

Profil Protein *Klebsiella* sp. dalam Kondisi Cekaman Osmotik dan Keasaman Protein Profile of *Klebsiella* sp. under Osmotic and Acid Shock

Ali Ikhwan^{1*}, Triwibowo Yuwono², dan Jaka Widada³

¹Pusat Pengembangan Bioteknologi, Universitas Muhammadiyah Malang

²Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: ikhwan_umm@yahoo.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

A study has been conducted to determine the profile of proteins synthesised under osmotic and acid shock in *Klebsiella* sp. grown in minimal medium. Osmotic shock was mimicked by using NaCl, while acid shock was imposed by using aluminium sulphate. *Klebsiella* sp. was grown in minimal media supplemented with NaCl, or aluminium sulphate, as a single shock-imposing substance, or by using both substances to impose a double-shock effect. Total protein extracted from the cell was electrophoresed on SDS-PAGE 12%. Analysis demonstrated that several intracellular, membrane, or extracellular proteins were synthesised under specific shock condition. Under osmotic shock, an intracellular protein of 42.7 kDa, and a membrane protein of 53.3 kDa were synthesised. Acid shock, on the other hand, resulted in the synthesis of intracellular proteins of 54.7 kDa, 25.3 kDa, and 14.2 kDa, and a 43.9 kDa membrane protein, and extracellular proteins of 17–29 kDa. Under double shock condition, a specific intracellular protein of 26.7 kDa and a membrane protein of 61.1 kDa were detected. The synthesised proteins indicated a different correlation pattern among shock conditions imposed. Under osmotic shock, it was observed that correlation was positive towards the shock effect, while under double shock correlation was observed to be negative towards proteins, and under acid shock correlation did not demonstrate a clear pattern.

Key words: Osmotic shock, acid shock, *Klebsiella* sp., protein profile

Abstrak

Penelitian dilakukan untuk mengetahui profil protein yang dibuat oleh *Klebsiella* sp. yang tumbuh dalam kondisi cekaman osmotik dan keasaman. Cekaman osmotik dilakukan menggunakan NaCl, sedangkan cekaman keasaman menggunakan aluminium sulfat. *Klebsiella* sp. ditumbuhkan dalam medium minimal yang ditambah dengan NaCl, atau aluminium sulfat, untuk menimbulkan efek cekaman tunggal, atau menggunakan kedua senyawa tersebut untuk menghasilkan efek cekaman ganda. Protein total yang diekstrak dari sel kemudian dielektroforesis pada SDS-PAGE 12%. Hasil analisis menunjukkan beberapa protein intraselular, protein membran, atau protein ekstraselular yang dibuat dalam kondisi cekaman spesifik. Dalam kondisi cekaman osmotik, dibuat protein intraselular berukuran 42,7 kDa, dan protein membran berukuran 53,3 kDa. Pada cekaman asam dihasilkan protein intraselular berukuran 54,7 kDa, 25,3 kDa, 14,2 kDa, dan satu protein membran berukuran 43,9 kDa, serta protein ekstraselular berukuran 17–29 kDa. Dalam kondisi cekaman ganda, terdeteksi satu protein intraselular spesifik berukuran 26,7 kDa dan satu protein membran berukuran 61,1 kDa. Dalam cekaman osmotik, diketahui terdapat korelasi positif, sedangkan dalam cekaman ganda terdapat korelasi negatif terhadap macam protein. Dalam cekaman keasaman, tidak diperoleh pola korelasi yang spesifik.

Kata kunci: Cekaman osmotik, cekaman keasaman, *Klebsiella* sp., profil protein

Diterima: 31 Maret 2011, disetujui: 31 Mei 2011

Pendahuluan

Klebsiella sp. adalah bakteri yang dapat hidup di rhizosfer dan mampu mengkolonisasi akar tanaman serta toleran terhadap cekaman lingkungan (Metting, 1993). Hasil penelitian Ikhwan *et al.*, (2001) telah diisolasi dan diidentifikasi *Klebsiella* sp. yang toleran terhadap cekaman osmotik NaCl mencapai 0,75 M dan cekaman keasaman $KAl_2(SO_4)_2$ mencapai 3000 μ M pada media mineral M63 agar. Bakteri tersebut berasal dari rhizosfer tanaman karet, lahan kering asam Podzolik Merah Kuning, Bogor.

