

Pengaruh Sumber N terhadap Degradasi Deltametrin dan Produksi IAA oleh *Pseudomonas* sp. PIV-8-2

The influence of Nitrogen source to Deltametrin degradation and IAA production by *Pseudomonas* sp PIV -8-2

Dyah Supriyati

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI. Cibinong Science Center

Jl Raya Jakarta-Bogor, Km 46 Cibinong, Bogor. 16911

Email : gutithm@yahoo.com

Memasukkan: September 2014, Diterima: Februari 2015

ABSTRACT

Deltamethrin is an active ingredient of insecticides such as decis, and its common pollutant observe in agricultural soil. Microbes that able to degrade deltamethrine and produced IAA as plant growth promoting hormone is important to support organic agriculture. The aim of this study was to find deltamethrin degrading bacteria capable of producing IAA and to evaluate the effect of nitrogen on degradation rate of deltamethrin and IAA production. Deltamethrin degrading Bacteria was isolated from non-organic rice fields around Cibinong Science Center. Deltamethrin degradation ability was evaluated in NMS medium with the addition of a nitrogen source: yeast extract, urea and NPK. Analyses of 16S rDNA showed that deltamethrin degrading bacteria and producing IAA was identified as *Pseudomonas* sp. PIV-8-2. Nitrogen significantly affect the degradation deltamethrin rate, but not on IAA production. Only on the addition of yeast extract and urea significantly affect to IAA production after 2 days incubation.

Keywords: Deltamethrin Degradation, IAA, *Pseudomonas* sp. PIV-8-2, Farming.

ABSTRAK

Deltametrin adalah bahan aktif yang ada pada insektisida seperti decis, dan merupakan polutan yang umum ditemukan di lahan pertanian. Untuk mendukung pertanian organik perlu dicari mikroba-mikroba potensial yang dapat mendegradasi senyawa deltametrin. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri pendegradasi deltametrin yang mampu memproduksi IAA, dan mengetahui pengaruh senyawa nitrogen terhadap kemampuan degradasi dan produksi IAA. Bakteri pendegradasi deltametrin diisolasi dari tanah pertanian yang berasal dari sawah non organik di sekitar CSC. Kemampuan degradasi deltametrin dipelajari pada media NMS dengan penambahan sumber nitrogen: yeast ekstrak, urea dan NPK. Hasil analisis 16S rDNA menunjukkan bahwa bakteri pendegradasi deltametrin dan penghasil IAA diidentifikasi sebagai *Pseudomonas* sp. PIV-8-2. Penambahan sumber N sangat nyata berpengaruh terhadap penurunan residu Deltametrin, tetapi tidak berpengaruh pada kemampuannya memproduksi IAA. Hanya pada penambahan sumber N Yeast ekstrak dan urea saja yang terlihat nyata berpengaruh pada peningkatan produksi IAA setelah 2 hari inkubasi.

Kata Kunci: Degradasi Deltametrin, IAA, *Pseudomonas* sp. PIV-8-2, lahan pertanian

PENDAHULUAN

Deltametrin adalah bahan aktif yang ada pada insektisida seperti Decis, merupakan anggota pyrethroid yang paling beracun, dapat membunuh serangga melalui kontak kulit atau melalui pencernaan. Pada dosis yang sangat kecil (0,02 ppm sampai 2 ppm) sudah dapat membuat chromosom dan pembelahan sel menjadi tidak normal (Bhanu *et al.* 2011). Insektisida dengan dengan bahan aktif Deltametrin, dapat larut

pada pelarut organik sikloheksana, etanol dan aseton. Insektisida tersebut biasanya digunakan untuk membasmi hama seperti ulat grayak (*Prodanio litura*), penggerek polong (*Maruca testulalis*), lalat Kacang (*Ophiomya phaseoli*) dll (Bhanu *et al.* 2011).

