

PROFIL METOBOLIT RHIZOBAKTERI TOLERAN CEKAMAN OSMOTIK DAN KEASAMAN YANG BERPOTENSI SEBAGAI PUPUK HAYATI LAHAN KERING ASAM

Ali Ikhwan dan Dyah Titi Muhardini

Dosen dan Peneliti Pusat Pengembangan Bioteknologi, Universitas Muhammadiyah
Malang

Abstrak

Pada saat menghadapi cekaman, mikrobia akan merespon secara fisiologi dengan mengubah sistem metabolisme sel dan mensintesis metabolit spesifik. Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan pola pertumbuhan rhizobakteri dan sintesis metabolit antar perlakuan cekaman osmotik dan keasaman-Al. Pada perlakuan cekaman osmotik terdapat 6 metabolit polar spesifik dan 6 metabolit non-polar spesifik. Pada cekaman keasaman-Al terdapat 6 metabolit polar spesifik dan 10 metabolit non-polar spesifik, sedangkan pada cekaman ganda osmotik dan keasaman-Al terdapat 2 metabolit polar spesifik dan 8 metabolit non-polar spesifik. Sebagian besar metabolit tersebut adalah kelompok asam lemak yang berperan sebagai penyusun utama (*backbone*) membran dan dinding sel sehingga toleran terhadap cekaman osmotik dan keasaman, sehingga toleran terhadap cekaman osmotik dan keasaman dan berpotensi sebagai pupuk hayati lahan kering asam.

Kata kunci: *Rhizobakteri, metabolit, osmotik dan keasaman*

Pendahuluan

Dalam menghadapi cekaman lingkungan rhizobakteri akan merespon secara fisiologi dan berpengaruh terhadap sistem metabolisme (Moat & Foster, 1988). Hochachka & Somero (1984), menyatakan bahwa, mikrobia akan melakukan adaptasi secara biokimiawi dengan cara (1) pengaturan komponen makromolekular sel (enzim, isozim dan allozim), secara kuantitatif maupun kualitatif, (2) pengaturan fungsi makromolekular sel, dan (3) pengaturan keluaran (*output*) sistem makromolekular sel.

Dalam menghadapi cekaman osmotik rhizobakteri akan melakukan tiga mekanisme adaptasi yaitu: (1) mensintesis osmoprotektan secara *de novo*, (2) mengambil osmoprotektan yang ada di rhizosfer dan (3) mengubah komposisi dinding sel agar tidak rusak akibat tekanan osmotik yang tinggi (Hartman *et al.*, 1991). Menurut Canovas *et al.* (1996), akumulasi osmoprotektan

tidak hanya untuk mengembalikan tekanan turgor membran sel saja tetapi juga menjaga enzim dari inaktivasi oleh kekuatan ionik tinggi, serta mencegah kerusakan dan menjaga integritas komponen sel.

Pada kondisi cekaman ganda yaitu osmotik dan alumunium, konsentrasi alumunium akan berpengaruh pada akumulasi osmolit sel. Pada kondisi alumunium konsentrasi tinggi, alumunium akan menutup saluran K^+ (*K⁺-channel*) sehingga K^+ terhalangi masuk kedalam sel (Liu & Luan, 2001). Oleh karena ion K^+ merupakan osmolit intraselular utama dalam kondisi cekaman osmotik (Ohwada & Sagisaka, 1988), maka konsentrasi Al yang tinggi akan menurunkan toleransi mikrobia terhadap cekaman osmotik. Selain itu, pada konsentrasi Al tinggi dapat terjadi agregasi sitoplasma (Yaganza *et al.*, 2004) yang akan berpengaruh terhadap metabolisme sel (sintesis osmoprotektan). Dengan demikian pada kondisi

cekaman alumunium, toleransi mikrobia terhadap cekaman osmotik akan menurun. Di sisi lain, cekaman osmotik akan berpengaruh terhadap inaktivasi enzim dan kerusakan komponen sel (Csonka, 1989 dan Canovas *et al.* 1996). Hal tersebut akan berpengaruh terhadap sistem metabolisme dan sintesis metabolit sel, yang dapat menyebabkan akumulasi sitrat menurun sehingga toleransi terhadap Al juga menurun (Anop *et al.*, 2003). Dengan demikian ada interaksi pengaruh antara cekaman osmotik dan cekaman alumunium terhadap metabolisme sel dan sistem regulasinya. Perubahan metabolisme dan sistem regulasi adaptasi menyebabkan perubahan metabolit yang disintesis (Hochachka & Somero, 1984).