Pada saat terjadi cekaman lingkungan bakteri akan membuat beberapa protein spesifik. Pada kondisi cekaman osmotik, *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809 membuat 34 protein spesifik yang terlibat dalam metabolisme asam amino, diantaranya berupa enzim yang terlibat dalam glikolisis dan katabolisme piruvat (Sanchez *et al.*, 2005). Hasil penelitian Dihazi *et al.*, (2004) terdapat 40 protein spesifik, 25 protein diantaranya diekspresikan melimpah dan 15 protein diekspresikan sedikit. Boch *et al.*, (1996) menyatakan bahwa dalam kondisi cekaman osmotik *Bacillus subtilis* membuat protein 42,4 kDa yaitu protein GbsA yang berperan dalam sintesis glisinbetain sebagai osmoprotektan. Menurut Kappes *et al.*, (1996), *E. coli* dalam kondisi cekaman osmotik membuat protein OpuD berat molekul 56,13 kDa (512 asam amino) yang berperan dalam pengambilan glisinbetain sebagai osmoprotektan.

Pada kondisi cekaman keasaman terdapat 53 protein spesifik yang mempunyai karakter ekspresi yang berbeda dalam menanggapi cekaman asam lemah dan asam kuat (O'Driscoll *et al.*, 1997). Hasil penelitian Foster (1991) menunjukkan kondisi cekaman keasaman *Salmonella typhimurium* LT2 akan mengubah secara dramatis ekspresi protein (minimal 52 protein) empat diantaranya termasuk dalam kelompok *acidification tolerance response* (ATR). Hasil penelitian Lin dan Ficht, (1995) pada *Brucella abortus* dalam cekaman keasaman dibuat protein, berat molekul 60 kDa yang berperan sebagai *acid shock protein*. Pada *E. coli* diperoleh protein berat molekul 14,2 kDa yang berperan dalam

resistensi terhadap pH masam (Seputiene *et al.*, 2003).

Kondisi cekaman ganda osmotik dan keasaman $Al_2(SO_4)_3$, konsentrasi alumunium berpengaruh pada akumulasi osmolit K^+ dalam cekaman osmotik. Kondisi alumunium konsentrasi tinggi, alumunium akan menutup saluran K^+ (K^+ -channel) sehingga K^+ terhalangi masuk kedalam sel (Liu dan Luan, 2001) dan toleransi bakteri terhadap cekaman osmotik menurun, karena ion K^+ merupakan osmolit intraselular utama dalam kondisi cekaman osmotik (Ohwada dan Sagisaka, 1988). Cekaman osmotik menyebabkan inaktivasi enzim dan kerusakan komponen sel (Martin *et al.*, 1999) dan berpengaruh terhadap pola sintesis protein sel (Freifelder, 1987) menyebabkan toleransi terhadap alumunium (Al) menurun. Menurut Gadd (1990), ada tiga mekanisme utama dalam imobilisasi cekaman logam (alumunium) yaitu: membuat protein spesifik ekstraselular untuk imobilisasi logam diluar sel, membuat protein spesifik membran untuk imobilisasi di membran sel dan membuat protein spesifik intraselular untuk imobilisasi dalam sel. Dengan demikian ada interaksi pengaruh cekaman osmotik dan cekaman alumunium terhadap pola ekspresi genetik dan sintesis protein.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pola sintesis protein dan protein spesifik yang berperan dalam toleransi cekaman osmotik dan cekaman keasaman $Al_2(SO_4)_3$ baik secara tunggal maupun ganda pada aras protein intraselular, protein membran dan protein ekstraselular pada *klebsiella* sp. Data yang diperoleh diharapkan dapat menambah informasi dan acuan pengembangan penelitian molekular berikutnya.

Metode Penelitian

Penyiapan Kultur

Klebsiella sp. yang digunakan dalam penelitian adalah hasil isolasi penelitian sebelumnya (Ikhwan *et al.*, 2001) dari rhizosfer tanaman karet. Isolat tersebut ditumbuhkan dalam media mineral M63 dengan variasi cekaman osmotik 0,65 M NaCl dan cekaman keasaman $Al_2(SO_4)_3$ 1000 μ M pH 4,6.

Komposisi media M63 adalah KH_2PO_4 100 mM, KOH 75 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM, MgSO_4 1,0 mM, FeSO_4 3,9 μM dan D-glukosa 10 mM (Perroud dan Le Rudulier, 1985). Pertumbuhan *Klebsiella* sp. diamati secara spektrofotometri pada panjang gelombang λ 420 nm.

Isolasi Protein

Isolasi Protein Intraselular

Sel dicuci 3 kali dengan PBS pH 7.0 dan diresuspendi dalam 1 ml PBS 7.0, disonikasi dengan amplitudo *repeating duty cycle* 0.7 selama 30 detik dan diulang 6 kali, kemudian di sentrifugasi 3000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit dan supernatan (protein) diambil seperti dideskripsikan oleh Scopes (1987).

