

# Karakterisasi Lipopolisakarida *Bradyrhizobium japonicum* KDR 15 Toleran Logam Berat

## *Characterization of Lipopolysaccharides of Bradyrhizobium japonicum KDR 15 Heavy Metal Tolerant*

ALFI DATIN ZAUQIAH<sup>1</sup>, TEDJA-IMAS<sup>1\*</sup>, DWI NINGSIH SUSILOWATI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

<sup>2</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian,  
Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

Diterima 13 Juli 2005/Disetujui 11 September 2006

The lipopolysaccharide (LPS) of *Bradyrhizobium japonicum* KDR 15 heavy metal tolerant strain was isolated by miniphenol-water extraction and yielded LPS in phenol and water phase. The LPS KDR 15 was further characterized by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) and showed many bands distributed from an area of high until low molecular weight (LPS IA, IB, and II). Composition analysis of the LPS had been done after acetic acid 1% hydrolysis. The polysaccharide portion consist of glucose, sucrose, galactose, mannose, xylose, arabinose, rhamnose, ribose, glucosamine, and 3-deoksi-D-manno-oktulosonat (KDO). Lipid A portion consisted of C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:1</sub>. The LPS also contained 0.02% of protein and 1.7% of phosphate. The presence of functional groups that shows negative charge densities such as phosphate and carboxyl within LPS KDR 15 assumed to be a potentially binding sites for accumulating heavy metals.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, heavy metal tolerant, lipopolysaccharides

### PENDAHULUAN

*Bradyrhizobium japonicum*, mikrosimbion tanaman kedelai yang mampu menambat nitrogen molekular, bersifat toleran terhadap lingkungan yang terkontaminasi logam berat pada konsentrasi cukup tinggi (Syamsuddin 2004). Berbagai molekul kompleks di permukaan sel pada pH fisiologis dapat memberi muatan negatif atau berinteraksi dengan ion atau molekul bermuatan pada lingkungan luar sehingga secara elektrostatis akan terikat pada permukaan sel. Pada bakteri gram negatif kemampuan mengikat logam diduga karena adanya gugus kimia pada membran luar, yaitu lapisan lipopolisakarida (LPS). Lapisan LPS bersifat sangat anionik dan melapisi permukaan membran terluar (Langley & Beveridge 1999).

Secara struktur, LPS dapat dibagi menjadi lipid A, oligosakarida inti (inti dalam dan luar), dan polisakarida O-antigen. Lipid A, merupakan bagian hidrofobik dari molekul LPS yang amfipatik, terdiri atas fosfodiglukosamin dengan tujuh rantai asam lemak. Daerah inti dalam yang terikat dengan lipid A, terdiri atas dua atau tiga molekul 3-deoksi-D-manno-oktulosonat (KDO) dan dua atau tiga heptosa. Daerah ini relatif tetap di antara spesies bakteri. Daerah inti luar terdiri atas pentosa dan heksosa dengan struktur kovalen yang lebih bervariasi daripada inti dalam. Selanjutnya dijumpai O antigen

yang merupakan polimer dari pengulangan unit oligosakarida (tiga sampai enam) dan menentukan ciri khusus dari organisme. Komposisi O antigen bervariasi di antara spesies bahkan di antara galur.

Lipopolisakarida yang dikarakterisasi melalui SDS PAGE secara umum dapat dibedakan menjadi tiga bagian pita yang berbeda, yaitu LPS IA, LPS IB, dan LPS II (Kannenberg & Carlson 2001). Selanjutnya mereka menambahkan bahwa daerah A mengandung LPS I yang memiliki mobilitas elektroforesis yang rendah dan rantai O polisakarida yang panjang, sedangkan pada daerah B terdapat LPS I yang memiliki mobilitas dari menengah hingga tinggi dengan panjang rantai O polisakarida dari agak panjang hingga pendek. Daerah LPS II memuat molekul LPS dengan mobilitas yang tinggi dan tanpa rantai O polisakarida.

Bioakumulasi *B. japonicum* KDR 15 yang ditumbuhkan pada kaldu media sintetik bersama logam tunggal Cu, Zn, Ni, Pb, dan Cd selama 20 hari dengan pH awal 6.6 dan terukur dengan *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS), berturut-turut adalah sebagai berikut 3.65, 77.69, 216.61, 20.12, dan 2.07 ppm. Selain itu Syamsuddin (2004) memberikan paparan 1 mM logam Cu, Zn, Ni, Pb, dan Cd dengan pH 5.6 dan suhu 22 °C selama 15 menit pada KDR 15, dan melaporkan bahwa akumulasi logam untuk tiap mg bobot kering massa sel berturut-turut adalah  $0.70 \times 10^{-1}$ ,  $3.60 \times 10^{-1}$ ,  $1.90 \times 10^{-1}$ ,  $2.15 \times 10^{-1}$ ,  $0.07 \times 10^{-1}$  ppm. Berdasarkan kedua hasil penelitian tampak bahwa KDR 15 mempunyai afinitas terhadap logam Zn, Ni, dan Pb.