Metode Penelitian

Analisis Pola Pertumbuhan Rhizobakteri

Pola pertumbuhan rhizobakteri dianalisis secara spektrofotometri dengan panjang gelombang λ 420 nm yang ditumbuhkan pada media LB dengan variasi cekaman osmotik 0,65 M NaCl dan atau keasaman $Al_2(SO_4)_3$ 1000 μ M pada kondisi pH 4,6 (Ayanaba, *et al.*, 1983).

Isolasi metabolit sel

Isolasi metabolit sel dilakukan dengan dua pendekatan yaitu metanol absolut untuk senyawa metabolit polar dan dietileter untuk senyawa metabolit non polar seperti dideskripsikan oleh Christoph, *et al.*, 2007; Jochen, *et al.*, 2006 dan Magda, *et al.*, 2007.

Analisis metabolit sel dengan GC-MS

Komposisi metabolit sel dianalisa dengan GC-MS (*Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) tipe QP2010S Shimadzu, dengan kolom semi polar

Rtx-5MS, suhu kolom 320 °C, gas pembawa helium dengan kecepatan aliran 0,5 ml/menit (Maud, *et al.*, 2006).

Hasil Dan Pembahasan

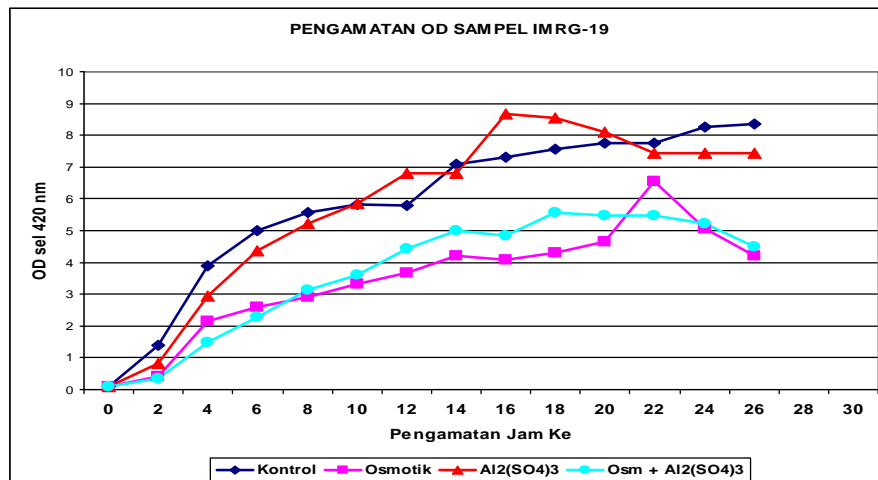
Pola Pertumbuhan Rhizobakteri

Dari pola pertumbuhan nampak bahwa secara keseluruhan perlakuan cekaman cenderung menghambat pertumbuhan dibanding kontrol (tanpa perlakuan cekaman). Cekaman osmotik lebih menghambat daripada cekaman keasaman alumunium (gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa rhizobakteri lebih sensitif terhadap cekaman osmotik dibanding cekaman keasaman alumunium (Metting, 1993). Hal ini disebabkan rhizobakteri yang digunakan berasal dari isolat rhizosfer tanah masam yang secara alamiah sudah beradaptasi dengan lingkungan asam. Cekaman keasaman pada tanah masam (Podzolik Merah Kuning) mencapai pH 4.2 dan bersifat permanen dibanding cekaman osmotik yang temporal (Sanchez, 1976). Dengan demikian rhizobakteri yang berasal dari tanah tersebut lebih resisten terhadap cekaman keasaman dibanding cekaman osmotik.

Metabolit Polar

Analisis Profil Metabolit

Hasil analisis GC/MS, menunjukkan jumlah metabolit yang berbeda antar perlakuan. Metabolit polar yang terdeteksi dari masing-masing perlakuan adalah: (1) kontrol 18 metabolit, (2) cekaman osmotik 23 metabolit, (3) cekaman $Al_2(SO_4)_3$ 15 metabolit dan (4) cekaman ganda (osmotik & $Al_2(SO_4)_3$) 7 metabolit (gambar 2). Hal tersebut disebabkan profil metabolit mikrobia juga ditentukan oleh media pertumbuhan (Julia, *et al.* (2007).