Isolasi Protein Membran

Sel dicuci 3 kali dengan 10 mM Tris-HCl pH 8,0 kemudian disonikasi dengan amplitudo *repeating duty cycle* 0,7 selama 5 detik dan diulang 3 kali, disentrifugasi 7000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit, dan supernatan diambil dan disentrifugasi lagi pada 13.000 rpm, 10 menit. Pelet yang diperoleh diresuspendi dalam 1 ml 10mM Tris-HCl pH 8,0 yang mengandung 2% Triton X-100, kemudian diinkubasi pada suhu ruang 20 menit, disentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit dan pelet protein membran diresuspendi dalam 200 μl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 dan disimpan pada suhu -20°C (Sato et al., 2000).

Isolasi Protein Ekstraselular

Kultur sel 500 ml disentrifugasi pada suhu 4°C, 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipresipitasi secara bertahap dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40–70% pada suhu 4°C dan didiamkan semalam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi 10.000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Pelet protein diresuspendi dengan PBS 10 mM pH 7,4 (Scopes, 1987).

Pemurnian dan Pengukuran Konsentrasi Protein

Pemurnian Protein

Pemurnian protein dilakukan menggunakan *tubing* dialisis. Sampel protein dimasukkan dalam *tubing* kemudian didialisis dengan PBS pH 7,0 10mM sambil digoyang

pada suhu 4°C semalam dan dipresipitasi dengan aseton dingin seperti dideskripsikan oleh Haris dan Angal (1989).

Pengukuran Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein ditentukan dengan kurva standar *Biorad Protein Assay* menggunakan standar BSA dan dibaca dengan spektrofotometer 595 nm seperti dideskripsikan oleh Scopes (1987). Data dianalisis regresi sehingga didapatkan persamaan regresi yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein sampel.

Visualisasi dan Analisis Data Protein

Visualisasi Elektroforesis Protein

Isolat protein yang diperoleh dari setiap perlakuan 15 μg , kemudian dielektroforesis menggunakan SDS – PAGE *linier slab gel* dengan *resolving gel* 12% dan *stacking gel* 5% dan dijalankan pada tegangan listrik 80 V, selama $\pm$ 3 jam, pengecatan gel menggunakan *Coomassie blue* seperti dideskripsikan oleh Hames dan Rickwood (1990).

Analisis Pita Protein

Pita-pita yang terbentuk pada profil protein dianalisis berat molekulnya (BM) secara kuantitatif dengan persamaan regresi kurva standar protein marker (*broad range*) produk *Bio-Rad* (USA) yang sudah diketahui berat molekulnya. Data berat molekul protein masing-masing perlakuan dianalisis dengan pendekatan *Principle Component Analysis* (PCA) (Steel dan Torrie, 1980), sehingga dapat diketahui distribusi dan korelasi protein spesifik dengan macam perlakuan cekaman.

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan *Klebsiella* sp. dalam Kondisi Cekaman

Hasil pengamatan pola pertumbuhan *Klebsiella* sp. dalam media minimal M63 dengan cekaman osmotik dan keasaman menunjukkan bahwa dalam kondisi cekaman pertumbuhan *Klebsiella* sp. lebih rendah daripada tanpa cekaman (Gambar 1).

Cekaman osmotik pertumbuhan *Klebsiella* sp cenderung lebih baik daripada cekaman keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, dan pada cekaman ganda (osmotik dan keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) menunjukkan pertumbuhan paling rendah. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *Klebsiella* sp. cenderung lebih toleran terhadap cekaman osmotik daripada cekaman keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. Menurut Yaganza *et al.*, (2004) aluminium (Al) logam sangat toksik yang dapat menghambat pertumbuhan beberapa jamur dan bakteri. Konsentrasi alumunium tinggi, menyebabkan hilangnya dinding sel, agregasi sitoplasma dan hilangnya vesikel ekstraselular.

Profil Protein Klebsiella sp. dalam Kondisi Cekaman

Analisis profil protein dilakukan terhadap komponen protein intraselular, membran sel, dan protein ekstraselular. Hasil SDS-PAGE dimensi tunggal profil protein disajikan pada Gambar 2. Profil protein tersebut mengindikasikan bahwa dalam kondisi cekaman ada perubahan pola sintesis protein tertentu terkait dengan toleransi terhadap cekaman. Menurut Moat dan Foster (1988), kondisi cekaman lingkungan, mikrob akan membuat dan mengurangi beberapa protein spesifik untuk efisiensi metabolisme sel dalam menghadapi cekaman.

