif *P. fluorescens* strain KTSS.

Table 3. Growth and productivity of paddy Ciherang variety with bio-ameliorant of P. fluorescens *KTSS strain applications.*

Perlakuan (*Treatments*)	Peubah (*Parameter*)					
	Tinggi tanaman *Plant height* (cm)	Jumlah anakan *Number of tribes*	Anakan produktif *Productive tribes*	Malai isi *Fertile spikelet*	Gabah kering panen *Grain dry yield* (kg/30 m^2)	Gabah kering giling *Grain dry mill* (kg/30 m^2)
100% dosis pupuk NPK 15-15-15 *Full rate of 15-15-15 NPK fertilizer dosages*	84,6 a*)	16,7 abc	18,5 ab	83,9 b	16,2 a	13,72 a
100% dosis pupuk NPK 15-15-15 + 37.5 kg bioamelioran/ha *Full rate of 15-15-15 NPK fertilizer dosages +37,5 kg bioameliorant/ha*	86,5 a	18,1 ab	23,0 a	117,9 a	16,6 a	13,74 a
100% dosis pupuk NPK 15-15-15 + 75 kg bio-amelioran/ha *Full rate of 15-15-15 NPK fertilizer dosages +75 kg bioameliorant/ha*	87,2 a	19,2 a	21,9 a	114, a	16,2 a	13,84 a
50% dosis pupuk NPK 15-15-15 + 75 kg bio-amelioran/ha *50% of 15-15-15 NPK fertilizer dosages +75 kg bioameliorant/ha*	80,9 a	13,8 c	16,9 ab	113,7 a	12,6 b	10,79 b
Tanpa pupuk (Blanko) *Blank*	73,4 b	14,5 bc	14,7 b	86,3 b	12,2 b	10,25 b

*) Angka dalam kolom yang sama yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak ganda Duncan (P>0,05).

*) *Figures in the same column followed by similar letter (s) are not significantly different according to Duncan Multiple Range Test (P>0.05).*

Tabel 4. Analisis kimia bahan tanah Bantar Karet-Nanggung yang diperlakukan dengan bioamelioran, 92 hari setelah tanam.

Table 4. Chemical analysis of Bantar Karet-Nanggung soil by bio-ameliorant treatments, 92 days after planting.

Perlakuan (*Treatments*)	Analisis (*Analysis*)				
	pH	P_2O_5 (%)	C-org (%)	Rata-rata kadar merkuri dalam tanah *Contain mean of mercury in the soil (ppm)*	Rata-rata kadar merkuri dalam beras *Contain mean of mercury in rice (ppm)*
100% dosis pupuk NPK 15-15-15 *Full rate of 15-15-15 NPK fertilizer dosages*	5,2	0,06	2,86	10,0	0,6
100% dosis pupuk NPK 15-15-15 +37,5 kg bioamelioran/ha *Full rate of 15-15-15 NPK fertilizer dosages +37.5 kg bio-ameliorant/ha*	5,3	0,06	3,00	7,4	0,5
100% dosis pupuk NPK 15-15-15 +75 kg bioamelioran/ha *Full rate of 15-15-15 NPK fertilizer dosages +75 kg bio-ameliorant/ha*	5,4	0,06	3,04	6,9	0,5
50% dosis pupuk NPK15-15-15 + 75 kg bioamelioran/ha *50% of 15-15-15 NPK fertilizer dosages +75 kg bio-ameliorant/ha*	5,1	0,05	2,64	6,5	0,5
Tanpa pupuk (Blanko) *Blank*	4,9	0,06	2,53	7,9	0,5

Kesimpulan

Pseudomonas fluorescens strain KTSS memiliki potensi mereduksi logam merkuri. Jumlah suspensi *P. fluorescens* strain KTSS yang ditambahkan ke dalam bahan tanah dengan konsentrasi 25% (v/b) lebih optimal menurunkan konsentrasi merkuri jika dibandingkan dengan 50% (v/b). Peran *P. fluorescens* strain KTSS cukup signifikan terhadap terjadinya proses akumulasi merkuri di daerah sekitar perakaran bibit kakao sehingga dapat menghambat translokasi merkuri ke dalam jaringan daun bibit kakao dalam waktu tiga bulan setelah tanam. Pemberian 100% dosis pupuk NPK 15-15-15 yang dikombinasikan dengan