Untuk mendukung pertanian organik, residu kimia sebaiknya yang ada di dalam tanah dibersihkan. salah satu caranya adalah dengan menggunakan mikroba. Beberapa mikroba yang telah dilaporkan dapat mendegradasi pestisida

Deltametrin Misalnya *Micrococcus* sp (Bhanu *et al.* 2011), dan actinomycetes *Streptomyces aureus* strain HP-S-01 dengan produk hidrolisisnya 3-phenolbenzal dehyde yang kemudian didetoksifikasi dengan cara oksidasi menjadi 2 hydroxy-4 methoxybenzo phenone (Chen, 2011). Isolat tersebut dilaporkan mendegradasi deltametrin tanpa *lag phase*, pada temperatur 18– 8^o C, pH 5 – 10 yang dalam waktu 1 minggu memindahkan deltametrin sebanyak 50 – 300 mg/l , sehingga isolat tersebut direkomendasikan efisien sebagai agen bioremediasi kontaminan jenis pyrethroid (Chen 2011). Salah satu indikasi bakteri yang dapat hidup pada media yang sudah tercemar (ekstrim) yaitu kemampuannya mengakumulasi PHB (Polyhydroxybutirat) sebagai makanan cadangannya seperti yang diutarakan oleh Kumar & Narula (1999 bahwa azotobacter yang dapat mengakumulasi PHB (Polyhydroxybutirat) sebagai makanan cadangan, merupakan indikator bahwa rizobakteri tersebut mampu melakukan bioremediasi pada tanah yang terkontaminasi minyak dan melarutkan fosfat anorganik.

Selain melakukan bioremediasi, menggunakan mikroba potensial yang mampu menghasilkan hormon tumbuh IAA sangat baik karena dapat mempercepat pertumbuhan tanaman. Sebelum tanah menjadi sehat kembali dimana bakteri potensial seperti bakteri penambat Nitrogen dapat bekerja optimal, pupuk kimia masih dibutuhkan untuk memenuhi kebutuhan tanaman akan unsur N seperti urea, NPK dan secara bertahap akan dikurangi digantikan dengan pupuk organik

Tujuan penelitian adalah mendapatkan bakteri yang mampu mendegradasi Deltametrin, dan menghasilkan IAA serta pengaruh Nitrogen terhadap percepatan degradasi Deltametrin.

BAHAN DAN CARAKERJA

Sumber mikroba pendegradasi deltametrin adalah tanah lahan pertanian di CSC yang menggunakan pestisida secara intensip. Isolasi mikroba dilakukan menggunakan medium NMS (Nitrat Mineral salt) dengan komposisi media menurut Leadbetter & Foster 1958 dalam Ogiso

et.al. 2012. Dalam 1 liter media NMS terdapat: 1 gram, NaNO₃ 0,1 gram MgSO₄.7H₂O, 0,5 gram NaHPO₄.2H₂O, 0,22 gram KH₂PO₄.2H₂O, 0,03 gram CaCl₂.6H₂O, 2 mg FeSO₄.7H₂O; dan 1 ml *Trace solution* pH 7. Dalam 1 liter *Trace solution* mengandung 0,44 gram ZnSO₄.7H₂O, 0,20 gram CuSo₄.5H₂O, 0,17 gram MnSO₄.2H₂O, Na 0,06 gram MoO₄.2H₂O, 0,10 gram H₂BO₃ dan 0,08 gram CaCl₂.6H₂O dan ditambah 50 ppm (Karpouzias *et al.* 2005)

Identifikasi bakteri dilakukan melalui analisis 16S rDNA mengikuti Ge *et.al.*(2012). Bakteri ditumbuhkan pada media NMS dengan penambahan sumber N berupa Yeast Extract, Urea dan NPK sebanyak 500 mg/l dengan penambahan 125 ppm Deltametrin. Inkubasi dilakukann di atas shaker selama 4 hari dan pengamatan dilakukan setiap 8 jam, dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

Setelah diinkubasi selama 3 hari, dilakukan analisa residu Deltametrin yang masih ada di dalam media tumbuh. Analisa Residu Deltametrin dilakukan dengan UPLC (Ultra Performance Liquid chromatography) dengan LC-MSMS dengan Kolom *Phenomenex Synergi Fusion*, fase Gerak A:5 mM Ammonium format dalam 10% methanol, B : 5 mM Ammonium format dalam 90% ,Laju Alir: 0,4 ml/menit, gradient suhu kolom 40^oC, volume injeksi: 5µL, metode MS, polaritas: ESI (+), CUR: 30 Psi, CAD: medium, ionspray voltage: 5500 V, temperatur: 400^o C, GSI: 50 Psi dan GS2: 60 Psi

Produksi IAA diuji dengan metode Salkowski (Gordon &Weber, 1997). Pengujian dilakukan 2 tahap, yaitu kualitatif dan kuantitatif.

