

Analisis Filogenetik Rhizobia yang Diisolasi dari *Aeschynomene* spp.

Phylogenetic analyses of rhizobia isolated from *Aeschynomene* spp.

EVI TRIANA*

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16002

Diterima: 11 April 2005. Disetujui: 7 Juli 2005.

ABSTRACT

The 16S rDNA sequence of eleven strains isolated from nodules of *Aeschynomene* spp. have been determined and analysed together with sequence of other related taxa. Four bacterial groups were identified: (i) photosynthetic Bradyrhizobial group consist of IRBG2, IRBG228 dan IRBG 230; (ii) non-photosintetik *Bradyrhizobium* group consist of MAFF210127, MAFF210316, MAFF210318, dan MAFF210408; (iii) *Rhodopseudomonas palustris* group consist of HMD88, HMD89 dan 99D and (4) an isolate, 99C, that is related to *Rhodopseudomonas acidophila*. In addition, DNA-DNA hybridization was performed among HMD88, HMD89 and 99D strains. The result showed that DNA homology of HMD88, HMD89 and 99D with *Rps. palustris* were less than 30%, DNA homology of HMD88, HMD89 and *Rps. Palustris* with 99D is about or less than 20%, otherwise between HMD88 and HMD89, DNA similarity was more than 70%. The result suggest that HMD88 and HMD89 are the same species, meanwhile 99D is close related or different species in *Rhodopseudomonas palustris* group.

© 2005 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: 16S rDNA sequence, *Aeschynomene* sp., photosynthetic rhizobia, DNA-DNA hybridization, *Rhodopseudomonas palustris*.

PENDAHULUAN

Aeschynomene adalah salah satu tumbuhan kacang-kacangan yang merupakan tumbuhan inang *Bradyrhizobium*. Umumnya *Bradyrhizobium* membentuk bintil pada daerah akar. Pada beberapa jenis tumbuhan, *Bradyrhizobium* mampu membentuk bintil pada daerah batang sehingga disebut bintil batang (Molouba *et al.*, 1999). *Aeschynomene* tumbuh secara alami di daerah yang tergenang air. Tumbuhan ini diyakini sebagai pupuk hijau yang potensial dalam kondisi air tergenang karena fiksasi nitrogen tidak berkurang selama waktu tersebut. Beberapa spesies *Aeschynomene* memiliki bintil batang sehingga walaupun akarnya tergenang, fiksasi nitrogen oleh bintil batang tetap berlangsung (Eaglesham *et al.*, 1990; van Berkum *et al.*, 1995).

Isolat dari bintil *Aeschynomene* sp. sangat menarik dipelajari, karena beberapa galur menghasilkan klorofil a sehingga dapat melakukan fotosintesis dan disebut rhizobia fotosintetik. Umumnya klorofil a tidak dihasilkan oleh rhizobia lain yang bersimbiosis dengan tumbuhan. Masing-masing karakteristik tersebut umumnya dimiliki oleh jenis bakteri yang berbeda, yaitu *Rhodopseudomonas palustris* yang hidup bebas dan memproduksi klorofil a dan *Bradyrhizobium japonicum* yang bersimbiosis dengan tumbuhan inang dan tidak memproduksi klorofil a. Unikunya, bakteri ini memiliki gabungan kedua karakter tersebut. Oleh karena itu, isolat-isolat dari *Aeschynomene* dikelompokkan terpisah dari kelompok *Rps. palustris* dan *B. japonicum*. Bakteri yang pertama kali ditemukan dalam kelompok ini

adalah BTAi1, yang diisolasi dari bintil batang *A. indica*. Keberadaan pigmen fotosintetik yang tidak lazim ini menyebabkan bakteri tersebut diberi nama sementara "*Photorhizobium thompsonianum*" (Eaglesham *et al.*, 1990; Ladha *et al.*, 1990; Ladha dan So, 1994).

Sejak ditemukan isolat BTAi1 yang merupakan bakteri pengikat nitrogen fotosintetik (Young *et al.*, 1991), maka banyak penelitian yang ditujukan pada keragaman isolat-isolat *Aeschynomene*. Di antara penelitian tersebut, Wong *et al.* (1994) melakukan analisis filogenetik terhadap bakteri-bakteri yang dapat membentuk nodul pada *Aeschynomene* sp. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri-bakteri tersebut memiliki kekerabatan dengan *Bradyrhizobium*. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ladha dan So (1994) terhadap 150 karakter fenotip dan menemukan bahwa isolat-isolat fotosintetik dari beberapa spesies *Aeschynomene* dikelompokkan dalam satu kelompok besar dengan tiga subkelompok yang jelas berbeda dari galur *Bradyrhizobium* lain, termasuk isolat-isolat *Aeschynomene* nonfotosintetik. Hal tersebut menunjukkan bahwa keragaman di antara isolat *Aeschynomene* sangat besar (Willem *et al.*, 2000). Akibatnya, banyak galur baru *Bradyrhizobium* telah dideskripsikan tetapi kebanyakan tidak/belum menyandang status spesies resmi. Galur-galur tersebut hanya disebutkan sebagai *Bradyrhizobium* sp. Hal tersebut disebabkan kurangnya sarana yang tepat untuk memperkirakan hubungan di antara spesies-spesies pada kelompok Bradyrhizobia (Stackertrandt dan Goebel, 1994; Willem *et al.*, 2001).