\*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-345011,  
E-mail: timas@telkom.net

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkaraktirasi lipopolisakarida dari *B. japonicum* KDR 15 yang toleran terhadap logam berat. Isolasi dan ekstraksi LPS dilakukan dengan metode minifenol-air dan metode Kit (*Intron Biotechnology*) yang selanjutnya dikarakterisasi analisis profil dan kandungan kimianya.

## BAHAN DAN METODE

**Sumber Galur.** Galur yang digunakan adalah *B. japonicum* KDR 15 toleran logam berat yang disimpan pada suhu -20 °C dalam gliserol 10% (Syamsuddin 2004). Bakteri diremajakan pada media agar-agar manitol ekstrak khamir (MEK) untuk memperoleh koloni tunggal, kemudian ditumbuhkan kembali pada agar-agar miring MEK untuk biakan stok dan kerja.

**Ekstraksi LPS dengan Metode Minifenol-Air (Prendergast et al. 2001; Venkatesh 2002).** *Bradyrhizobium japonicum* KDR 15 ditumbuhkan dalam dua liter kaldu MEK sampai tengah fase log ( $OD_{600} = 0.8-1.2$ ) dan disentrifugasi pada 6700 x g selama sepuluh menit dengan tabung sentrifugasi berkapasitas 250 ml. Pelet disuspensikan dalam larutan yang mengandung NaCl dan EDTA (NaCl 0.1% (b/v), 10 mM EDTA, pH 7.0) kemudian disentrifugasi pada 10 000 x g selama 20 menit hingga supernatan berwarna bening. Pelet dicuci tiga kali dalam bufer garam fosfat (PBS) pH 7.4 kemudian disentrifugasi (5 000 x g selama delapan menit) dan disuspensikan kembali dalam PBS steril. Larutan disentrifugasi seperti sebelumnya, kemudian disuspensikan kembali ke dalam 10 ml akuades. Setelah itu, fenol 90% yang telah dipanaskan pada 65 °C ditambahkan pada larutan dengan volume yang setara, lalu contoh dicampur selama satu menit, dan diinkubasikan pada suhu 65 °C selama sepuluh menit. Pada interval yang sama, contoh dicampur, didinginkan dengan es, kemudian disentrifugasi pada 12 000 x g selama sepuluh menit, secara berulang sampai muncul dua lapisan. Fase fenol dan fase air diekstraksi menggunakan 5 ml dietil eter. Fase dietil eter dibiarkan menguap, lalu fase fenol dan fase air yang mengandung LPS disimpan untuk tahap berikutnya.

Fase air yang masih mengandung polisakarida, RNA dan garam ditambah dengan 200 µg/ml proteinase-K (SIGMA) dan 50 µg/ml RNAse (SIGMA), kemudian dilakukan dialisis (SIGMA Seamless tubing D-0655) dalam akuades selama 72 jam pada 4 °C untuk menghilangkan garam dan residu fenol (Venkatesh 2002). Selanjutnya ditentukan bobot basahnya. Kehadiran protein pada LPS dianalisis dengan metode Bradford (1976).

**Ekstraksi LPS dengan Metode Kit (*Intron Biotechnology*).** Ekstraksi LPS berikut ini dilakukan sebagai pembandingan metode ekstraksi sebelumnya. Sebanyak 5 ml kultur bakteri ( $OD_{600} = 0.8-1.2$ ) disentrifugasi pada 15 000 x g selama 30 detik. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 1 ml bufer lisis dan dicampur sampai gumpalan sel larut dengan sempurna. Selanjutnya ditambah dengan 200 µl kloroform, dicampur dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama lima menit. Larutan disentrifugasi kembali pada 15 000 x g selama sepuluh menit pada 4 °C. Sebanyak 400 µl supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung

1.5 ml yang baru. Kemudian supernatan yang diambil ditambah dengan 800 µl bufer purifikasi dan dicampur dengan baik. Kemudian diinkubasi selama sepuluh menit pada suhu -20 °C. Larutan ini disentrifugasi pada 15 000 x g selama 15 menit pada 4 °C. Pelet LPS yang diperoleh dicuci dengan etanol 70% lalu dikeringkan.

**Analisis Profil LPS.** Lipopolisakarida dianalisis dengan menggunakan elektroforesis (GIBCO BRL V15.17, USA) SDS PAGE (Laemmli 1970). Pada elektroforesis ini disiapkan gel pemisah 15%, gel pengumpul 5%, bufer elektroda dan bufer contoh. Sebanyak 20 µl contoh dan bufer contoh (1:1) dimasukkan ke dalam sumur gel pengumpul yang telah terendam bufer pemisah sebelumnya. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 150 volt dengan kuat arus 36 mA selama empat jam.