Bakteri yang kan diuji ditumbuhkan pada media TSB 50% yang terdiri dari : 10 g pepton, 2,5 gram NaCl , agar 20 g dan akuades 1 liter disterilkan , kemudian ditambah precursor L-tryptophan 200 ppm. Setelah tumbuh ditetesi dengan reagen Salkowski (yang terdiri dari 1 ml FeCl₃ 0.5M + 50 ml HClO₄ 25% yang disimpan dalam botol yang gelap).Bila media berubah warna

menjadi Pink menandakan bakteri tersebut mampu menghasilkan hormon IAA

Bakteri yang terpilih secara kualitatif mempunyai kemampuan menghasilkan IAA, diuji kemampuannya secara kuantitatif. Analisa IAA dilakukan dengan menggunakan metode Salkowski (Gordon & Weber, 1997). Bakteri ditumbuhkan pada media fermentasi yang terdiri dari 20 ml media TSB (tanpa agar) + sumber N Yeast extract, urea dan NPK (50 ppm) dan L-Tryptophan 10.000 ppm di dalam Erlenmeyer. Inkubasi dilakukan di atas shaker selama 0, 1, 2 dan 3 hari.

Analisa dilakukan dengan mengambil 2 ml dari suspensi dari media fermentasi tersebut diambil lalu disentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit, 1 ml dari supernatannya diambil ditambah 2 ml pereaksi Salkowski, dihomogenkan dengan vortek, kemudian didiamkan selama 30 menit, kemudian diamati absorbannya pada panjang gelombang 530 nm. Dengan perlakuan yang sama dibuat blanko. Hasil dikurangi dengan blanko. Hasilnya kemudian dibandingkan dengan standar yang telah dibuat dari 0 ppm sampai dengan 25 ppm menggunakan IAA produksi Merck, dengan persamaan $Y = 0.056 X - 0.0061$.

Analisa keberadaan PHB sebagai makanan cadangan bagi bakteri pada kondisi ekstrim, dilakukan untuk mengetahui kemampuan adaptasi bakteri tersebut.

Pengujian produksi PHB oleh bakteri dilakukan dengan metode pewarnaan dengan pewarna Suddan Black. Pewarna Suddan black dibuat dengan mencampurkan 60 mg Suddan Black ke dalam 200 ml etanol 70%. Larutan di campur sampa rata dengan stirrer, kemudian di inkubasi selama 1 malam (Arson 1990; Crookham & Dapson 1991). sebanyak 1 ml sampel kultur dicampur dengan 1 ml pewarna Suddan Black di dalam appendorf, menggunakan vortex selama 1 menit. Inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Amati dengan spektrofotometer panjang gelombang 595 nm. Sampel kemudian disentrifus selama 10 menit, dengan kecepatan 5 000 rpm, suhu 4°C. Supernatan

kembali diamati dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Produksi PHB dihitung dengan mengurangi hasil pengamatan dengan spektrofotometer panjang gelombang 595 nm sampel sebelum dan sesudah disentrifus. Hasil pengurangan kemudian dihitung dengan standar antara konsentrasi PHB yang diperlakukan sama seperti sampel, yang diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang 595 nm. Semakin banyak pewarna Suddan black tersebut terserap, semakin banyak PHB terbentuk di dalam sel bakteri. Hubungan antara konsentrasi PHB dengan OD pada panjang gelombang 595nm seperti tertera dalam persamaan $Y = 4.1749 x + 0.1364$ ($R^2 = 0.9701$).