Analisis 16S rDNA yang berguna untuk melihat hubungan di antara spesies-spesies pada banyak kelompok bakteri, memperlihatkan variasi di antara spesies-spesies Bradyrhizobia. Pada pohon filogenetik, genus *Bradyrhizobium* membentuk cabang yang terpisah dari *Rhizobium*. Tiga spesies, yaitu *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium*

* Alamat korespondensi:

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16002.
Tel.: +62-251-324006. Faks.: +62-251-325854
e-mail: atitkanti@yahoo.com

elkanii, dari *Bradyrhizobium liaoningense* termasuk dalam genus ini (Willem *et al.*, 2000; Young *et al.*, 1991). Oleh karena itu, untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari sebelas galur yang diisolasi dari *Aeschynomene* spp, dilakukan analisis genotip berdasarkan sekuen 16S rDNA, bersama dengan sekuen dari taksa lain yang berkerabat.

BAHAN DAN METODE

Bakteri dan metode pembiakan

Sebanyak 11 galur bakteri digunakan dalam penelitian (Tabel 1). Semua galur, kecuali galur 99C dan 99D ditumbuhkan secara aerob pada suhu 28°C selama 4-7 hari pada media agar-agar *Tryptone-Glucose-Yeast extract* (TGY), yang terdiri atas 5,0 g tripton, 1,0 g glukosa, 2,5 g ekstrak khamir, 15,0 g agar dan 1000 mL akuades. Galur 99C dan 99D dibiakkan secara anaerob dengan mengisi tabung sampai penuh atau menggunakan kantung anaerob kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 5-7 hari pada media nutrisi cair yang mengandung 5,0 g pepton, 3,0 g *meat extract*, dan 3,0 g NaCl dalam 1000 mL akuades.

Tabel 1. Galur bakteri yang digunakan.

Galur	Media	Tumbuhan inang	Negara asal	Sumber
" <i>Photorhizobium</i> " sp. IRBG2	Agar-agar TGY	<i>A. afraspera</i>	Filipina	IRRI
" <i>Photorhizobium</i> " sp. IRBG228	Agar-agar TGY	<i>A. nilotica</i>	Filipina	IRRI
" <i>Photorhizobium</i> " sp. IRBG230	Agar-agar TGY	<i>A. pratensis</i>	Filipina	IRRI
MAFF210172	Agar-agar TGY	<i>A. americana</i>	Thailand	MAFF
MAFF210316	Agar-agar TGY	<i>A. americana</i>	Thailand	MAFF
MAFF210318	Agar-agar TGY	<i>A. americana</i>	Thailand	MAFF
MAFF210408	Agar-agar TGY	<i>A. falcate</i>	Thailand	MAFF
Isolate HMD88	Agar-agar TGY	<i>A. indica</i>	Japan	PBLOU
Isolate HMD89	Agar-agar TGY	<i>A. indica</i>	Japan	PBLOU
Isolate 99C	Nutrien cair	<i>A. indica</i>	Japan	PBLOU
Isolate 99D	Nutrien cair	<i>A. indica</i>	Japan	PBLOU

Annotation: IRRI = International Rice Research Institute; MAFF = Minister of Agriculture, Forestry and Fisheries; PBLOU = Plant Biotechnology Laboratory, Osaka University; TGY = Tryptone-Glucose-Yeast Extract.