Gel diwarnai dengan pewarnaan perak sesuai dengan prosedur Harlow dan Lane (1988). Gel direndam dalam 250 ml larutan etanol 30% dan asam asetat 10% selama tiga jam hingga satu malam sambil diagitasi perlahan. Setelah itu gel direndam dalam 250 ml larutan etanol 30% selama 30 menit sebanyak dua kali. Pencucian dilakukan dengan merendam gel dalam air bebas ion selama sepuluh menit sebanyak tiga kali. Gel kemudian direndam dalam 250 ml larutan AgNO<sub>3</sub> 0.1% dan diinkubasi selama 30 menit, lalu gel dicuci dengan air bebas ion yang dialirkan selama 20 detik. Gel kemudian ditambahkan 250 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5% dan formaldehida 0.02%, sambil diagitasi hingga terbentuk pita-pita LPS dalam beberapa menit. Apabila latar mulai berwarna, inkubasi dihentikan dengan mencuci gel dalam larutan asam asetat 1%, lalu dicuci dengan air bebas ion selama sepuluh menit beberapa kali.

**Analisis Polisakarida dan KDO.** Sebanyak 259 mg LPS fase air dihidrolisis dengan 10 ml asam asetat 1% pada 100 °C, selama lima jam, kemudian disentrifugasi pada 16 000 x g selama sepuluh menit. Supernatan yang diperoleh adalah bagian polisakarida, yang selanjutnya diekstrak dengan metanol 60%, kemudian fase metanol dianalisis dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Kondisi HPLC menggunakan eluen metanol 80% dengan sistem isokratik dan kecepatan alir 1.0 ml/menit. Kolom yang digunakan khusus untuk analisis karbohidrat dengan detektor *Refractor Index Detector* (RID) dan diinjeksikan sebanyak 20 µl. Konsentrasi sakarida tanpa hidrolisis asam asetat dihitung berdasarkan:

$$\text{Konsentrasi sakarida (ppm)} = \frac{\text{Luas area contoh}}{\text{Luas area standar}} \times 200 \text{ ppm}$$

Konsentrasi sakarida dengan hidrolisis asam asetat dihitung berdasarkan:

$$\text{Konsentrasi sakarida (ppm)} = \frac{\text{Luas area contoh}}{\text{Luas area standar}} \times 150 \text{ ppm}$$

**Analisis Kandungan Asam Lemak.** Sebanyak 3 ml LPS fase air dihidrolisis dengan 3 ml asam asetat 1% pada 100 °C selama dua jam, kemudian disentrifugasi 16 000 x g selama sepuluh menit. Pelet dicuci dengan akuades dan diperoleh 96 mg lipid A. Sebanyak 20-30 mg lipid A ditambah dengan 1 ml NaOH 0.5N dalam metanol, kemudian dihidrolisis selama

20 menit. Selanjutnya ditambah 2 ml BF<sub>3</sub> 16% dalam metanol dan ditambah 2 ml NaCl jenuh untuk menghilangkan emulsi. Larutan diekstraksi dengan heksana. Lapisan heksana kemudian dipindahkan ke dalam wadah yang berisi 0.1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat. Contoh selanjutnya diinjeksikan sebanyak 2 µl pada kromatografi gas/gas chromatography (GC) (Shimadzu 17A, Jepang) dan dibandingkan dengan standar asam lemak. Kondisi GC konstan pada kecepatan alir 1.0 cm/s, dengan menggunakan kolom *fused silica capillary*, dan detektor *flame ionization detector* (FID). Konsentrasi asam lemak dihitung berdasarkan:

$$\text{Konsentrasi asam lemak (\% b/b)} = \frac{\text{Luas area sampel} \times \text{Konsentrasi standar (b/v)} \times \text{Luas area standar}}{\text{Bobot contoh}}$$