HASIL

Bakteri Pendegradasi Deltametrin dan penghasil IAA

Dari hasil identifikasi bakteri yang dilakukan melalui analisis 16S rDNA (Ge, Schime & Holden 2012.) menunjukkan bahwa bakteri yang mempunyai kemampuan mendegradasi Deltametrin dan menghasilkan IAA adalah *Pseudomonas* sp PIV-8-2.

Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2.pada media NMS dengan berbagai sumber N

Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2.pada media NMS paling baik pada media dengan penambahan sumber N berasal dari Yeast, dan paling rendah pada media dengan tanpa penambahan sumber N (Gambar 1). Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2 pada media mengandung Deltametrin 125 ppm paling baik pada media dengan penambahan sumber N Yeast extract, kemudian diikuti dengan Urea, dan paling rendah pada NPK yang tidak berbeda nyata dengan pada media tanpa penambahan sumber N (Gambar 2).

Produksi PHB paling tinggi dari bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2 pada media dengan penambahan sumber N dari NPK dan paling rendah pada media dengan penambahan sumber N yeast

extract.

PEMBAHASAN

Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-

8-2. terbaik pada media NMS dengan penambahan sumber N Yeast Extract.. Yeast extract merupakan faktor pemacu pertumbuhan bakteri- (Nurhayati *et al.* 2014). Konsentrasi yeast extract sebesar 0,5% (w/v) cukup besar sehingga bakteri memanfaatkan komponen tersebut untuk pembentukan sel. Pertumbuhan bakteri pada media dengan sumber N Urea lebih baik dibandingkan NPK. Hal ini disebabkan besarnya kandungan N pada urea yaitu 46%. Sedangkan N pada pupuk NPK hanya 15 %. Enzim urease akan berubah dengan adanya bahan aktif dari pestisida. Urease adalah enzim yang berperan sebagai katalisator dalam hidrolisa urea menjadi bentuk N

Tabel 1. Hasil analisa data rata-rata residu Deltametrin pada media setelah inkubasi selama 4 hari

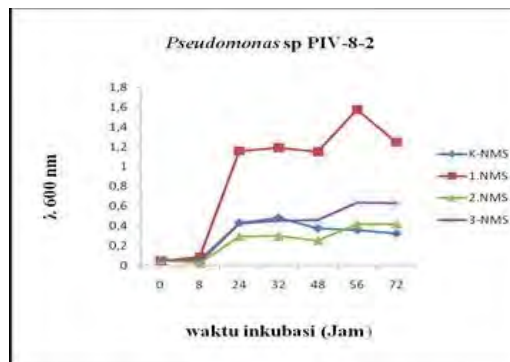
Isolat /media	Awal (ppb)	Akhir (ppb)	Turun (ppb)	
K-NMS	125	86092,99	38907,01	(31,126 %) a
1-NMS	125	58119,76	66880,24	(53,504 %) b
2-NMS	125	58077,30	66922,70	(53,538 %) b
3-NMS	125	54762,75	70237,25	(56,19 %) b

Keterangan : K; Kontrol (NMS + Deltametrin)
 1. NMS+Deltametrin + Yeast ;2.NMS+Urea+ Deltametrin;3. NMS+NPK+Deltametrin
 Huruf yang sama dibelakang angka menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji Duncan taraf 5%

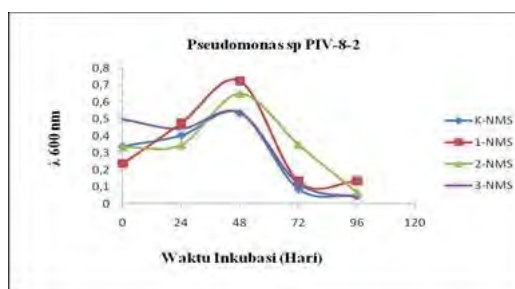
Tabel 2. Hasil analisa data rata-rata produksi IAA (ppm) setelah inkubasi selama 3 hari.