Kondisi Cekaman Osmotik

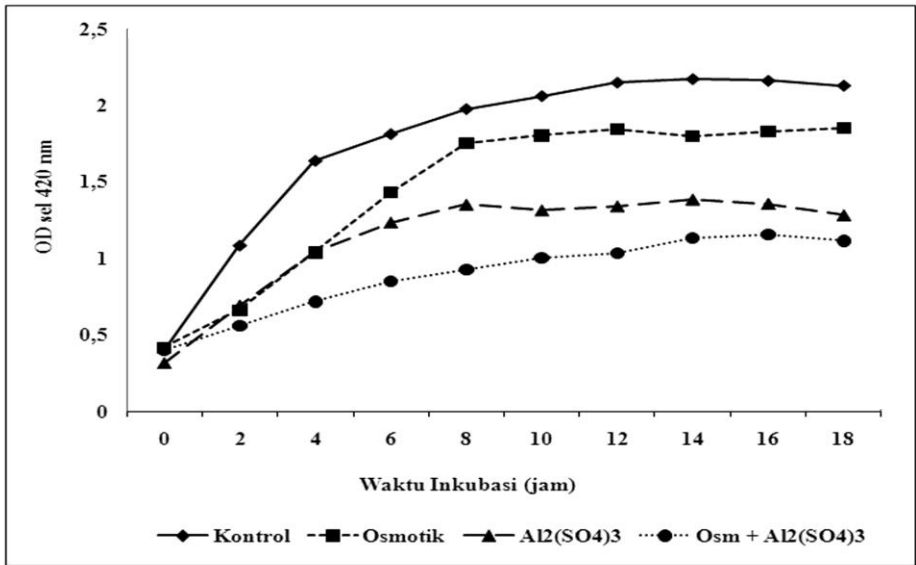
Cekaman osmotik dibuat 3 protein spesifik intraselular dan 2 protein spesifik pada membran sel (Tabel 1). Salah satu protein spesifik intraselular adalah protein dengan

perkiraan berat molekul 42,7 kDa yang berperan dalam toleransi terhadap cekaman osmotik (Gambar 2_{A-2}). Hasil penelitian Boch *et al.*, (1996) menunjukkan bahwa dalam kondisi cekaman osmotik *Bacillus subtilis* membuat protein 42,4 kDa yaitu protein GbsA yang berperan dalam sintesis glisinbetain sebagai osmoprotektan. Hasil penelitian lain Kappes *et al.*, (1996), kondisi cekaman osmotik *E. coli* membuat protein OpuD berat molekul 56,13 kDa yang berperan dalam pengambilan glisin betain sebagai osmoprotektan. Pada *E. coli* juga terjadi peningkatan sintesis protein σ^S berat molekul 49,5 kDa yang berperan dalam sistem regulasi dalam kondisi cekaman osmotik 300 mM NaCl (Mufller *et al.*, 1996).

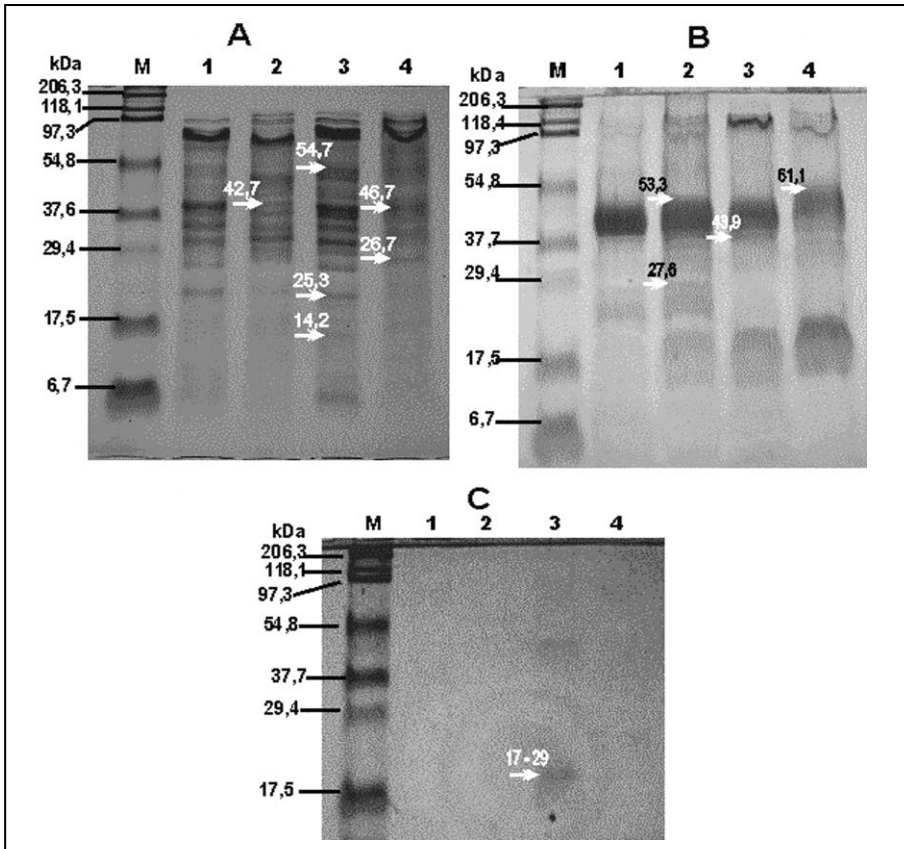
Pada protein membran terdapat protein spesifik 53,3 kDa yang berperan dalam toleransi cekaman osmotik (Gambar 2_{B-2}). Hasil penelitian Obis *et al.*, (1999) dalam kondisi cekaman osmotik *B. subtilis* membuat protein membran OpuAC 55 kDa yang berperan dalam pengikatan osmolit betain sebagai osmoprotektan. Menurut Schmid *et al.*, (1991) pada *Klebsiella pneumonia* protein 55,651 kDa berperan dalam pengambilan sukrosa atau glukosa untuk menjaga keseimbangan konsentrasi sitoplasma dan tekanan turgor sel. Nicolaus *et al.*, (1989) menyatakan bahwa dalam kondisi cekaman osmotik ada beberapa senyawa osmoprotektan yang diakumulasi sel yaitu gula (sukrosa, glukosa dan trehalosa), poliol (gliserol, manitol dan glikosil-gliserol) dan asam amino (glisin betain dan glutamine betain).