Analisis filogenetik berdasarkan sekuen 16S DNA

DNA diekstraksi menggunakan Dneasy Tissue Kit (QIAGEN). DNA yang diperoleh diamplifikasi dengan program PCR (*Polymorphic Chain Reaction*) menggunakan universal primer 20F (5'-TCACGGAGAATTTGATCCTG) dan 1500R (5'-GTTACCTGTTACGAGTTT) untuk memperoleh sekuen 16S. Campuran untuk reaksi PCR mengandung 1-5 µl DNA; 0,5 µl primer 20 pmol; 2 µl *deoxynucleoside triphosphate* (dNTP); 2,5 µl 10x Ex taq buffer; 0,25 µl Ex taq DNA polimerase; dan akuades untuk mencapai volume total 50 µl. Kondisi reaksi adalah sebagai berikut: inisial denaturasi pada 94°C selama 5 menit; dan 30 siklus terdiri dari 94,0°C selama 30 detik, 53,0°C selama 30 detik, dan 72,0°C selama 60 detik; dan 72,0°C selama 5 menit *extention period* setelah menyelesaikan 30 siklus utama. Hasil amplifikasi diamati dengan elektroforesis pada 1% agarose gel dalam 1x buffer TAE. Produk PCR dimurnikan menggunakan QIAquick PCR purification kit (QIAGEN).

DNA yang telah murni diaplikasikan ke dalam program PCR cycle sequencing menggunakan 6 primer (Tabel 2). Campuran untuk reaksi PCR mengandung 0,5-2 µl template, 8 µl *big dye* (PE Biosystem), 1 µl primer 3,2 pmol

(20F, 520F, 920F, 520R, 920R, 1500R) dan akuades untuk mencapai volume akhir 20 µl. Kondisi reaksi adalah sebagai berikut: 96,0°C selama 5 menit; 25 siklus sekuensing pada 96,0°C selama 10 detik, 50,0°C selama 5 detik, dan 60,0°C selama 4 menit; dan 5 menit *extention period* pada 72,0°C.

Tabel 2. Primer PCR yang digunakan untuk amplifikasi dan sekuensing 16S rDNA.

Primer	Sekuen primer
20F	TCACGGAGAATTTGATCCTG
520F	CAGCAGCCGCGGTAATACGT
520R	ACGTATTACCGCGGCTGCTG
920F	AAACTCAAAGGAATTGACGG
920R	CCGTC AATTCCTTTGAGTTT
1500R	GTTACCTGTTACGAGTTT

Produk PCR dimurnikan dengan cara sebagai berikut: 20 µl Na-asetat 3M dan 50 µl etanol absolut dingin ditambahkan pada tiap sampel. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, campuran disentrifugasi 14.000 rpm selama 20 menit. Pelet yang diperoleh dicuci dengan 250 µl 70% etanol dingin, kemudian disentrifugasi 14.000 rpm selama 5 menit dan dikeringanginkan. Setelah kering, pelet dilarutkan dengan 20 µl larutan TSR (*Template Suppresor Reagent*).

DNA yang telah murni didenaturasi pada suhu 96°C selama 3 menit sebelum dimasukkan ke dalam mesin sekuenser. Reaksi dilakukan dengan DNA sekuenser otomatis *ABI Prism 310 Genetic Analyze* (Parkin-Elmer Co., CA, USA). Data sekuen dianalisis menggunakan *ABI AutoAssamblar* (Parkin-Elmer Co.) dan sekuen yang telah dianalisis, dideterminasi menggunakan *AutoAssamblar* (Perkin-Elmer Co.). Kesamaan/similaritas dengan galur-galur referensi terdekat pada *DNA Data Bank* dapat diketahui dengan melakukan analisis *Blast. Multiple Alignment* dari sekuen dilakukan dengan program *Clustal W* (ver. 1.6) (Thompson *et al.* 1994). Untuk membangun pohon filogenetik digunakan metode *neighbour-joining algorithm* (Saitou dan Nei, 1987). Stabilitas pengelompokan (*robustness*) diperhitungkan menggunakan *bootstrap* dengan 1000 kali ulangan.

Hibridisasi DNA

Ekstraksi dan pemurnian DNA bakteri dilakukan berdasarkan prosedur Marmur (1961) sebagai berikut: Sebelum lisis, sel dilarutkan dalam 10 mL TE salin buffer (pH 8,0) dan ditambah proteinase K dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml. Setelah lisis, untuk memisahkan asam nukleat dari protein digunakan 10 mL kloroform : isoamil alkohol (24:1). Hibridisasi DNA dilakukan berdasarkan prosedur Ezaki *et al.* (1989) dengan menggunakan metode *microplate*, yaitu DNA yang tidak berlabel yang memiliki ikatan non-kovalen dengan *microplate*, akan dihibridisasi dengan *biotinylated probe DNA* (White, 1972). Hibridisasi berlangsung pada suhu 50°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis filogenetik 16S rDNA

Topologi pohon filogenetik memperlihatkan dua kelompok utama (Gambar 1.). Kelompok pertama adalah *Bradyrhizobium* sp. yang berkelompok bersama BTAi1 yang merupakan *Bradyrhizobium* fotosintetik. Sedangkan kelompok kedua terbagi menjadi dua subkelompok, yaitu subkelompok *Bradyrhizobium* nonfotosintetik dan subkelompok *Rhodopseudomonas palustris*.