37,5–75 kg bioamelioran *P. fluorescens* strain KTSS/ha menghasilkan pertumbuhan vegetatif dan produksi padi yang lebih baik serta kadar merkuri di dalam tanah yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan pemberian 100% dosis pupuk NPK 15-15-15 atau tanpa pupuk (blanko). Namun demikian, diperlukan justifikasi lebih lanjut mengenai indikasi potensi *P. fluorescens* strain KTSS dalam mereduksi merkuri melalui uji coba dua musim tanam atau uji multi lokasi di lapang dan rumah kaca dengan menggunakan beberapa jenis bahan tanah yang berbeda.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Kepala Unit Penyuluh Teknis Daerah (UPTD) - Penyuluh Pertanian wilayah Leuwiliang yang telah memberikan bantuan secara langsung maupun tidak langsung dalam pelaksanaan kegiatan penelitian di desa Bantar Karet, Kecamatan Nanggung, Jawa Barat. Kepada Sdri Nina Mardiana, SSi dan Drs. Subandry Gunawan diucapkan penghargaan atas partisipasinya di laboratorium dan di lapang. Kegiatan penelitian ini dapat terlaksana atas biaya APBN TA 2007-2008.

Daftar Pustaka

Ahmad, I., S. Hayat, A. Ahmad, A. Inam, & Samiullah (2005). Effect of heavy metal on survival of certain groups of indigenous soil microbial population. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt*., **9**(1), 115-121.

AOAC (2000). *AOAC International Suite 500 W.* Horwitz *ed*. (17th ed.) North Frederick Avenue, Maryland-USA

Alloway, B.J. (1995). *Heavy Metal in Soils*. London, Blackie Academic and Professional.

Barkay, T. (2000). Mercury cycle. *Encyclopedia of Microbiology*, **3**, 171-181.

Barkay, T., R.R. Turner, A. vanden Brook & C. Liebert (1991). The relationship of Hg(II) volatilization from a freshwater pond to the abundance of *mer* genes in the gene pool of the indigenous microbial community. *Microb.Ecol*., **21**,151-161.

Benyehuda, G., J. Coombs, P.L. Ward, D. Balkwill & T. Barkay (2003). Metal resistance among aerobic chemohetero-trophic bacteria from the deep terrestrial subsurface. *Can. J. Microbiol*., **49**,151-156.

Blake, R.C., D.M. Choate, S. Bardhan, N. Revis, L.L. Barton & T.G. Zocco (1993). Chemical transformation of toxic metals by *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environ. Toxic Chem*., **12**, 1365-1376.

Dobler, I. W. (2003). Pilot plant for bio-remediation of mercury-containing industrial wastewater. *Appl. Microbiol. .Biotechnol.,* **62**, 124-133.

Ettler, V., J. Rohovec, T. Navratil & M. Mihaljevic (2007). Mercury distribution in soil profiles polluted by lead smelting. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*., **78**, 12-16.

Giller, K.E., E. Witter & S.P McGrath (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem*., **30**,1389-1414.

Goenadi, D.H., K. Stahr & B. Volkle. (1993). Cadmium and lead contents of cocoa from selected cocoa plantations in Indonesia. *In: International Conf. on Cocoa Economy*, Denpasar - Bali, 19-22 October 1993.

Goldstein, R.W., B.H. Olsen & D.B. Porcella (1988). Conceptual model of genetic regulation of mercury biogeochemical cycling. *Environ.Technol. Lett.,* **9**, 957-964.

Klein, D.A. & J.S Thayer (1995). Interaction between soil microbial community and organometallic compounds. *In*: Bollag, J. M. & G. Stotzky (eds). *Soil Biochemistry*. 6. New York, Marcel Dekker, Inc.

Mullen, M.D. (1998). Transformations on other elements. *In:* D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.E. Hartel & D.A. Zuberer. (*eds*). *Principles and Applications of Soil Microbiology*. New Jersey, Prentice Hall, Upper Saddle River.

Nascimento, A.M.A & E. Chartone-Souza. (2003). Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet. Mol. Res.*, **2**(1), 92-101.

Park, C.H., M. Keyhan & A. Matin (1999). Purification and characterization of chromate reductase in *Pseudomonas putida*. *Abs. Gen. Meet American Soc. Microbiol.* , **99**,536-540.

Shilev S., A.F. Lopez, M.S. Prieto & E.D.S. Puebla (2007). Induced protein profile change in arsenate tolerant and sensitive *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Environ. Eng. Land. Manag.*, **25**(4), 221-226.

Steel, R.G.D. & J.H. Torrie (1980). *Principles and Procedures of Statistics*. *A Biometrical Approach*. 2 nd ed. New York, McGraw-Hill.

U.S. Salinity Laboratory Staff (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. *Agricultural Handbook* No. 60.

Yin, Y.J., H.E. Allen, Y.M. Li, C.P. Huang & P. F. Sanders (1996). Adsorption of mercury (II) by soil: effects of pH, chloride, and organic matter. *J. Environ. Qual*., **25**, 837-844.