Tabel 1. Protein spesifik intraselular, membran sel dan esktraseluar masing-masing perlakuan dalam media M63.

Macam Protein	Protein Spesifik (kDa), Masing-masing Perlakuan Cekaman		
	Osmotik	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	Osm + $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
Intraselular	52,8	100,9	46,6
	42,7	66,7	26,7
	16,7	54,7	13,7
		31,6	
		28,9	
		25,3	
		18,3	
		14,2	
		8,1	
Membran	53,3	126,7	61,1
	27,6	43,9	18,7
Esktraselular	-	57,9	-
	-	16,5	-



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Klebsiella* sp. dalam media minimal M63 dengan cekaman osmotik 0,65 M NaCl dan keasaman Al₂(SO₄)₃ 1000 µM, pH 4,6.



Gambar 2. Profil Protein *Klebsiella* sp dalam media M63, A: intraselular, B: membran, C: ekstraselular, M: Marker, (1) kontrol, (2): cekaman osmotik NaCl 0,65 M (3): cekaman Al₂(SO₄)₃ 1000 uM, pH 4,6; (4): cekaman osmotik NaCl 0,65 M dan Al₂(SO₄)₃ 1000 uM, pH 4,6, dijalankan pada SDS PAGE 12%, 80 Volt, anak panah: protein yang diduga berperan dalam toleransi cekaman.

Kondisi Cekaman Keasaman ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$)

Dalam kondisi cekaman keasaman ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) diperoleh 9 protein spesifik intraselular, 2 protein spesifik pada membran sel dan 2 protein spesifik ekstraselular (Tabel 1). Pada protein intraselular terdapat protein dengan berat molekul 54,7 kDa, 25,3 kDa dan 14,2 kDa, (Gambar 2_{A-3}) yang berperan dalam toleransi terhadap cekaman kemasaman. Hasil penelitian Wu *et al.*, (2009) pada *Klebsiella pneumonia* NTUH-K2044 diperoleh protein dengan berat molekul 25,7 kDa yang berperan dalam resistensi sel terhadap aluminium. Penelitian lain, *E. coli* diperoleh protein dengan berat molekul 14,2 kDa yang berperan dalam resistensi terhadap pH masam dan protein 54,7 kDa yang berperan dalam sintesis asam sitrat (Seputiene *et al.*, 2003). Menurut Appanna dan Pierre (1996) dalam kondisi cekaman aluminium, sel akan mengumpulkan asam sitrat sebagai agensi pengkhelet kation Al^{3+} .