Perlakuan (Sumber N)	Lama Inkubasi (hari)			
	0	1	2	3
Kontrol	0,16 c	9,61 b	7,81 a	8,18 c
Yeast Extract	0,13 b	9,70 b	15,60 c	8,18 c
Urea	0,00 a	9,99 b	13,44	6,54 b
NPK	0,15 c	8,39 b	7,72 a	2,65 a

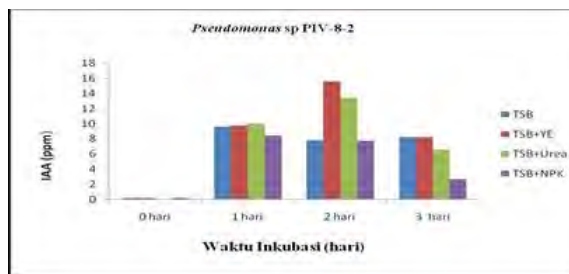
Keterangan : K; Kontrol (NMS + Deltametrin)
 1. NMS+Deltametrin + Yeast ;2.NMS+Urea+ Deltametrin;3. NMS+NPK+Deltametrin
 Huruf yang sama dibelakang angka menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada uji Duncan taraf 5%



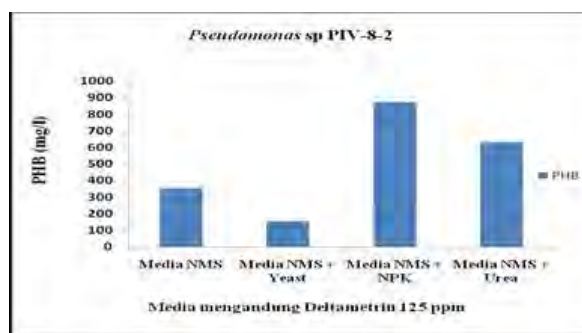
Gambar 1. Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2 pada media NMS dengan berbagai jenis sumber N (K. Kontrol 1. Yeast Extract 2. Urea 3. NPK)



Gambar 2. Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2 pada media mengandung 125 ppm Deltametrin dengan tambahan berbagai macam sumber N



Gambar 3. Produksi IAA pada media TSB dengan penambahan sumber N berbeda



Gambar 4. Produksi PHB oleh bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2 pada media mengandung 125 ppm deltametrin dengan tambahan sumber N berbeda.

yang tersedia bagi mikroba 2 mol amonium diubah menjadi nitrit; amonia maupun nitrit tersebut merupakan sumber N yang dapat diserap dengan baik. Sedangkan NPK memiliki kandungan N yang relatif lebih kecil karena adanya unsur P dan K. Berkurangnya kandungan N menyebabkan bakteri mengandung Deltametrin, dan dalam proses adaptasinya bakteri akan memperlambat pertumbuhan.

Degradasi Deltametrin

Residu Deltametrin terbanyak ada pada media Kontrol. Degradasi Deltametrin terbanyak dicapai pada media dengan penambahan sumber N dari pupuk NPK. Dibandingkan dengan kontrol, penambahan sumber N pada media sangat nyata dapat mempercepat degradasi Deltametrin oleh bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2, tetapi diantara sumber N yang berbeda tidak ada perbedaan yang nyata. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Chen (2011), dimana isolat *Streptomyces aureus* strain HP-S-01 yang digunakan dapat mendegradasi deltametrin dengan produk hidrolisisnya 3-phenolbenzaldehyde. Isolat dilaporkan mendegradasi deltametrin tanpa lag phase pada temperatur 18–38^o C, pH 5 – 10, yang dalam waktu 1 minggu memindahkan deltametrin sebanyak 50 – 300 mg/l (Chen 2011).

Produksi IAA

Penambahan sumber N yeast extract dan urea saja yang berpengaruh sangat nyata meningkatkan produksi IAA setelah inkubasi selama 2 hari (Tabel 2).

Hasil ini relatif lebih tinggi bila dibandingkan dengan hasil percobaan Khairani (2009) dimana IAA tertinggi yang dihasilkan oleh bakteri endofit dari tanaman jagung yang dicoba 1.0961 ppm oleh bakteri KB6 pada hari kedua inkubasi dan 1.0778 ppm oleh bakteri KB 7 pada hari ke 4 inkubasi.