Dalam kelompok pertama terdapat galur BTAi1 dan isolat-isolat IRBG2, IRBG228, serta IRBG230 yang secara fenotip dan kemotaksonomi termasuk dalam kelompok bradyrhizobia fotosintetik (Triana, 2003). Isolat-isolat tersebut memiliki tingkat kesamaan yang tinggi (99%) dengan galur-galur referensi terdekatnya, yang merupakan bradyrhizobia fotosintetik. Mereka membentuk kelompok besar bradyrhizobia fotosintetik yang terpisah dengan kelompok lain. Fakta yang sama telah dilaporkan oleh So *et al.* (1994) dan Molouba *et al.* (1999), yang menemukan bahwa galur-galur dalam kelompok ini memiliki sekuen 16S rDNA yang sangat serupa, sehingga kelompok tersebut layak menyanggah status spesies.

Dalam kelompok bradyrhizobia fotosintetik ini, BTAi1 membentuk subkelompok yang terpisah dengan galur-galur lain, termasuk galur IRBG. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Young *et al.* (1991) bahwa walaupun sekuen BTAi1 tidak identik dengan sekuen galur manapun, namun tidak dapat dipungkiri bahwa BTAi1 selalu terdapat di tengah kluster *Bradyrhizobium*. Hal tersebut disebabkan oleh kekerabatan BTAi1 yang sangat dekat dengan *B. japonicum* USDA110 dengan perbedaan satu nukleotida. Namun secara fisiologis, BTAi1 lebih serupa dengan galur-galur bradyrhizobia fotosintetik daripada nonfotosintetik.

Fakta lain menunjukkan bahwa isolat ini secara filogenetik memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan *Blastobacter denitrificans*. *Blastobacter denitrificans* adalah isolat yang berasal dari air permukaan sebuah danau (Hirsch dan Muller, 1985). Isolat ini mampu membentuk tunas dan tidak berasosiasi dengan tumbuhan inang. Kenyataannya, isolat ini berkelompok dengan galur-galur bradyrhizobia fotosintetik dalam kelompok bradyrhizobia fotosintetik dan memiliki sekuen 16S rDNA yang sangat serupa (98-99%) dengan galur referensi terdekatnya. Diduga anggota-anggota kelompok bradyrhizobia fotosintetik memiliki apparatus fotosintetik atau sisa-sisanya (Willem *et al.*, 2001).

Hasil penelitian ini mendukung hasil-hasil penelitian terdahulu, yaitu kelompok bradyrhizobia fotosintetik secara jelas membentuk kelompok terpisah dari *Bradyrhizobium* sp., dan BTAi1 membentuk subkelompok terpisah dalam kelompok tersebut. Pengelompokan isolat-isolat fotosintetik dalam dua subkelompok ini didukung oleh nilai bootstrap yang tinggi. Karena itu ada kemungkinan yang sangat kuat bahwa galur-galur fotosintetik dari *Aeschynomene* spp. setidaknya terdiri dari dua spesies yang berbeda, sebagaimana telah dikemukakan oleh beberapa autor terdahulu. Menurut So *et al.* (1994) dan Fleischman dan Kramer (1998), *Bradyrhizobium* fotosintetik dari *Aeschynomene* mungkin merupakan spesies *Bradyrhizobium* yang berbeda dengan spesies *Bradyrhizobium* yang lain. Namun demikian, data hibridisasi DNA sangat dibutuhkan sebelum mengusulkan nama formalnya.

Di dalam kelompok kedua terdapat isolat-isolat MAFF, HMD dan 99D. Menurut Triana (2003), galur-galur MAFF secara fenotip dan kemotaksonomi terbukti memiliki karakter yang lebih mirip dengan bradyrhizobia nonfotosintetik daripada bradyrhizobia fotosintetik. Pada pohon filogenetik (Gambar 1.), terlihat bahwa isolat HMD88, HMD89 dan 99D membentuk subkelompok tersendiri, bersama-sama dengan *Rhodopseudomonas palustris* yang merupakan bakteri fotosintetik anaerob, sebagaimana hasil analisis fenotip dan kemotaksonomi (Triana, 2003). Sedangkan isolat-isolat MAFF bergabung dengan *species-species* *Bradyrhizobium* nonfotosintetik.