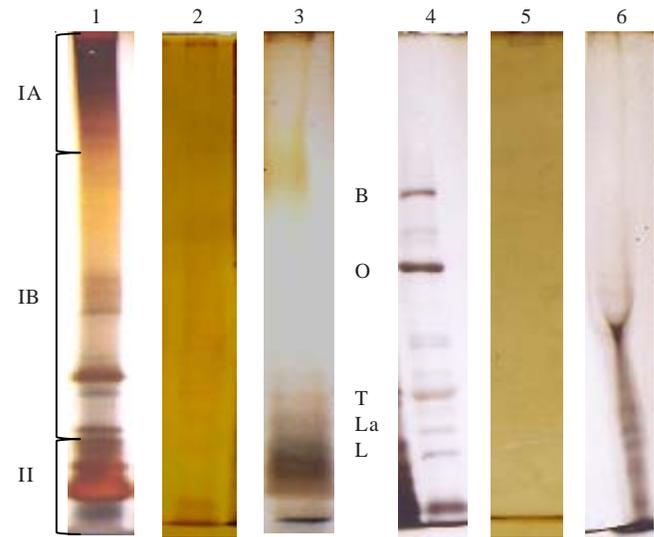
**Analisis Kandungan Fosfat.** Lipopolisakarida dengan berat basah 26 mg dihidrolisis selama ± 24 jam dengan HNO<sub>3</sub> pekat sampai larutan menjadi jernih, kemudian ditambah akuades hingga 50 ml dan 0.05 ml indikator fenoltalein. Larutan ditambah dengan 8 ml reagen kombinasi (5N·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K(SbO)C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·1/2H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, asam askorbat) dan dicampurkan dengan baik. Setelah sepuluh menit, larutan diukur absorbansinya pada 880 nm. Konsentrasi contoh diketahui dengan kurva standar yang telah dibuat sebelumnya (William 1984).

## HASIL

**Analisis Profil LPS.** Lipopolisakarida KDR 15 fase air hasil ekstraksi minifenol-air dengan proses dialisis menunjukkan kandungan protein sebesar 0.02%. Profil LPS fase air baik tanpa dialisis (Gambar 1, kolom 1) maupun dengan dialisis (Gambar 1, kolom 2) secara umum menunjukkan pita-pita LPS berbobot molekul tinggi dan berbobot molekul rendah mirip pola tangga. Gel elektroforesis pada LPS dari metode kit (Gambar 1, kolom 5) hanya menunjukkan satu berkas pita yang terdapat di bagian bawah gel. Lipopolisakarida KDR 15 fase fenol (Gambar 1, kolom 6) memperlihatkan pita yang terkonsentrasi pada daerah berbobot molekul rendah.

**Analisis Polisakarida dan KDO.** Hasil ekstraksi LPS fase air KDR 15 dengan bobot 4.7% (b/b) dari bobot basah bakteri digunakan untuk analisis polisakarida dan KDO. Mengingat jumlah LPS fase fenol tidak mencukupi maka fase ini tidak

dianalisis lebih lanjut. Komposisi polisakarida dari LPS fase air sebelum dan sesudah dihidrolisis asam asetat 1% (Tabel 1), diperoleh dari pengolahan data kromatogram analisis



Gambar 1. Gel elektroforesis LPS *B. japonicum* KDR 15. (1) 10 µl LPS fase air tanpa dialisis, daerah IA, IB, dan II adalah pengelompokan molekul komponen LPS berdasarkan mobilitas (Kannenberg & Carlson 2001); (2) 10 µl LPS fase air dengan dialisis; (3) standar 100 µg LPS *Salmonella minnesota* (SIGMA); (4) standar *Low molecular weight range* dengan bobot molekul B, BSA (66 000 Da); O, ovalbumin (45 000 Da); T, tripsinogen (24 000 Da); La, beta-laktoglobulin (18 400 Da); L, lisozim (14 300 Da); (5) 140 µg LPS dari metode Kit (*Intron Biotechnology*); (6) 2.5 µl LPS fase fenol.

Tabel 1. Komposisi polisakarida LPS *B. japonicum* KDR 15 tanpa dan dengan hidrolisis asam asetat 1%

Komponen polisakarida	Konsentrasi (ppm)	
	Tanpa hidrolisis	Dengan hidrolisis
Glukosa	99	21.29
Sukrosa	184	48.80
Galaktosa	192	90.49
Manosa	294	33.90
Xilosa	632	34.31
Arabinosa	89	45.48
Ramnosa	276	74.94
Ribosa	49	33.12
Glukosamin	972	51.99
KDO	*tttd	19.35

\*tttd (tidak terdeteksi) menyatakan bahwa konsentrasi gula di bawah 0.01 ppm

Tabel 2. Data kromatogram analisis polisakarida LPS KDR 15 tanpa hidrolisis asam asetat 1% menggunakan HPLC

Waktu retensi (mnt)		Jenis polisakarida	Luas area		Konsentrasi (%)	
Standar	LPS KDR 15		Standar	LPS KDR 15	Standar	LPS KDR 15
2.75	2.69	Glukosa	135542	67093	9.95	12.36
3.67	3.65	Sukrosa	123722	113824	9.09	9.38
4.82	4.76	Galaktosa	151374	145319	11.17	11.38
5.74	5.75	Manosa	150031	220546	11.02	4.14
6.99	6.95	Xilosa	136860	432478	10.05	10.95
8.06	8.07	Arabinosa	117507	52291	8.63	9.21
9.14	8.97	Ramnosa	143872	197163	10.49	11.97
9.77	9.82	Ribosa	403772	98924	29.65	9.21
11.76	11.41	Glukosamin	136064	661271	42.85	5.42
14.78	-	KDO	-	-	-	-