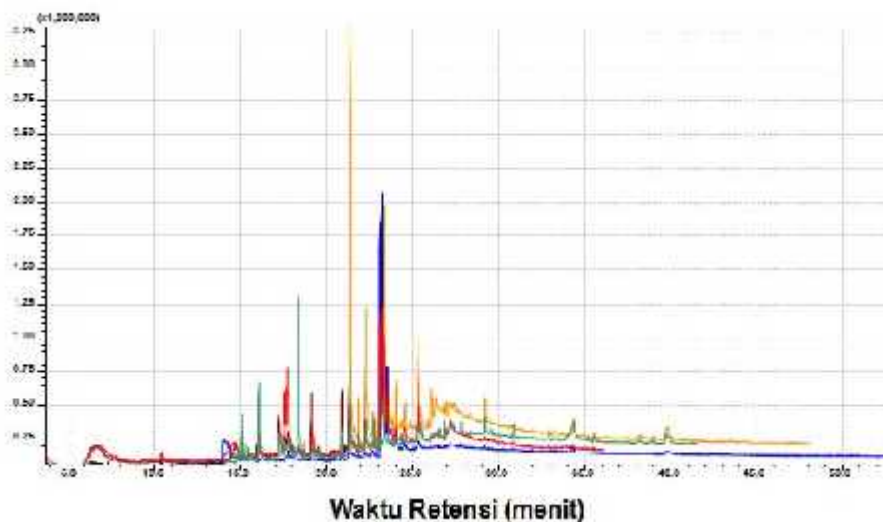


Gambar 1. Kurva pertumbuhan rhizobakteri (*Klebsiella pneumoniae*) pada media LB + cekaman osmotik & keasaman-Al

Analisis Metabolit Spesifik

Hasil analisis metabolit polar dari masing-masing perlakuan, terdapat 2 metabolit konstitutif, 12 metabolit tidak spesifik dan 17 metabolit spesifik (tabel 1). Metabolit spesifik terdiri dari: kontrol 4 metabolit, cekaman osmotik 5 metabolit, cekaman Al₂(SO₄)₃ 6 metabolit

dan cekaman ganda (osmotik dan Al₂(SO₄)₃) 2 metabolit, dengan pola sebaran yang berbeda (gambar 4). Menurut Jana, *et al.* (2007), mikrobia akan mensintesis metabolit spesifik ketika menghadapi cekaman lingkungan.

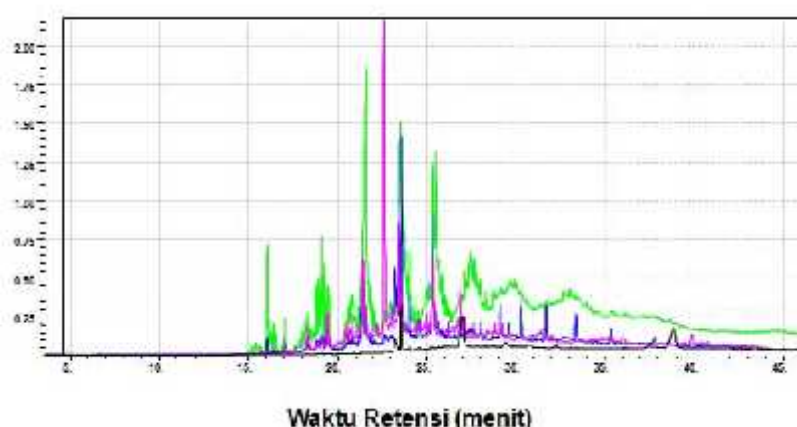


Gambar 2. Hasil analisis GC-MS metabolit polar pada variasi cekaman osmotik dan keasaman-Al; — kontrol, — cekaman osmotik, — cekaman keasaman-Al dan — cekaman osmotik & keasaman-Al

Tabel 1. Analisis metabolit polar spesifik, tidak spesifik dan konstitutif, dari masing-masing perlakuan cekaman