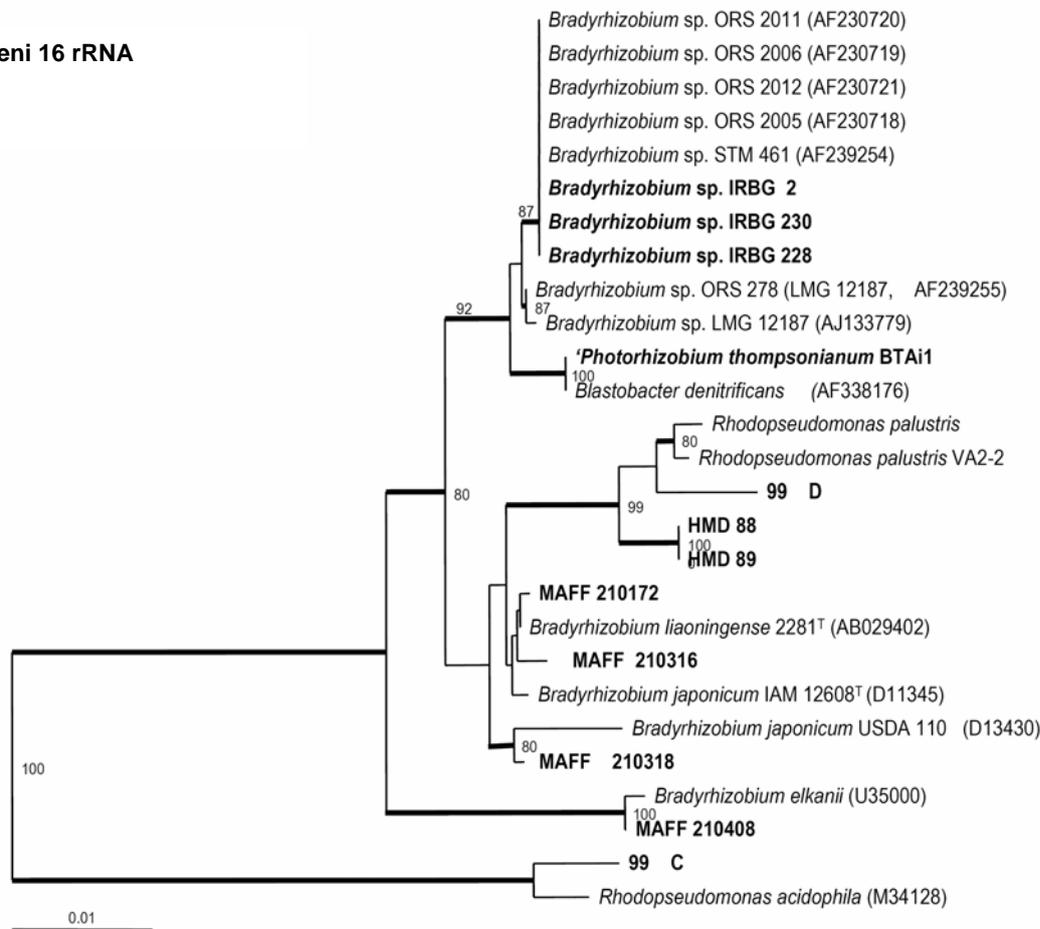
Menurut Hollis *et al.* (1981), dalam subkelompok bradyrhizobia nonfotosintetik, terdapat tiga kelompok

homolog berdasarkan DNA-DNA hibridisasi, yaitu kelompok *Bradyrhizobium japonicum*, kelompok *Bradyrhizobium elkanii* yang secara genotip dan fenotip berbeda dengan *Bradyrhizobium japonicum*; dan kelompok *Bradyrhizobium liaoningense* untuk isolat yang tumbuh ekstra lambat, yang fenotip dan genotipnya berbeda dengan dua spesies yang lain. Hasil analisis fenotip yang telah dilakukan Triana (2003), menunjukkan bahwa galur-galur MAFF memiliki karakter fisiologis yang sangat berbeda satu dengan yang lainnya, kecuali MAFF210316 dan MAFF210318 yang memiliki karakter hampir identik. Setiap galur MAFF diduga memiliki hubungan yang lebih dekat dengan *species-species* bradyrhizobia yang berbeda, dalam kelompok bradyrhizobia nonfotosintetik daripada di antara galur-galur MAFF sendiri. Hal tersebut dibuktikan oleh hasil analisis filogenetik, MAFF210172 memiliki kekerabatan yang erat dengan *B. liaoningense*, MAFF210408 berkerabat dengan *B. elkanii*, sementara MAFF210316 memiliki kekerabatan dengan *B. japonicum* IAM12608, sedangkan MAFF210318 berkerabat dengan *B. japonicum* USDA110. Karena itu dapat dipahami bila MAFF210172 merupakan spesies yang berbeda dengan MAFF210408, MAFF210316 dan MAFF210318. Galur MAFF210408 berbeda dengan MAFF210316 dan MAFF210318, sementara MAFF210316 dan MAFF210318 merupakan spesies yang sama, tetapi berbeda galur. Menurut Young *et al.* (1991), galur-galur *Bradyrhizobium japonicum* diketahui tersebar dalam beberapa kelompok, yang sangat berbeda dalam hal kekerabatan DNA dan karakteristik lain yang memungkinkan galur-galur tersebut layak dianggap sebagai spesies yang terpisah/beda. Untuk mendeterminasikan galur-galur tersebut merupakan spesies yang sama atau hanya berkerabat dekat dengan galur referensi terdekatnya, data hibridisasi DNA sangat diperlukan.