Tabel 3. Data kromatogram analisis polisakarida LPS KDR 15 dengan hidrolisis asam asetat 1% menggunakan HPLC

Waktu retensi (mnt)		Jenis polisakarida	Luas area		Konsentrasi (%)	
Standar	LPS KDR 15		Standar	LPS KDR 15	Standar	LPS KDR 15
2.05	2.02	Glukosa	184121	27547	9.34	5.12
2.86	2.89	Fruktosa	233643	46436	11.12	8.62
4.05	4.08	Sukrosa	178611	58109	8.50	10.79
5.18	5.12	Galaktosa	174679	27107	8.31	5.03
5.82	5.86	Manosa	221675	50101	10.55	9.30
7.31	7.30	Xilosa	212259	48551	10.10	9.02
8.11	8.14	Arabinosa	216898	65760	10.32	12.21
9.05	9.04	Ramnosia	102618	51270	4.88	9.52
10.87	10.84	Ribosa	187830	41472	8.94	7.70
11.78	11.77	Glukosamin	165113	57227	7.86	10.63
12.93	12.93	KDO	214481	27672	10.20	5.14

Tabel 4. Data kromatogram hasil analisis asam lemak LPS KDR 15 dengan GC

Waktu retensi (mnt)		Jenis asam lemak	Luas area		Konsentrasi (%)	
Standar	LPS KDR 15		Standar	LPS KDR 15	Standar	LPS KDR 15
85.32 x 10 <sup>-1</sup>	-	C <sub>14:0</sub>	43851	-	3.29 x 10 <sup>-2</sup>	-
102.44 x 10 <sup>-1</sup>	10.316	C <sub>16:0</sub>	171874	1966	12.89 x 10 <sup>-2</sup>	0.0011
131.35 x 10 <sup>-1</sup>	-	C <sub>18:0</sub>	129158	-	9.69 x 10 <sup>-2</sup>	-
146.74 x 10 <sup>-1</sup>	14.782	C <sub>18:1</sub>	2363378	2589	177.28 x 10 <sup>-2</sup>	0.0014
168.57 x 10 <sup>-1</sup>	-	C <sub>18:2</sub>	477859	-	35.84 x 10 <sup>-2</sup>	-
180.55 x 10 <sup>-1</sup>	-	C <sub>20:0</sub>	126683	-	9.50 x 10 <sup>-2</sup>	-
202.08 x 10 <sup>-1</sup>	-	C <sub>18:3</sub>	242814	-	18.21 x 10 <sup>-2</sup>	-

polisakarida fase air LPS tanpa dan dengan hidrolisis (Tabel 2 & 3). Setelah dihidrolisis tampak penurunan jumlah gula, sedangkan KDO dapat terdeteksi.

Komponen gula terbanyak dari LPS KDR 15 berada dalam bentuk gula netral, sedangkan gula amin yang teridentifikasi hanya glukosamin. Komponen gula dengan konsentrasi di dalam LPS yang dihidrolisis antara 45.48 hingga 90.49 ppm secara berurutan yakni galaktosa, ramnosia, glukosamin, sukrosa dan arabinosa (Tabel 1). Komponen yang relatif sedikit di antaranya xilosa, manosa, ribosa, fukosa, glukosa dan KDO (3-deoksi-D-manno-2-oktulosonat), dengan konsentrasi terbesar pada xilosa (34.31 ppm) dan terkecil pada KDO (19.35 ppm).

**Analisis Asam Lemak.** Komponen asam lemak yang teridentifikasi hanya C<sub>16:0</sub> dan C<sub>18:1</sub> (Tabel 4 dan 5). Asam palmitat (C<sub>16:0</sub>) merupakan asam lemak dengan rantai hidrokarbon jenuh yang memiliki 16 molekul karbon C, sedangkan asam oleat (C<sub>18:1</sub>) memiliki rantai hidrokarbon tidak jenuh dengan 18 molekul karbon C dan satu ikatan rangkap. Pada kromatogram dijumpai banyak puncak grafik (gambar tidak disertakan), namun karena konsentrasinya di bawah sensitivitas alat (<0.01 ppm) menjadi tidak terdeteksi oleh GC.

**Analisis Fosfat.** Dari analisis spektrofotometri pada panjang gelombang 880 nm diperoleh fosfat yang terkandung dalam LPS KDR 15 sebesar 1.7%.

