

Bioakumulasi Logam Berat oleh Beberapa Galur *Bradyrhizobium japonicum*

Heavy Metals Bioaccumulation of Several *Bradyrhizobium japonicum* Strains

ADE NOOR SYAMSUDIN¹, TEDJA-IMAS^{1*}, SUMINAR SETIATI ACHMADI²

¹Departemen Biologi, ²Departemen Kimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 22 Juni 2004/Disetujui 28 Juni 2005

Heavy metal utilization in industry and agriculture have caused an environmental problem to existing life. Bioaccumulation is made up by a concentration of certain chemical compounds in living tissues. The objective of this research was to reveal the ability of lipopolysaccharides (LPSs) of heavy metal *Bradyrhizobium japonicum* tolerant strains in accumulating heavy metals. The strains used were BDG 10, KDR 10, and KDR 15. The ability of each strains on heavy metal accumulation of Cu, Pb, Zn, Ni, and Cd were quantitatively determined using atomic absorption spectrophotometry. The result showed that each strains has its own capacity to accumulate heavy metals. Accumulation of Cu (0.100), Pb (0.320), and Cd (0.048) ppm/mg dry weight by KDR 10 seem higher than BDG 10 and KDR 15. The highest accumulation of Zn and Ni was shown by KDR 15 in which the value were 0.360 and 0.165 ppm/mg dry weight, respectively and the least accumulation of all heavy metal studied was shown by BDG 10.

PENDAHULUAN

Logam berat merupakan unsur yang banyak digunakan dalam berbagai industri dan pertanian baik sebagai bahan baku, bahan tambahan maupun sebagai katalis. Penggunaan logam berat tersebut telah menimbulkan masalah pencemaran yang sangat serius terutama disebabkan oleh limbah yang mengandung logam berat memasuki lingkungan dalam jumlah semakin meningkat melebihi konsentrasi alamiah (Darmono 1995). Pencemaran logam berat dapat menimbulkan pengaruh negatif terhadap lingkungan terutama biota yang hidup di dalamnya dan juga manusia yang tinggal di sekitarnya.

Toksistas logam dalam suspensi tanah dapat dikurangi oleh aktivitas mikroba dan dipengaruhi juga oleh faktor lingkungan yaitu tipe tanah, aerasi, spesiasi logam, sumber C, dan pH. Komunitas mikroba berperan penting dalam bioremediasi tanah tercemar logam yaitu dapat mengubah sifat kimiawi dan mobilitas logam melalui akumulasi, mobilisasi, dan imobilisasi logam (Stephen *et al.* 1999).

Struktur permukaan bakteri merupakan penghalang fisik dan fungsional antara sel bakteri dan lingkungan. Berbagai molekul kompleks pada permukaan sel antara lain gugus kimia fosforil, karboksil, dan amino pada pH fisiologis dapat memberi muatan negatif atau anionik yang akan berinteraksi dengan ion atau molekul bermuatan yang berada pada lingkungan luar. Akibatnya kation logam secara elektrostatis akan terikat pada permukaan sel (Langley & Beveridge 1999).

Telaah interaksi ion logam dan dinding sel bakteri Gram positif terutama *Bacillus* sp. menunjukkan adanya peranan gugus karboksil pada peptidoglikan dan atau gugus fosforil

pada polimer sekunder asam teikoat dan teikuronat (Loyd 2002). Pada bakteri Gram negatif kemampuan mengikat logam diduga karena adanya lapisan lipopolisakarida (LPS) yang bersifat sangat anionik pada membran luar (Langley & Beveridge 1999; Madigan *et al.* 2000). Lipopolisakarida merupakan polisakarida yang terikat membran melalui bagian lipid yang tersisipkan pada lapisan tunggal fosfolipid sedangkan bagian sakarida berada pada bagian luar (Frayse *et al.* 2003).

Bakteri kelompok Rhizobiaceae, disamping mempunyai molekul LPS yang terdapat pada membran luar juga mempunyai molekul ekstrapolisakarida selular (EPS) yaitu polimer gula kompleks yang disekresi dan menyelimuti permukaan sel secara longgar (Chen *et al.* 1993). Selanjutnya polisakarida kapsular mengelilingi bakteri dengan matriks berupa hidrat yang memungkinkan bakteri resisten terhadap fage dan melindunginya dari kekeringan (Frayse *et al.* 2003).