Menurut hasil penelitian Triana (2003) pada subkelompok *Rhodopseudomonas palustris*, galur-galur HMD88 dan HMD89 memiliki karakter fenotipik dan kemotaksonomi yang hampir identik, sementara galur 99D memiliki sedikit perbedaan dengan galur-galur HMD. Galur 99C memiliki sangat banyak perbedaan dengan galur-galur fakultatif anaerob fotosintetik tersebut. Berdasarkan sifat-sifat yang paling banyak berbeda dengan galur-galur lain, maka 99C menjadi outgroup dari pohon filogenetik yang dibangun. Isolat 99C memiliki banyak kesamaan morfologi dengan galur-galur dari kelompok *Rps. palustris*, namun secara fisiologi terdapat perbedaan yang mencolok. Isolat 99C tidak termasuk dalam kelompok *Rps. palustris* (Triana, 2003). Hal tersebut diperkuat oleh hasil analisis filogenetik yang menunjukkan bahwa galur 99C memiliki homologi yang sangat tinggi dengan *Rhodopseudomonas acidophila*, dan terpisah secara signifikan/nyata dari kelompok *Rps. palustris*.

Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa pada subkelompok *Rps. palustris*, isolat HMD88 dan HMD89 memiliki sekuen 16S rDNA parsial (20F) yang sangat serupa dengan *Rhodopseudomonas palustris* dengan perbedaan 5 basa (98%), sedangkan galur 99D memiliki kesamaan sekuen 16S rDNA parsial (20F) dengan *Rps. palustris* dengan perbedaan 1 basa (99%). Berdasarkan data tersebut, diperkirakan galur-galur HMD88, HMD89 dan 99D memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Rps. palustris*. Pada pohon filogenetik, galur-galur tersebut membentuk kelompok yang sangat padu/kuat, yang didukung oleh nilai bootstrap yang tinggi (99%). Untuk mengetahui apakah galur-galur HMD88, HMD89 dan 99D adalah spesies yang sama, berkerabat dekat, atau spesies yang berbeda, perlu dilakukan hibridisasi DNA.

Filogeni 16 rRNA



Gambar 1. Pohon filogenetik.

Analisis filogenetik yang dilakukan oleh peneliti-peneliti terdahulu menunjukkan bahwa kelompok bradyrhizobia nonfotosintetik memiliki hubungan yang lebih dekat dengan kelompok bakteri fakultatif anaerob fotosintetik, *Rps. palustris*, yaitu bakteri fotosintetik yang dapat melakukan fotoautotrof pada kondisi anaerob, dibandingkan dengan bradyrhizobia fotosintetik berdasarkan 16s rRNA (Ezaki *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1994). Hubungan yang dekat ini mungkin mencerminkan bahwa kedua kelompok bakteri tersebut (bakteri fotosintetik dan bradyrhizobia) berevolusi dari nenek moyang yang sama (van Berkum *et al.*, 1995). Hal tersebut mungkin disebabkan oleh proses evolusi *Bradyrhizobium* dari bakteri fotosintetik yang hidup bebas dengan cara mengembangkan fungsi simbiosis. Umumnya bradyrhizobia yang bersimbiosis dengan akar hidup dalam lingkungan tanah-akar yang jarang sekali/hampir tidak pernah terpapar sinar matahari. Sebagai konsekuensinya, fungsi fotosintetik hilang selama evolusi dari kehidupan bebas menjadi simbiosis (Molouba *et al.*, 1999).