## PEMBAHASAN

Kandungan protein LPS KDR 15 lebih rendah dari protein yang terdapat pada LPS *Vibrio parahaemolyticus* (Tzyy & Tuu *et al.* 1992) yakni sebesar 0.1-0.5% dan LPS *S. minnesota* sebesar 3% (SIGMA L6261). Prendergast *et al.* (2001) dalam

Tabel 5. Komposisi asam lemak LPS *B. japonicum* KDR 15

Komponen asam lemak	Konsentrasi (% b/b)
- C <sub>16:0</sub>	1.66
- C <sub>18:1</sub>	1.80

penelitiannya membandingkan berbagai metode ekstraksi LPS. Metode ekstraksi minifenol-air dilaporkan bebas protein sehingga dapat disimpulkan bahwa metode minifenol cukup baik untuk mengekstrak LPS.

Hasil ekstraksi minifenol-air LPS KDR 15 menunjukkan bahwa LPS tidak hanya terdapat pada fase air saja (Gambar 1, kolom 1) seperti yang dikemukakan Venkatesh (2002) pada LPS *Pseudomonas syringae* pv. *apii*, tapi juga dijumpai pada fase fenol (Gambar 1, kolom 6). Lipopolisakarida yang larut fenol sebelumnya dijumpai pada *Legionella pneumophilla* (Nolte *et al.* 1986), *B. japonicum* 61A123 (Carrion *et al.* 1990), dan *Rhizobium* (Kannenberg & Carlson 2001). Menurut Carrion *et al.* (1990) terekstraknya LPS ke dalam fase fenol disebabkan kehadiran deoksiheksosa dan deoksi-N-asetilaminoheksosa pada rantai O-polisakarida yang mempengaruhi hidrofobitasnya.

Lipopolisakarida fase fenol (Gambar 1, kolom 6) dan fase air (Gambar 1, kolom 1) menunjukkan pita-pita LPS dengan bobot molekul yang mirip pada daerah bawah gel. Pita yang mirip pada kedua fase ini disebabkan sekitar 28% air mampu larut dalam fenol dan membentuk fase homogen pada lapisan fenol sehingga sebagian kecil LPS yang terdapat pada lapisan air dapat terekstrak ke dalam lapisan fenol (Schurmann & Diederichs 1964). Pita pada fase air lebih beragam dibandingkan dengan fase fenol, karena sebagian besar LPS terekstrak pada fase air (Kannenberg & Carlson 2001).

Ekstrak LPS fase air baik tanpa dialisis (Gambar 1, kolom 1) maupun dengan dialisis (Gambar 1, kolom 2) secara umum menunjukkan tipe yang sama, yakni memperlihatkan pita berbobot molekul tinggi dan pita berbobot molekul rendah mirip pola tangga. Akan tetapi pita-pita LPS fase air hasil dialisis kurang begitu tampak. Hal ini diduga karena ada penurunan jumlah gula (Tabel 1). Pita LPS merupakan pita dengan protein yang sangat sedikit mengingat kandungan protein pada LPS fase air hanya sekitar 0.02%. Perbedaan konsentrasi LPS yang dipakai dan sensitivitas pewarnaan dapat memberikan pola pita yang berbeda untuk galur yang sama (Venkatesh 2002). Lipopolisakarida dengan dan tanpa dialisis memiliki komponen yang relatif sama karena proses dialisis yang dilakukan hanya berfungsi untuk membuang garam, mengurangi residu fenol, dan menghilangkan komponen lain yang memiliki bobot molekul di bawah 12 000 Da. Pembahasan lebih jauh akan terfokus pada LPS tanpa dialisis karena keterbatasan visualisasi pada pita LPS setelah dialisis.

Berdasarkan keberadaan rantai O-polisakarida, LPS bakteri dapat dibedakan menjadi dua tipe, yakni *smooth* dan *rough*. Lipopolisakarida fase air KDR 15 (Gambar 1, kolom 1) memperlihatkan fenotipe S-LPS (*smooth*) seperti LPS standar *Salmonella minnesota* (Gambar 1, kolom 3) yang ditunjukkan dengan penampakan pita-pita berbobot molekul tinggi yang berlokasi di bagian atas gel yang disebut Kannenberg dan Carlson (2001) sebagai daerah LPS IA. Pola pita seperti tangga muncul pada gel karena keragaman panjang rantai O-polisakarida molekul LPS (Venkatesh 2002).

Gel elektroforesis LPS dari metode Kit (*Intron Biotechnology*) (Gambar 1, kolom 5) hanya menunjukkan satu berkas pita yang terdapat di bagian paling bawah gel. Sedikitnya pita yang terbentuk diduga karena LPS yang dihasilkan dari metode ini sukar larut, akibat proses ultrasonikasi dan pendidihan yang kurang sempurna sehingga tidak terpisah dengan baik dalam gel elektroforesis.