Pada protein membran terdapat protein spesifik 43,9 kDa yang berperan dalam kondisi cekaman keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (Gambar 2_{B-3}). Menurut Pugsley dan Reyss (1990), protein 44,199 kDa pada *Klebsiella pneumonia* terlibat dalam alur sekresi untuk ekspor protein ke luar sel. Protein tersebut kemungkinan berperan untuk imobilisasi logam (aluminium) di luar sel sehingga tidak terserap dan meracuni sel. Delhaize *et al.*, (2007), menyatakan bahwa dalam kondisi cekaman aluminium, ion Al^{3+} memacu *efflux* anion organik (OA^-) oleh protein suku ALMT (Al^{3+} *activated malate transporter*) dan protein MATE (*multi-drug and toxin extrusion*). Anion organik (OA^-) tersebut berinteraksi secara langsung dengan protein membran untuk inaktivasi Al^{3+} .

Selain itu, terdapat protein ekstraselular spesifik dengan kisaran berat molekul 17–29 kDa (Gambar 2_{C-3}) yang berperan dalam toleransi keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. Hasil penelitian Gordon *et al.*, (1993), protein ekstraselular 19–21 kDa pada *Vibrio alginolyticus* berperan sebagai protein pengikat logam tembaga (*copper-binding proteins*, (CuBPs)). Hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa protein ekstraselular berperan untuk fiksasi ion logam (Al^{3+}) di luar sel untuk mengurangi keracunan aluminium (Gadd, 1990).

Kondisi Cekaman Ganda (osmotik dan keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$)

Dalam kondisi cekaman ganda diperoleh 3 protein spesifik intraselular dan 2 protein spesifik membran sel (Tabel 1). Pada protein intraselular terdapat protein yang berukuran 26,7 kDa dan 46,7 kDa (Gambar 2_{A-4}) yang berperan dalam toleransi cekaman. Hasil penelitian Bruske *et al.*, (1993) menunjukkan protein 26,6 kDa pada *Klebsiella pneumonia* berinteraksi dengan protein reseptor membran luar yang berperan dalam pengambilan substrat spesifik masuk ke dalam ruang periplasma. Substrat tersebut berperan dalam pengaturan mekanisme pori membran dalam sistem transpor membran dalam menghadapi cekaman lingkungan. Menurut Moat dan Foster (1988), dalam menghadapi cekaman lingkungan, sel akan menanggapi dengan pengaturan sistem transpor membran berupa *uniport*, *simport* dan *antiport*. Hasil penelitian lain (Altermann *et al.*, 2005) dalam kondisi cekaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ *Klebsiella pneumonia* membuat protein 46,051 kDa yang berperan dalam resistensi sel terhadap cekaman aluminium.

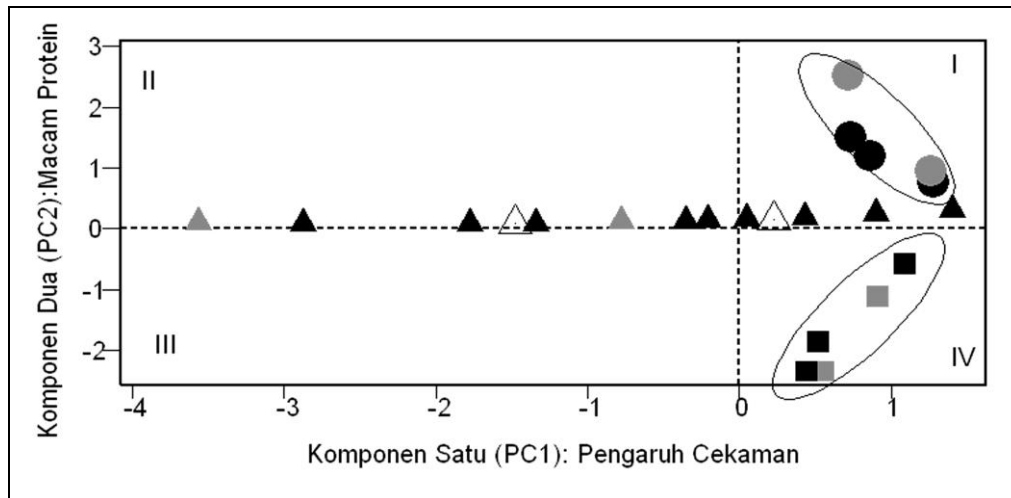
Pada protein membran terdapat protein spesifik berkisar 61,1 kDa (Gambar 2_{B-4}) yang berperan dalam cekaman ganda. Hasil penelitian Fouts *et al.*, (2008) menyatakan bahwa *Klebsiella pneumonia* terdapat protein 61,464 kDa yang berperan untuk penyisipan (insersi) protein membran dan menjaga integritas membran sel menghadapi cekaman lingkungan (osmotik dan kemasaman).