Bradyrhizobium japonicum adalah bakteri Gram negatif yang mempunyai potensi dalam bioakumulasi logam berat dari lingkungan tercemar. Galur *B. japonicum* (BDG 10, KDR 10, dan 15, KTB 01, Bj 38, dan 40) toleran logam berat baik dalam bentuk sel bebas maupun sebagai mikrosimbion kedelai mampu mengakumulasi logam Cu, Zn, Ni, Pb, dan Cd dengan konsentrasi tertinggi yang berbeda-beda dalam media kaldu. Dalam hal ini BDG 10 sebagai mikrosimbion kedelai lebih mampu menahan konsentrasi Zn, Cd, dan Ni pada bagian atas tanaman lebih rendah dari tanaman kontrol tanpa inokulasi bakteri (Tedja-Imas *et al.* 1999). Penelitian ini bertujuan mengetahui kemampuan kuantitatif beberapa galur *B. japonicum* yang resisten terhadap paparan logam berat pada konsentrasi dan waktu tertentu dalam mengakumulasi logam.

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

BAHAN DAN METODE

Sumber Logam. Sumber logam yang dipakai ialah $\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{PbCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dan $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam $0.022 \mu\text{scm}^{-1}$ *ultrapure deionized water* (UDW) pada pH 5.6. Peralatan kaca, plastik, dan tabung sentrifus sebelum digunakan direndam dalam HNO_3 50% selama 24 jam kemudian dibilas dengan UDW.

Sumber Galur. Galur yang digunakan adalah *B. japonicum* toleran logam berat (BDG 10, KDR 10, dan KDR 15) yang disimpan pada suhu -20°C dalam gliserol 10% (Tedja-Imas *et al.* 1999). Bakteri diremajakan pada media kaldu manitol ekstrak khamir (MEK) dan dicawakan pada media agar-agar MEK segar dengan metode kuadran, sehingga diperoleh koloni tunggal.

Analisis Pengikatan Logam. Sel ditumbuhkan dalam media kaldu MEK sampai tengah fase eksponensial ($\text{OD}_{600} = 0.2$). Sebanyak 5 ml suspensi disentrifus pada $6000 \times g$ selama 10 menit, lalu pelet diresuspensi dalam 1 ml UDW dan dipindahkan ke dalam tabung 1.5 ml mikrosentrifus. Massa sel dicuci tiga kali dalam 1 ml UDW dengan bantuan sentrifugasi pada $16\,000 \times g$ selama 1 menit. Sel yang sudah dicuci diresuspensi dalam 1 ml larutan garam logam 1 mM pH 5.6 selama 15 menit pada suhu 22°C dan disentrifus pada $16\,000 \times g$ selama 1 menit. Supernatan disingkirkan dengan diasamkan dengan HNO_3 0.2% lalu disimpan pada suhu -20°C . Pelet dicuci empat kali dengan UDW dan supernatan yang dihasilkan setiap kali pencucian diasamkan dan disimpan seperti perlakuan sebelumnya. Akhirnya pelet sel dikeringkan pada suhu 60°C dan ditetapkan bobot keringnya (Langley & Beveridge 1999).

Pelet sel diresuspensi dalam 1 ml HNO_3 65%, setelah itu dipanaskan pada suhu 100°C hingga terbentuk pasta di dasar tabung. Pasta dilarutkan hingga volume akhir 1 ml HNO_3 0.2%. Jumlah logam dalam sampel menggambarkan jumlah logam yang diikat oleh sel selama 15 menit. Dua ulangan digunakan disamping kontrol selular dan kontrol aselular. Pelet sel kontrol selular yang dikeringkan pada suhu 60°C juga ditentukan bobot keringnya. Selanjutnya kandungan logam sampel diukur dengan menggunakan *atomic absorption spectrophotometry* (AAS) Varian Spectr. AA 30.

HASIL

Ciri Galur. *Bradyrhizobium japonicum* galur BDG 10, KDR 10, dan 15 yang ditumbuhkan pada media agar-agar MEK selama 15 hari pada suhu 25°C menunjukkan tipe koloni yang berbeda-beda. Galur BDG 10 bertipe *small dry* berbentuk bundar dengan diameter < 1 mm, permukaan cembung sedikit berlendir. Galur KDR 10 bertipe *large mucoid* berbentuk bundar, permukaan cembung dengan diameter > 1 mm dan berlendir sedangkan KDR 15 bertipe *large watery* berbentuk tidak beraturan dengan diameter > 1 mm dan berlendir. Ketiga galur memerlukan waktu yang berbeda untuk tumbuh mencapai fase tengah eksponensial ($\text{OD}_{600} = 0.2$) pada media kaldu MEK. Galur BDG 10 membutuhkan waktu relatif lebih lama yaitu 6.5 hari dibandingkan kedua galur lainnya.