Lipopolisakarida KDR 15 fase air (Gambar 1, kolom 1) tampak terdistribusikan pada ketiga daerah dengan pita yang lebih dominan pada daerah II seperti yang dikemukakan Kannenberg dan Carlson (2001). Hal ini menunjukkan molekul LPS didominasi O-polisakarida dengan rantai pendek hingga tidak tampak rantai lagi. Pita LPS pada fase fenol (Gambar 1, kolom 6) juga dominan pada daerah dengan mobilitas elektroforesis tinggi (daerah II). Hal ini berbeda dengan penelitian Kannenberg dan Carlson (2001) terhadap *Rhizobium*, yang melaporkan bahwa LPS yang diekstrak dari lapisan fenol akan terkonsentrasi pada daerah dengan mobilitas elektroforesis rendah.

Carlson (1984) menyatakan bahwa LPS berbagai *Rhizobium* hasil SDS PAGE dapat dikarakterisasi berdasarkan bobot molekulnya menjadi dua daerah yang memiliki tingkat keragaman yang berbeda. Daerah pertama dengan keragaman yang tinggi terdiri atas LPS dengan kisaran bobot molekul dari BSA (66 000 Da) hingga lisozim (14 300 Da). Daerah kedua dengan bobot molekul rendah dan mobilitas elektroforesis yang lebih tinggi dari lisozim memiliki pita yang kurang lebih sama.

Lipopolisakarida KDR 15 memiliki banyak pita dengan kisaran bobot molekul yang beragam. Daerah beragam LPS KDR 15 terdapat pada kisaran bobot molekul BSA hingga tripsinogen yang menyatakan adanya pengulangan unit O-polisakarida yang berbeda-beda. Peningkatan pada mobilitas elektroforesis akan menurunkan jumlah unit pengulangan rantai O-polisakarida, hingga pada daerah lebih kecil dari lisozim dan tidak memiliki rantai O-polisakarida (Carlson 1984).

Berdasarkan penelitian Carrion *et al.* (1990) mengenai komponen polisakarida LPS maka sakarida LPS KDR 15 merupakan bagian dari lipid A, daerah inti dan O-antigen. Glukosamin terdapat pada lipid A dan bagian inti, sedangkan galaktosa, manosa, dan ramnosa terdapat pada inti dan O-antigen. Glukosa dan KDO merupakan komponen khas pada oligosakarida inti, sedangkan fruktosa, xilosa, ribosa, dan arabinosa merupakan komponen glikosil pada O-antigen.

Bobot molekul polisakarida LPS dengan hidrolisis ternyata lebih rendah dibandingkan dengan tanpa hidrolisis. Carrion *et al.* (1990) menyatakan hidrolisis asam lemah dapat mengurangi bobot molekul polisakarida dalam LPS. Konsentrasi KDO di dalam LPS KDR 15 hanya  $0.19 \times 10^{-2}\%$  dan relatif tidak berbeda dengan KDO *B. japonicum* 61A123 yang kurang dari 1%. Kandungan KDO yang rendah diduga disebabkan ikatan glikosidik antara lipid A dan KDO sangat stabil, sehingga tidak seluruh KDO dapat dilepaskan. Menurut Carrion *et al.* (1990) komponen polisakarida lain yang juga terdapat pada LPS *B. japonicum* 61A123 di antaranya fukosamin, kuinovosamin, 4-O-metil manosa, dan 2,3-DAH (2,3-diamino-2,3-dideoksiheksosa) yang merupakan gula khas penanda pada lipid A.

Kehadiran molekul fosfat diduga berhubungan erat dengan kemampuannya dalam pengikatan logam. Hasil eksperimen pengikatan logam menggambarkan bahwa gugus LPS fosfat secara kuat berinteraksi dengan logam divalen atau trivalen (Strain *et al.* 1983). Kandungan fosfat LPS sebesar 1.7% dijumpai pada *B. japonicum* KDR 15 tetapi tidak terdeteksi pada LPS *B. japonicum* 61A123 (Carrion *et al.* 1990). Lins dan Straatsma (2001) melaporkan bahwa daerah yang banyak mengandung fosfat pada LPS *P. aeruginosa* berasosiasi dengan gula *N*-asetil glukosamin pada lipid A yang mengikat dua gugus fosfat/molekul LPS dan monomer heptosa pada oligosakarida inti bagian dalam, yang mengikat tiga gugus fosfat/molekul LPS. Fosfat LPS KDR 15 diduga berperan dalam mengikat kation dan dari penelitian sebelumnya KDR 15 termasuk mempunyai kemampuan mengakumulasi logam (Syamsuddin 2004).

Kation berfungsi untuk menstabilkan struktur membran karena tingginya muatan negatif pada *core oligosaccharide* dan untuk mengimbangi gugus fungsional lain yang bermuatan negatif. Kehadiran gugus fungsional bermuatan negatif, seperti hidroksil pada polisakarida, karboksil pada KDO, dan fosfat pada LPS KDR 15 memberikan situs pengikatan yang potensial untuk mengakumulasi logam berat.