Analisis Komponen Utama (PCA) Protein

Hasil analisis komponen utama protein spesifik pada perlakuan cekaman osmotik dan keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ menunjukkan bahwa ada pola distribusi spesifik pada cekaman osmotik dan cekaman ganda (osmotik dan keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), sedangkan dalam cekaman keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ bersifat menyebar merata (Gambar 3). Dalam cekaman ganda protein spesifik intraselular maupun membran mengelompok pada kuadran I yang berkorelasi positif terhadap pengaruh cekaman (PC1) sedangkan dalam cekaman osmotik mengelompok pada kuadran IV yang berkorelasi negatif terhadap macam protein

(PC2). Dalam cekaman keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ sebaran protein tidak mempunyai pola spesifik. Hal tersebut mengindikasikan bahwa protein tersebut mempunyai karakter yang berbeda dan

berkorelasi spesifik baik terhadap komponen pengaruh cekaman (PC1) maupun macam protein (PC2) dalam masing-masing cekaman.



Gambar 3. Analisis komponen utama sebaran protein spesifik berdasarkan data perkiraan berat molekul dalam menanggapi cekaman pada media minimal M63, hitam: protein intraselular, abu-abu: protein membran sel, putih: protein ekstraselular, kotak: cekaman osmotik 0,65 M NaCl, segitiga: cekaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 1000 μM pH 4,6, dan lingkaran: cekaman ganda (osmotik 0,65 M NaCl + $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 1000 μM pH 4,6).

Simpulan dan Saran

Simpulan

Hasil analisis profil protein menunjukkan beberapa protein spesifik yang berperan dalam toleransi terhadap cekaman osmotik maupun keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ baik pada aras protein intraselular, membran maupun ekstraselular. Dalam cekaman osmotik dihasilkan protein intraselular berukuran 42,7 kDa dan protein membran sel berukuran 53,3 kDa. Dalam cekaman keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ dihasilkan protein intraselular berukuran 54,7 kDa; 25,3 kDa dan 14,2 kDa; protein membran sel berukuran 43,9 kDa serta protein ekstraselular berukuran 17–29 kDa. Dalam cekaman ganda (osmotik dan keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) dihasilkan protein intraselular berukuran 26,7 kDa dan protein membrane sel berukuran 61,1 kDa. Protein yang dibuat tersebut menunjukkan pola korelasi yang berbeda antar cekaman. Cekaman osmotik korelasinya cenderung positif terhadap pengaruh cekaman, sedangkan dalam cekaman

ganda berkorelasi negatif terhadap macam protein (PC2) dan dalam cekaman keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ tidak menunjukkan pola yang spesifik.