Kemampuan *Rps. palustris* berfotosintesis menyebabkan *Rps. palustris* terdapat di tengah kluster *Bradyrhizobium*. Fungsi fotosintetik pada bakteri fotosintetik adalah untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya dengan menyediakan energi untuk mempertahankan viabilitas sel selama substrat organik sebagai sumber energi tidak tersedia. Kebutuhan akan energi ini membuat kemampuan mensintesis klorofil pada bakteri fotosintetik

terus dipertahankan. Di lain pihak, peran fotosintesis berkurang pada bradyrhizobia selama waktu evolusi yang didorong oleh kemampuan mereka tumbuh dan bereproduksi melalui simbiosis dengan tumbuhan. Karena itu kemampuan untuk mensintesis klorofil lambat laun menghilang, sementara hubungan simbiosis antara nenek moyang *Bradyrhizobium* dan nenek moyang spesies *Aeschynomene* semakin berkembang. Konsekuensinya, nenek moyang bradyrhizobia non-pigmen yang merupakan bradyrhizobia fotosintetik sebagian tetap bertahan, sebagian lagi kehilangan informasi genetik untuk sintesis klorofil. Keadaan tersebut menuju keanekaragaman *Bradyrhizobium* yang ada saat ini yang diisolasi dari spesies *Aeschynomene*. Pada kasus tertentu dengan simbiosis nodul batang, kemampuan fotosintesis dipertahankan karena karakteristik tersebut merupakan keuntungan selektif, baik pada kondisi hidup bebas maupun simbiosis (Molouba *et al.*, 1999).

Hibridisasi DNA

Walaupun studi homologi DNA telah berhasil diterapkan untuk klasifikasi isolat-isolat *Rhizobium* (Crow *et al.*, 1981) dan *Bradyrhizobium* (Hollis *et al.*, 1981), besarnya persentase homologi DNA untuk mengelompokkan bakteri dalam status spesies masih menjadi perdebatan. Secara umum, bila kandungan DNA homolog berkisar 60%-100% dianggap spesies yang sama, bila memiliki DNA homolog berkisar 20-60% dianggap spesies yang berkerabat dekat,

sedangkan bila DNA homolog kurang dari 20% dianggap spesies berbeda (Johnson, 1984).

Tabel 3. Hibridisasi DNA.

DNA Referensi	% hubungan ikatan dengan DNA berlabel dari			
	<i>Rps. palustris</i>	99 D	HMD 88	HMD 89
<i>Rps. palustris</i>	100	1,8	15,8	11,4
99 D	23,8	100	23,0	9,3
HMD 88	18,8	4,0	100	80,3
HMD 89	26,7	2,5	123,5	100

Berdasarkan hibridisasi DNA (Tabel 3.), terlihat bahwa DNA homolog HMD88, HMD89 and 99D dengan *Rps. palustris* kurang dari 30%. Nilai ini mengindikasikan bahwa ketiga isolat merupakan spesies yang berbeda atau berkerabat dekat dengan *Rps. palustris*. HMD88 dan HMD89 memiliki DNA homolog lebih dari 70%, yang mengindikasikan bahwa kedua galur adalah spesies yang sama. Dugaan ini diperkuat oleh karakter fisiologi dan kemotaksonomi serta genotip yang hampir identik. Di lain pihak, 99D memiliki DNA homolog hampir atau kurang dari 20% dengan HMD88, HMD89, dan *Rhodopseudomonas palustris* mengindikasikan bahwa 99D mungkin merupakan spesies yang berbeda dengan galur-galur HMD dan *Rps. palustris*. Hasil tersebut sangat mendukung hasil 16S rDNA dan karakter fenotip, yang membedakan galur-galur HMD dari galur 99D. Jadi galur-galur dalam kelompok *Rps. palustris* mungkin terdiri dari dua spesies, yaitu HMD88 dan HMD89 adalah satu spesies, sementara 99D adalah spesies yang lain. Data tersebut memperkuat pengelompokan galur-galur tersebut pada pohon filogenetik, yaitu galur HMD88 dan HMD 89 berkelompok bersama, terpisah dari galur 99D dan *Rps. palustris*, sementara 99D juga terpisah dari kelompok *Rps. palustris*. Secara umum data tersebut menunjukkan HMD88 dan HMD89 adalah spesies yang sama, sedangkan 99D adalah spesies yang berbeda dalam kelompok *Rps. palustris*.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa berdasarkan analisis 16S rDNA terhadap 11 galur yang diisolasi dari *Aeschynomene indica*, galur-galur tersebut tersebar dalam empat kelompok. Kelompok pertama terdiri dari IRBG2, IRBG228, IRBG230 dan ATCC51316 yang tergabung dalam kelompok bradyrhizobia fotosintetik. Kelompok kedua terdiri dari galur-galur yang terdapat dalam kelompok bradyrhizobia nonfotosintetik, yaitu MAFF210172 yang memiliki kekerabatan yang erat dengan *Bradyrhizobium liaoningense*, MAFF210316 memiliki kekerabatan dengan *Bradyrhizobium japonicum* IAM12068, MAFF210318 berkerabat dengan *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, dan MAFF210408 yang berkerabat dengan *Bradyrhizobium elkanii*. Kelompok ketiga terdiri dari HMD88, HMD89 dan 99D, yang tergabung dalam kelompok *Rhodopseudomonas palustris*. Dalam kelompok ini, diduga bahwa HMD88 dan HMD89 adalah spesies yang sama, sementara 99D adalah spesies yang berbeda dengan kedua isolat tersebut berdasarkan hibridisasi DNA. Sedangkan kelompok keempat hanya terdiri dari 99C yang berkerabat dengan *Rhodopseudomonas acidophila*.