Jumlah Bioakumulasi Logam. Galur KDR 10 mengakumulasi logam Cu, Pb, dan Cd lebih tinggi dari galur lainnya (Tabel 1) sedangkan akumulasi logam Zn dan Ni lebih banyak pada galur KDR 15 untuk waktu inkubasi 15 menit. Logam mungkin masih terhimpun di dalam supernatan. Logam Zn mungkin diikat oleh ketiga galur uji dalam jumlah yang relatif tidak berbeda yaitu 0.285 (KDR 10) - 0.360 (KDR 15) ppm. Jumlah logam yang terdapat pada kontrol selular < 0.005 ppm, nilai ini merupakan batas pengukuran terendah yang dapat dicapai dengan AAS.

Perbedaan sangat tajam tampak pada kontrol aselular dan kontrol selular dengan catatan logam kontrol selular tidak atau sangat sedikit dijumpai (Tabel 1). Logam dalam supernatan terlihat lebih tinggi dibandingkan di dalam pelet sel. Tiap galur menunjukkan afinitas yang berbeda terhadap logam. Galur BDG 10 menunjukkan afinitas tertinggi terhadap Zn dibandingkan dengan empat logam lainnya yaitu Cu, Ni, Pb, dan Cd, sedangkan KDR 10 terhadap Pb dan KDR 15 terhadap Zn.

Nisbah bobot kering massa sel yang dihubungkan dengan jumlah pengikatan logam dapat dilihat pada Tabel 2. Logam Cu diikat dalam jumlah tinggi oleh KDR 10 sebesar 0.100 ppm/mg bobot kering sel diikuti KDR 15 (0.070 ppm) dan BDG 10 (0.055 ppm) sedangkan untuk logam Zn paling tinggi oleh KDR 15 sebesar 0.360 ppm/mg bobot kering sel diikuti BDG 10 (0.345 ppm) dan KDR 10 (0.285 ppm) dan untuk logam Ni berturut-turut oleh KDR 15 (0.190 ppm), KDR 10 (0.165 ppm), dan BDG 10 (0.160 ppm). Secara umum dengan memperhatikan nilai rata-rata maka urutan afinitas terhadap logam untuk ketiga galur uji adalah sebagai berikut $\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cu} \geq \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Cd}$ (Tabel 2).

Tabel 1. Jumlah logam berat (ppm) yang diakumulasi galur uji selama 15 menit dengan kontrol selular dan kontrol aselular

Galur	Materi	Konsentrasi (ppm)				
		Cu	Zn	Ni	Pb	Cd
BDG 10	Pelet	0.055	0.345	0.160	0.130	< 0.005
	Supernatan	2.450	3.270	2.535	9.765	5.025
	Kontrol selular	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
	Kontrol aselular	4.850	6.090	6.680	8.550	4.830
KDR 10	Pelet	0.100	0.285	0.165	0.320	0.060
	Supernatan	2.420	2.815	2.650	9.400	3.560
	Kontrol selular	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
	Kontrol aselular	4.850	6.090	6.680	8.550	4.830
KDR 15	Pelet	0.070	0.360	0.190	0.215	0.007
	Supernatan	2.210	3.180	2.630	8.150	3.425
	Kontrol selular	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
	Kontrol aselular	4.850	6.090	6.680	8.550	4.830

Jumlah logam kontrol selular < 0.005 ppm dapat diabaikan

Tabel 2. Konsentrasi logam berat (ppm/mg) yang diikat massa sel galur uji selama 15 menit

Galur	Konsentrasi (ppm/mg bobot kering sel)				
	Cu	Zn	Ni	Pb	Cd
BDG 10	0.055	0.345	0.160	0.130	0.005
KDR 10	0.100	0.285	0.165	0.320	0.060
KDR 15	0.070	0.360	0.190	0.215	0.007
Rata-rata	0.175	0.330	0.171	0.220	0.007