Akumulasi PHB

Akumulasi PHB tertinggi dicapai bakteri pada media dengan penambahan sumber N berupa NPK, dan pada media yang sama residu deltametrin paling sedikit ditemukan. Kemungkinan sama

seperti yang terjadi pada bakteri *Azotobacter*, yang dapat mengakumulasi PHB (Polyhydroxybutirat) sebagai makanan cadangan pada lingkungan yang ekstrim sehingga merupakan indikator bahwa rizobakteri tersebut mampu melakukan bioremediasi pada tanah yang terkontaminasi minyak (Kumar & Narula 1999) yang menyatakan bahwa *azotobacter*, dan. Selama pengamatan 3 hari masa inkubasi dengan pemberian deltametrin pada media, terlihat bahwa bakteri tumbuh paling baik pada media yang diberi tambahan Yeast extract, dan pada media ini bakteri paling sedikit memproduksi PHB dan pada pertumbuhan bakteri paling rendah yaitu pada media dengan penambahan NPK ternyata menghasilkan PHB yang paling tinggi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2, berpotensi sebagai agen bioremediasi pada tanah–tanah tercemar. Selain itu bakteri *Pseudomonas* sp PIV-8-2 mempunyai kemampuan menghasilkan hormon IAA yang sangat berguna untuk merangsang pertumbuhan tanaman. Pada percobaan ini penambahan sumber N dari Yeast Ekstrak dan Urea terlihat sangat nyata meningkatkan produksi IAA hanya pada 2 hari setelah inkubasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Arson, F. 1990. *Histotechnology. A Self-Instructional Test*. 1st ed. 162.ASCP Press, p.161 .
- Bhanu, SS. K. Archana, JL. Ajay, SP. Bhatt, PS. Bajpai, Singh, & B. Vandana. 2011. Impact of Deltamethrin on environment, uses as Insecticide and its bacterial degradation – A preliminary study. *International Journal of environmental sciences*. 1 (5): 977 - 985
- Chen S., K. Lai, Y .Li, M. Hu, Y. Zhang & Y. Zeng. 2011. Biodegradation of Deltametrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus*

- strain HP-S-01. *Appl. Microbial Biotechnology*. 90(4): 1471–1483
- Crookham, J. & R. Dapsone 1991. *Hazardous Chemical in the Histopathology laboratory*. 2nd ed. Anatech
- Dede, EP., M.Yunus, & M.Nasich. Pengaruh Penambahan Urea Terhadap Kandungan Protein Kasar, dan serat kasar padatan lumpur organik unit Gas Bio.
- Ge, Y., JP. Schimel, & PA. Holden 2012. Identification of soil bacteria susceptible to TiO₂ and ZnO nanoparticles. *Applied and environmental microbiology*. 78(18): 6749–58.
- Gordon, SA . & RP. Weber. 1997. Colorimetri Estimation of Indoleacetic Acid. *Plant. Physiology*. 26: 192 -197
- Gusti K.. 2009. *Isolasi dan Uji Kemampuan Bakteri Endofit Penghasil Hormon Biologi*. F.MIPA UI : 50 hal
- Hanson,RS. & TE. Hanson 1996. Metanotrophic bacteria. *Microbiology and molecular Biology Reviews*. 60 (2): 439 – 471
- Karpouzas, DG. 2005. Non-specific biodegradation of the organophosphorus pesticides, cadusafos and ethoprophos, by two bacterial isolates. *FEMS Microbiology Ecology*. 53(3): 369–78.
- Ogiso, T., C. Ueno, D. Dianou, TV. Huy, A. Katayama, M Kimura & S. Askawa. 2012 *Methylomonas koyamae* sp. nov., a type I methane-oxidizing bacterium from floodwater of a rice paddy field. *IJSEM* . 62(8): 1832 - 1837
- Nurhayati, T., TL. Maggy & SB. Poerwanto. 2009. Pengaruh Glukosa dan Yeast Extract Terhadap Produksi Inhibitor Protease *Pseudomonas aeruginosa* dari *Chromohalobacter* sp. 6A3 (Bakteri yang berasosiasi dengan Spons *Xetospongia testudinaria*). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 19 (2): 84 – 92.