DAFTAR PUSTAKA

Crow, V.L., B.D.W. Jarvis, and R.H. Greenwood. 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of **Rhizobium**. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31: 152-172.

Eaglesham, A.R.J., J.M. Ellis, W.R. Evans, D.E. Fleischman, M. Hungria, and R.W.F. Hardy. 1990. The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium*: Characteristics. In: Gresshoff, Roth, Stacey, Newton (ed). *Nitrogen Fixation: Achievement and Objectives*. New York: Chapman and Hall.

Ezaki, T., Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 224-229.

Fleischman, D and D. Kramer. 1998. Review: Photosynthetic rhizobia. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1364: 17-36.

Hirsch, P. and M. Muller. 1985. **Blastobacter aggregatus** sp. nov., **Blastobacter capsulatus** sp. nov., and **Blastobacter denitrificans** sp. nov. new building bacteria for freshwater habitats. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 218-286.

Hollis, A.B., W.E. Klors, and G.H. Elkan. 1981. DNA-DNA hybridization studies of **Rhizobium japonicum** and related Rhizobiaceae. *Journal of Genetic Biology* 123: 215-222.

Johnson, L.L. 1984. Nucleic acid in bacterial classification. In: Krieg N. (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. Baltimore: Williams & Wilkins.

Ladha, J.K. and R. So. 1994 Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating **Aeschynomene** species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 62-73.

Ladha, J.K., R.P. Pareek, R. So, and M. Becker. 1990. Stem nodule symbiosis and its unusual properties. In: Gresshoff, Roth, Stacey, and Newton (ed). *Nitrogen fixation: Achievement and Objectives*. New York: Chapman & Hall.

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3: 200-218.

Molouba, F., J. Lorquin, A. Willems, B. Hoste, E. Giroud, B. Dreyfus, M. Gillis, P. de Lajudie, and C. Masson-Brivin. 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from **Aeschynomene** spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Applied and Environmental Microbiology* 65(7): 3084-3094.

Saitou, N. and J. Nei. 1987. The Neighbour Joining method: a new method for reconstruction phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

So, R.B., J.K. Ladha, and J.P.W. Young. 1994. Photosynthetic symbionts of **Aeschynomene** spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 392-403.

Stackebrandt, E. and B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analyses in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849.

Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap-penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.

Triana, E. 2003. Analisis fenotipe dan kemotaksonomi rhizobia yang diisolasi dari **Aeschynomene** spp. *Hayati* 10 (4): 140-145.

van Berkum, P., R.E. Tully, and D.L. Keister. 1995. Non-pigmented and bacteriochlorophyll-containing bradyrhizobia isolated from **Aeschynomene indica**. *Applied and Environmental Microbiology*. 6: 623-629.

White, L.O. 1972. The taxonomy of the crown-gall organism **Agrobacterium tumefaciens** and its relationship to rhizobia and other **Agrobacterium**. *Journal of General Microbiology* 72: 565-576.

Willem, A., F. Doignon-Bourcier, R. Coopman, B.H.P. de Lajudie, and M. Gillis. 2000. AFLP fingerprint analysis of **Bradyrhizobium** strains isolated from **Faidherbia albida** and **Aeschynomene** species. *Systematic and Applied Microbiology*. 23: 137-147.

Willem, A., R. Coopman, and M. Gillis. 2001. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of **Bradyrhizobium** species. *International Journal of Systematik and Evolutionary Microbiology* 51: 111-117.

Wong, F.Y.K., E. Stackebrandt, J.K. Ladha, D.E. Fleischman, A. Date, and J.A. Fuerst. 1994. Phylogenetic analysis of **Bradyrhizobium japonicum** and photosynthetic stem nodulating bacteria from **Aeschynomene** species grown in separated geographical region. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 940-946.

Young, J.P.W., H.L. Downer, and B.D. Eardly. 1991. Phylogenetic of phototrophic **Rhizobium** strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology* 172: 2271-2277.