PEMBAHASAN

Langley dan Beveridge (1999) melaporkan bahwa *P. aeruginosa* mengakumulasi Cu dengan kisaran 0.213-0.222 $\mu\text{M}/\text{mg}$ bobot kering sel. Sebelumnya Beveridge dan Koval (1981) melaporkan bahwa *Escherichia coli* mendeposit Cu dan Ni dengan jumlah $< 0.1 \mu\text{M}/\text{mg}$ bobot kering sel sedangkan Pb dan Zn dengan kisaran 0.1-0.40 $\mu\text{M}/\text{mg}$ bobot kering sel. Dengan demikian kemampuan akumulasi logam galur uji untuk Cu dengan kisaran 0.055-0.100 ppm/mg bobot kering sel, Pb antara 0.130-0.320 ppm/mg bobot kering sel dan Zn 0.285-0.360 ppm/mg bobot kering sel tidak berbeda dengan *E. coli* kecuali terhadap Ni dengan jumlah $> 0.1 \mu\text{M}/\text{mg}$ bobot kering sel. Selanjutnya Langley dan Beveridge (1999) mengemukakan bahwa logam terikat pada gugus fosforil dan karboksil pada inti-lipid A LPS *P. aeruginosa* dengan terlebih dahulu mempengaruhi hidrofobisitas sel. Lipopolisakarida meliputi 40% massa membran luar atau 0.6-1.1% dari bobot kering sel dan menonjol keluar permukaan sel hingga 5-10 nm. Dengan ciri fisik dan muatan negatif tersebut maka LPS merupakan faktor kunci dalam pelekatan mikroba pada permukaan mineral, pengambilan ion metal dan induksi reaksi presipitasi dan pelarutan (Lins & Straatsma 2001).

Afinitas pengikatan logam tiap galur uji terhadap logam ternyata berbeda-beda. Galur BDG 10 menunjukkan afinitas dengan urutan: $\text{Zn} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd}$, galur KDR 10 dengan urutan: $\text{Pb} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Cd}$, dan galur KDR 15 seperti: $\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Cd}$. Afinitas logam untuk KDR 10 dan 15 relatif berbeda pada logam Pb dan Zn meskipun tanah asal galur keduanya berasal dari kabupaten Kendari di Sulawesi Tenggara (Tedja-Imas *et al.* 1999). Perbedaan diduga terletak pada jumlah dan jenis muatan anionik lipopolisakarida kedua galur yang cenderung mengikat Pb lebih banyak daripada Zn untuk KDR 10 dan sebaliknya untuk KDR 15. Mengingat Pb bukan logam fungsional maka KDR 10 dapat berperan sebagai bioakumulator Pb. Demikian pula dengan Cd yang bukan kofaktor enzim dapat diakumulasi KDR 10 lebih tinggi dari dua galur lainnya meskipun dalam jumlah yang kecil yaitu 0.048 ppm/mg bobot kering sel.

Berkaitan dengan hal tersebut di atas telah dilaporkan sebelumnya oleh Lins dan Straatsma (2001) bahwa jumlah dan jenis muatan anionik LPS berpengaruh terhadap jumlah pengikatan ion Ca^{2+} . Salah satu residu LPS *P. aeruginosa* yang tersusun atas *N*-asetilglukoseamin (NAG) yang mempunyai 7 gugus OH^- dan asam 2-keto-3-deoksi-D-manooktonat KDO yang mempunyai 13 gugus OH^- dan 32 gugus COO^- sehingga semuanya berjumlah 45 gugus merupakan situs koordinasi untuk berikatan dengan Ca^{2+} . Secara keseluruhan 75% dari 624 situs koordinasi pada LPS dapat berikatan dengan Ca^{2+} .

Akumulasi logam oleh bakteri dapat berlangsung secara aktif atau pasif. Pengambilan secara aktif berlangsung sejalan dengan konsumsi ion logam untuk pertumbuhan mikroba yang dapat diakumulasi secara intraselular dengan jumlah yang terbatas mengingat pada konsentrasi tinggi dapat bersifat toksik. Pengambilan secara pasif dapat terjadi melalui pertukaran ion antara ion-ion monovalen atau divalen seperti

Na, Ca, dan Mg pada dinding digantikan oleh logam berat atau melalui ikatan langsung dengan komponen permukaan membran luar sel seperti lipopolisakarida. Kedua proses tersebut dapat bersifat bolak balik (Macaskie *et al.* 1987; Huges & Poole 1989; Klein & Thayer 1995).