Macam Metabolit	Macam Perlakuan Cekaman			
	Kontrol	Osmotik	Al ₂ (SO ₄) ₃	Osm & Al ₂ (SO ₄) ₃
Stearic acid	14.59%	29.06%	9.25%	7.2%
Palmitic acid	13.45%	19.58%	14.99%	3.49%
2-Methyl Tetrahydrofuran	12.54%	-	-	-
9,12-Hexadecadienoic acid, methyl ester	12.2%	-	-	29.43%
2-Methyl-3-Oxo-Tetrahydrofuran	10.01%	-	-	-
9,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	8.64%	-	-	40.85%
Oelic Acid Amide	6.04%	5.4%	-	-
Methyl linoleate	4.36%	-	-	11.74%
L-Glutamine	4.08%	-	-	-
Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)	3.14%	-	-	-
Oleic acid	-	9.27%	4.36%	-
Octanamide, N-(2-hydroxyethyl)	-	5.01%	-	-
Lauric amide	-	4.03%	-	-
Myristic acid	-	3.72%	3.9%	-
Arachidic acid methyl ester	-	3.18%	-	-
Hexanamide, N-(2-hydroxyethyl)	-	2.57%	-	-
Nonanedioic acid, dimethyl ester	-	2.18%	-	-
Patchouli alcohol	-	-	28.27%	-
delta.-Guaiene	-	-	11.93%	-
Oleic acid methyl ester	-	-	7.89%	-
Alloaromadendrene	-	-	6.31%	-
1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester	-	-	2.42%	-
Silicone Polymer	-	-	2.37%	-
Linoleic acid	-	-	-	5.98%
Olealdehide, dimethyl acetal	-	-	-	1.3%

Keterangan: ■ metabolit spesifik, ■ metabolit konstitutif, ■ metabolit tidak spesifik



Gambar 3. Hasil analisis GC-MS metabolit non-polar pada variasi cekaman osmotik dan keasaman-Al; ■ kontrol, ■ cekaman osmotik, ■ cekaman keasaman-Al dan ■ cekaman Osm & keasaman-Al

Metabolit Non-Polar

Analisis Profil Metabolit

Hasil analisis GC/MS, menunjukkan bahwa metabolit non-polar yang terdeteksi dari masing-masing perlakuan adalah: kontrol 30 metabolit, cekaman osmotik 48 metabolit, cekaman $Al_2(SO_4)_3$ 11 metabolit dan cekaman osmotik & $Al_2(SO_4)_3$ 48 metabolit (gambar 5). Menurut Catherine *et al.*, (2008), perbedaan media kultur berpengaruh terhadap profil metabolit intraselular sel.

Analisis Metabolit Spesifik

Hasil analisis metabolit non-polar dari masing-masing perlakuan terdapat 28 metabolit spesifik, 12 metabolit tidak spesifik dan tanpa metabolit konstitutif, (tabel 2). Metabolit spesifik tersebut terdiri dari 7 metabolit untuk kontrol, 5 metabolit untuk cekaman osmotik, 9 metabolit untuk cekaman $Al_2(SO_4)_3$ dan 7 metabolit untuk cekaman ganda (osmotik dan $Al_2(SO_4)_3$) dengan pola sebaran yang berbeda (Gambar 7).

Tabel 2. Analisis metabolit non-polar spesifik, tidak spesifik dan konstitutif dari masing-masing perlakuan cekaman

Macam Metabolit	Macam Perlakuan Cekaman			
	Kontrol	Osmotik	$Al_2(SO_4)_3$	Osm & $Al_2(SO_4)_3$
Palmitic acid	28.32 %	7.58%	-	7.43%
Stearic acid	16.21%	9.73%	-	-
Tetrapentacontan 1,54-Dibromo	8.04%	-	-	-
Oelic Acid Amide	6.56%	8.69%	-	10.45%
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	5.19%	-	-	-
Nonanamide	3.73%	-	-	-
Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)	3.13%	-	-	-
Tridecanol	2.94%	-	-	-
1-Octanol, 2,2-dimethyl	2.71%	-	-	-
1-Tricosene	1.97%	-	-	-
1-Octadecanol	-	26.64%	-	-
9,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	-	4.57%	-	17.33%
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	-	3.17%	-	-
Nonadecane	-	2.59%	-	-
Methyl linoleate	-	2.35%	1.9%	-
Tetratetracontane	-	2.26%	-	-
Palmitic amide	-	2.15%	-	-
Hexadecanoic acid, octadecyl ester	-	-	35.45%	-
Octadecanoic acid, eicosyl ester	-	-	31.52%	-
9,12-Hexadecadienoic acid, methyl ester	-	-	14.82%	-
2-Methyl-4-Hexyne-3-One	-	-	6.82%	-
Octadeca-9,12-Dienoic Acid Methyl Ester	-	-	5.23%	-
Nonadecane, 1-Chloro	-	-	1.78%	-
13-Methyl-Pentadec-14-1,13-Diol	-	-	1.13%	-
1-Octanol, 2-butyl	-	-	0.53%	-
14- β -H-Pregna	-	-	0.48%	-
Octadeca-9,12-Dienoic Acid Methyl Ester	-	-	-	11.72%
Oleic acid	-	-	-	8.85%
Eicosane, 10-methyl	-	-	-	3.42%
n-Tetratetracontane	-	-	-	3.14%
n-Nonacosane	-	-	-	3.1%
13-Methyl-Pentadec-14-ene-1,13-diol	-	-	-	2.76%
n-Docosane	-	-	-	2.54%