Mikroorganisme membutuhkan sejumlah logam untuk melangsungkan reaksi biokimiawi. Sebagai katalis, kofaktor enzim, berperan dalam aktivitas proses reaksi oksidasi reduksi

dan stabilitas protein. Logam dapat berakumulasi di atas konsentrasi fisiologis akibat kegiatan yang tidak spesifik, sistem transpor konstitutif yang menimbulkan efek toksik dengan membentuk ikatan koordinat dengan anion menghambat gugus fungsional enzim, menghambat sistem transpor, menggantikan logam esensial dari situs pengikatan dan mengganggu integritas membran seluler. Meskipun demikian ada beberapa mekanisme yang dapat dipakai untuk mengatasi konsentrasi logam yang tinggi yaitu (i) mengeluarkan (*efflux*) logam beracun dari sel; (ii) konservasi enzimatis; (iii) pemisahan secara intra atau ekstraseluler; (iv) penghalang permeabilitas; dan (v) reduksi sensitivitas target seluler (Dopson *et al.* 2003).

Lloyd (2002) menyatakan bahwa meskipun mikroorganisme tidak dapat mendegradasi logam tetapi mereka dapat mengubah sifat kimiawi melalui berbagai mekanisme, sehingga dapat digunakan untuk dekontaminasi logam yang melibatkan lintasan biokimiawi yang spesifik agar dapat melindungi sel dari logam berat yang toksik. Komponen biokimiawi dapat mengenal dan mendetoksikasi logam sehingga bertindak sebagai biosensor untuk konsentrasi logam yang berada dalam ketersediaan biologis. Untuk bioremediasi logam, mikroorganisme dapat melangsungkan biosorpsi, *bioleaching*, transformasi yang dikatalisis enzim, dan biomineralisasi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai Ditjen Dikti Depdiknas RI melalui LPPM IPB yang diberikan kepada Tedja Imas dengan nomor 010/P4T/DPPM/PHBXII/III/2004 tanggal 1 Maret 2004.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microorganism quantities of protein in utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Carlson RW. 1984. Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *J Bacteriol* 158:1012-1017.
- Carrion M, Bhat UR, Rheus B, Carlson RW. 1990. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *B. japonicum*. *J Bacteriol* 172:1725-1731.
- Dopson M, Baker-Austin C, Koppeneedi PR, Bond PL. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance, mechanisms in acidophilic microorganism. *Microbiology* 149:1959-1970.
- Harlow E, Lane D. 1988. *Antibodies A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab.
- Kannenberg EL, Carlson RW. 2001. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol Microbiol* 39:379-394.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langley S, Beveridge TJ. 1999. Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Appl Environ Microbiol* 65:489-498.
- Lins RD, Straatsma TP. 2001. Computer simulation of the rough lipopolysaccharide membrane of *P. syringae*. *J Biophys* 81:1037-1046.
- Lloyd JR. 2002. Bioremediation of metals: the application of microorganism that make and break minerals. *Microbiol Today* 29:67-69.
- Nolte FS, Conlin CA, Motley MA. 1986. Electrophoretic and serological characterization of the LPS of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 52:676-681.
- Prendergast MM, Kosunen TU, Moran AP. 2001. Development of an immunoassay for rapid detection of ganglioside GM<sub>1</sub> mimicry in *Campylobacter jejuni* strains. *J Clin Microbiol* 39:1494-1500.
- Schurmann E, Diederichs R. 1964. Thermodynamik des systems phenol-wasser. *Berichte der Bunsengesellschaft* 68:434-455.
- Strain MS, Fesik SW, Armitage IM. 1983. Structure and metal binding properties of lipopolysaccharides from heptoseless mutants of *E. coli* studied by <sup>13</sup>C dan <sup>31</sup>P Nuclear Magnetic Resonance. *J Biol Chem* 258:13466-13477.
- Syamsuddin AN. 2004. Bioakumulasi logam berat oleh beberapa galur *B. japonicum* [Skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Tzyy JH, Tuu JC. 1992. Electrophoretic and chemical characterization of lipopolysaccharides of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 74:3140-3146.
- Venkatesh B. 2002. Characterization of bacterial lipopolysaccharides (*P. syringae* pv. *tomato* and *P. syringae* pv. *apii*) and pectins of tomato and celery plants (*Lycopersicon esculentum* and *Apium graveolens*) regarding their possible role in host/pathogen interaction [Disertasi]. Gottingen: Zur Elangung des Doktorgrades Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultaten Der Georg-August-Universitat zu Gottingen.
- William S. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Ed ke-14. Arlington: AOAC Inc.