Kontrol selular mengandung logam dalam jumlah yang sangat kecil sehingga dapat diabaikan. Kehadiran logam terutama Pb dan Cd diduga terbawa oleh sel bakteri yang mengalami paparan logam dalam rangkaian perlakuan untuk mendapatkan galur yang resisten terhadap logam (Tedja-Imas *et al.* 1999). Kandungan logam kontrol aselular menunjukkan kandungan logam yang diberikan ke dalam larutan tanpa kehadiran sel bakteri. Sebagian besar ion logam diduga berada di dalam fraksi supernatan sehingga dapat dikatakan logam berada dalam keadaan terlarut pada pH 5.6 (Dopson *et al.* 2003). Kadar logam kontrol aselular yang diharapkan merupakan jumlah kadar logam dalam pelet dan supernatan, ternyata dalam penelitian ini tidak terdapat kecocokan. Ketidaccocokan ini diduga karena kelemahan AAS yang terletak pada penyimpangan dalam pengukuran emisi antara lain akibat adanya anion tertentu dalam sampel yang mempersulit terbentuknya atom bebas, anion membentuk senyawa yang relatif sulit dipecahkan, elektron-elektron logam lain yang memperbesar jumlah atom sehingga absorpsi menjadi lebih besar, demikian pula kadar logam terukur.

Pengaruh logam sebagai ko-kontaminan pada interfase mikroba dan metal telah dipelajari oleh Ingram *et al.* (2004) terhadap *Shewanella putrefaciens* dengan memanfaatkan spektrometri massa ion sekunder (SIMS) dan SR-FTIR *synchrotron radiation Fourier transform infrared*. ALS *beamline* 1.4.3 pada SR-FITR dapat digunakan untuk menganalisis bakteri yang terpapar logam dan yang tidak. Perbedaan tampak antara spektra dari fase stasioner sel dengan hilangnya puncak pada daerah yang berasosiasi dengan karbohidrat dari sel terpapar logam dengan yang terlihat bila sel tidak terpapar logam. Pada area tersebut terdapat dua puncak yang menunjukkan ikatan fosfodiester, ikatan yang banyak dijumpai pada membran sel yang membentuk ikatan antara gliserol dan asam lemak, dan situs itu diduga merupakan situs pengikatan logam dari bakteri tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Bersaing XII dengan nomor 010/P4T/DPPM/PHB XII/III/2004 tanggal 1 Maret tahun 2004 a.n Tedja Imas.

DAFTAR PUSTAKA

- Beveridge TJ, Koval SF. 1981. Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K12. *Appl Environ Microbiol* 42:325-335.
- Chen H, Gartner E, Rolfe BG. 1993. Involvement of genes on a megaplasmid in the acid tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Appl Environ Microbiol* 59:1058-1064.
- Darmono. 1995. *Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup*. Jakarta: UI-Pr.

- Dopson M, Baker-Austin C, Koppeneedi PR, Bird PC. 2003. Growth in sulfidic mineral environments; metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology* 149:1954-1970.
- Frayse N, Couderc F, Poinot V. 2003. Surface polysaccharides involvement in establishing the rhizobium-legume symbioses. *Eur J Biochem* 270:1365-1380.
- Huges MN, Poole RK. 1989. *Metals and Microorganisms*. London: Chapman and Hall.
- Ingram JC, Cummings DE, Holman HY, Downing M. 2004. Investigation of interfacial chemistry of microorganism. <http://infrared.als.lbl.gov/pubs/2001Compendium-Ingram> PDF [19 Jul 2004].
- Klein DA, Thayer JS. 1995. Interaction between soil microbial community and organometallic compounds. Di dalam: Bollag JM, Stotzky (ed). *Soil Biochemistry*. Vol 6. New York: Marcel Dekker. hlm 320-345.
- 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 *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J* 81:1037-1046.
- Loyd JR. 2002. Bioremediation of metals, the application of microorganisms that make and break minerals. *Microbiol Today* 29:67-69.
- Macaskie LE, Dean ACR, Cheetham AK, Jakeman RJB, Sekarnulis J. 1987. Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp. the chemical nature of the accumulated metal precipitate and its location on the bacterial cells. *J Gen Microbiol* 133:539-544.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2000. *Biology of Microorganisms*. Ed ke-9. New Jersey: Prentice Hall.
- Stephen JR *et al.* 1999. Effect of toxic metals indigenous soil β -subgroup Proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65:95-101.
- Tedja-Imas, Mubarik NR, Irwadi TT, Erfiani. 1999. Seleksi galur-galur *Bradyrhizobium japonicum* resisten logam berat. Laporan Penelitian HB VI, Bogor, FMIPA: IPB.