Saran

Arah penelitian selanjutnya adalah isolasi dan *sequencing* protein spesifik yang berperan dalam toleransi cekaman osmotik dan keasaman. Hal tersebut perlu dilakukan sebagai acuan analisis regulasi molekuler sel terhadap cekaman osmotik dan keasaman $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini sebagian didanai oleh Proyek Riset Dasar, Kementrian Riset dan Teknologi, Republik Indonesia, tahun anggaran 2007–2009 yang diberikan kepada Triwibowo Yuwono. Ucapan terima kasih kepada Tri Purwanti teknisi laboratorium mikrobiologi Pusat Studi Bioteknologi, UGM, yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Appanna, V.D. dan Pierre, M.S. 1996. Aluminum elicits exocellular phosphatidylethanolamine production in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (8): 2778–2782.
- Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R. dan Klaenhammer, T.R. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 3906–3912.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R. dan Bremer, E. 1996. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*; characterization of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.*, 178: 5121–5129.
- Bruske, A., Anton, M. dan Heller, K.J. 1993. Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* tonB gene and characterization of *Escherichia coli*-*K. pneumoniae* TonB hybrid proteins. *Gene*, 131: 9–16.
- Delhaize, E., Gruber, B.D. dan Ryan, P.R. 2007. Minireview: The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Letters*, 581: 2255–2262.
- Dihazi, H., Asif, A.R., Agarwa, N.K., Doncheva, Y. dan Muller, G.A. 2004. Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of henle's Loop (TALH) cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4 (10): 1445–1458.
- Freifelder, D. 1987. *Microbial Genetics*. Jones and Bartlett Publishers Inc., Boston.
- Foster, J.W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J. of Bacteriol.*, 173(21): 6896–6902.
- Fouts, D.E., Tyler, H.L., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J.H., Durkin, A.S., Huot, H., Shrivastava, S., Kothari, S., Dodson, R.J., Mohamoud, Y., Khouri, H., Roesch, L.F., Krogfelt, K.A., Struve, C., Triplett, E.W. dan Methe, B.A. 2008. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.*, 4: 7–141.
- Gadd, G.M. 1990. *Metal tolerance in Microbiology of Extreme Environments*. C. Edwards (Eds.). Open University Press. Milton Keynes.
- Gordon, A.S., Harwood, V.J. dan Sayyar, S. 1993. Growth, Copper-Tolerant Cells, and Extracellular Protein Production in Copper-Stressed Chemostat Cultures of *Vibrio alginolyticus*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 59 (1): 60–66.
- Hames, B.D. dan Rickwood, D. 1990. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Oxford University Press. New York.
- Haris, E.L.V. dan Angal, S. 1989. *Protein Purification Method: a Practical Approach*. IRL Press. Oxford University Press. New York.
- Ikhwan, Muhidin, A., Yuwono, T. dan Soedarsono, J. 2001. Isolation and study of potency drought and acidity tolerant rhizobacteria as biofertilizer. *Proceeding of International Biotechnology Conference*. Yogyakarta.
- Kappes, R.M., Kempf, B. dan Bremer, E. 1996. Three transport sistem for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.*, 178: 5071–5079.
- Lin, J. dan Ficht, T.A. 1995. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infection and immunity.*, 63 (4): 1409–1414 .
- Liu, K. dan Luan, S. 2001. Internal aluminum block of plant inward K channels. *The Plant Cell*, 13: 1453–1465.
- Martin, D.D., Ciulla, R.A. dan Roberts, M.F. 1999. Minireview osmoadaptation in archaea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (5): 1815–1825.
- Metting, Jr., F.B. 1993. *Soil Microbiology Ecology: Application in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Moat, A.G. dan Foster, J.W. 1988. *Microbial Physiology*. Second edition. John Wiley & Sons. New York.
- Muffler, A., Traulsen, D.D., Lange, R. dan Hengge-Aronis, R. 1996. Posttranscriptional osmotic regulation of the σ S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 178 (6): 1607–1613.
- Nicolaus, B., Lanzotti, V., Trincone, A., De Rosa, M., Grant, W.D. dan Gambacorta, A. 1989. Glycine betine and polar lipid composition in halophilic archaeobacteria in response to growth in different salt concentrations. *FEMS Microbiol Lett.*, 59: 157–160.
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J.C., Renault, P., Bolotin, A. dan Mistoui, M.Y. 1999. Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* Reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J. of Bacteriol.*, 181 (20): 6238–6246.
- O'Driscoll, B., Cormac, B.D., Gahan, G.M. dan Hill, C. 1997. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the acid tolerance response in *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (7): 2679–2685.

- Ohwada, T. dan Sagisaka, S. 1988. The defferential roles of K⁺, proline betaine in Osmoregulation of *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 313–319.
- Perroud, B. dan Le Rudulier, D. 1985. Glysin betain transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.*, 161: 393–401.
- Pugsley, A.P. dan Reyss, I. 1990. Five genes at the 3' end of the *Klebsiella pneumoniae* pulC operon are required for pullulanase secretion. *Mol. Microbiol.*, 4: 365–379.
- Sato, M., Machida, K., Arikado, E., Saito, H., Kakegawa, T. dan Kobayashi, H. 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 66 (3): 943–947.
- Sanchez, B., Marie-Christine, Champomier-Verge`s, P., Anglade, F., Baraige, C.G., de los Reyes-Gavila`n, A., Margolles and Zagorec, M. 2005. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J. of Bacteriol.*, 187 (16): 5799–5808.
- Schmid, K., Ebner, R., Jahreis, K., Lengeler, J.W. dan Titgemeyer, F. 1991. A sugar-specific porin, ScrY, is involved in sucrose uptake in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.*, 5: 941–950.
- Scopes, R.K. 1987. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag, New York
- Seputiene, V., Motiejunas, D., Suziedelis, K., Tomenius, H., Normark, S., Melefors, O. dan Suziedeliene, E. 2003. Molecular characterization of the acid-inducible asr gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *J. Bacteriol.*, 185: 2475–2484.
- Steel, R.G.D. dan Torrie, J.H. 1980. *Principles and Procedures of Statistic*. McGraw-Hill. USA.
- Wu, K.M., Li, L.H., Yan, J.J., Tsao, N., Liao, T.L., Tsai, H.C., Fung, C.P., Chen, H.J., Liu, Y.M., Wang, J.T., Fang, C.T., Chang, S.C., Shu, H.Y., Liu, T.T., Chen, Y.T., Shiau, Y.R., Lauderdale, T.L., Su, I.J., Kirby, R. dan Tsai, S.F. 2009. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.*, 191 (14): 4492–4501.
- Yaganza, E.S., Rioux, D., Simard, M., Arul, J. dan Tweddell, R.J. 2004. Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (11): 6800–6808.