Keterangan : ■ metabolit spesifik, ■ metabolit tidak spesifik

Kesimpulan

Ada perbedaan pola pertumbuhan dan metabolit antar perlakuan cekaman osmotik dan keasaman-Al. Perbedaan pola metabolit tersebut terjadi baik pada metabolit polar dan non-polar. Pada perlakuan cekaman osmotik terdapat 6 metabolit polar spesifik dan 6 metabolit non-polar spesifik. Pada cekaman keasaman-Al terdapat 6 metabolit polar spesifik dan 10 metabolit non-polar spesifik, sedangkan pada cekaman ganda osmotik dan keasaman-Al terdapat 2 metabolit polar spesifik dan 8 metabolit non-polar spesifik. Sebagian besar metabolit tersebut adalah kelompok asam lemak yang berperan sebagai penyusun utama (*backbone*) membran dan dinding sel sehingga toleran terhadap cekaman osmotik dan keasaman-Al.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada DP2M DIKTI, yang telah berkenan untuk membiayai penelitian ini dalam skim penelitian Fundamental, tahun 2013-2014.

Daftar Pustaka

- Anop, V. M., U. Basu, M. T. McCammon, L. McAlister-Henn, and G. J. Taylor. 2003. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in Yeast and transgenic Canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol.* 132: 2205–2217
- Ayanaba, A., S. Asanuma and D.N. Munns. 1983. An agar plate method for rapid screening of rhizobium for tolerance to acid-aluminum stress. *Soil Soc. Am. J.* 47:256-256.
- Canovas, D., C. Vargas, L. N. Csonka, A. V. Ventosa, and J. J. Nieto. 1996. Osmoprotectants in *Halo-*
monas elongata: high-affinity betaine transport sistem and choline-betaine pathway. *J. Bacteriol.* 178: 7221 – 7226
- Catherine L. Winder, Warwick B. Dunn, Stephanie Schuler, David Broadhurst, Roger Jarvis, Gillian M. Stephens, and Royston Goodacre. 2008. Global Metabolic Profiling of *Escherichia coli* Cultures: an Evaluation of Methods for Quenching and Extraction of Intracellular Metabolites. *Anal. Chem.*, 80, 2939-2948
- Christoph J. Bolten, Patrick Kiefer, Fabien Letisse, Jean-Charles Portais, and Christoph Wittmann. 2007. Sampling for Metabolome Analysis of Microorganisms. *Anal. Chem.*, 79, 3843-3849
- Csonka, L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic Stress. *Microbiol. Rev.* 53:121-147
- Hartman, A., S. R. Prabhu, and E. S. Galinski. 1991. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant and Soil* 137:105-109.
- Hochachka, P. W. and G. N. Somero. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Jana Boerner, Sebastian Buchinger, Dietmar Schomburg . 2007. A high-throughput method for microbial metabolome analysis using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 367 143–151
- Jochen Schaub, Carola Schiesling, Matthias Reuss, and Michael Dauner. 2006. Integrated Sampling Procedure for Metabolome Analysis. *Biotechnol. Prog.*, 22, 1434-1442

- Liu, K. and Sheng Luan. 2001. Internal aluminum block of plant inward K channels. *The Plant Cell*. 13:1453–1465
- Magda Fajjes, Astrid E. Mars, and Eddy J Smid. 2007. Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Cell Factories*, 6:27
- Maud M. Koek, Bas Muilwijk, Marie, J. van der Werf, and Thomas Hankemeier. 2006. Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 78, 1272-1281
- Metting, Jr. (ed.). (1993). *Soil Microbiology Ecology: Application in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Moat, A. G. And J. W. Foster. 1988. *Microbial Physiology*. Second edition. John Wiley & Sons. New York.
- Ohwada, T. and S. Sagisaka. 1987. The differential roles of K⁺, proline betaine in Osmoregulation of *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* 52:313-319
- Sanchez, P. A. 1976. *Properties and Management of Soil in the Tropics*. The First Edition. John Wiley and Sons, New York.
- Sumana Bhattacharya, Subhra Chakrabarti, Amiya Nayak and Sanjoy K Bhattacharya. 2003. Metabolic networks of microbial systems *Microbial Cell Factories*, 2:3
- Yaganza, E. S., D. Rioux, M. Simard, J. Arul and R. J. Tweddell. 2004. Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(11): 6800–6808