

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Pseudomonas* ISOLAT J DAN R
PENDEGRADASI LINIAR ALKILBENZEN SULFONAT (LAS)
BERDASARKAN SEKUEN 16S rDNA**

SKRIPSI

oleh

ELLY MARYANA LATIFA

0810910040-91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**IDENTIFIKASI BAKTERI *Pseudomonas* ISOLAT J DAN R
PENDEGRADASI LINIAR ALKILBENZEN SULFONAT (LAS)
BERDASARKAN SEKUEN 16S rDNA**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

oleh
Elly Maryana Latifa
0810910040-91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Pseudomonas* sp. Isolat J dan R
PENDEGRADASI LINIAR ALKILBENZEN SULFONAT (LAS)
BERDASARKAN SEKUEN 16S rDNA**

oleh

Elly MaryanaLatifa

0810910040-91

Telahdipertahankan di depanMajelisPenguji

Padatanggal 25 Juli 2012

Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Suharjono, M. Si.

NIP. 196302231988021001

NiaKurniawan, D.Sc

NIP. 197810252003121002

Mengetahui,

KetuaJurusanBiologi

Fakultas MIPA UniversitasBrawijaya

Widodo., S.Si, M.Si, Ph.D.Med.Sc

NIP.197308112000031002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Elly Maryana Latifa
NIM : 0810910040-91
Program Studi : Biologi
Penulis Skripsi Berjudul :

IDENTIFIKASI BAKTERI *Pseudomonas* ISOLAT J DAN R PENDEGRADASI LINIAR ALKILBENZEN SULFONAT (LAS) BERDASARKAN SEKUEN 16S rDNA

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang tercantum di isi dan tertulis di Daftar Pustaka dalam Skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 25 Juli 2012
Yang menyatakan,

Elly Maryana Latifa
NIM. 0810910040-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipnya hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutnya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



IDENTIFIKASI BAKTERI *Pseudomonas* ISOLAT J DAN R PENDEGRADASI LINIAR ALKILBENZEN SULFONAT (LAS) BERDASARKAN SEKUEN 16S rDNA

Elly M. Latifa, Suharjo, Nia Kurniawan
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Bakteri *Pseudomonas* isolat J dan R indigenus ekosistem sungai di Kota Malang efektif dalam mendegradasi deterjen. *Pseudomonas* isolat R diketahui memiliki kekerabatan paling tinggi dengan *Pseudomonas stutzeri* phen 8 dan isolat J dengan *Pseudomonas pseudoalcaligenes* LMG 1225^T dan dengan *Pseudomonas oleovorans* DSM 1045^T. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat kekerabatan *Pseudomonas* isolat J terhadap strain-strain acuan anggota Spesies *Pseudomonas pseudoalcaligenes* dan *Pseudomonas oleovorans* serta *Pseudomonas* isolat R dengan *Pseudomonas stutzeri* berdasarkan sekuen 16S rDNA. Penelitian dilakukan dengan koleksi data dari NCBI, analisis kekerabatan isolat uji (isolat J dan R) yang diperoleh dari penelitian terdahulu dengan strain-strain acuan yang diperoleh dari NCBI, analisis *haplotype* dan penggambaran *network*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai matriks similaritas antara isolat J dengan *Pseudomonas oleovorans* RS1 98 %, sedangkan isolat J dengan *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain E57 menunjukkan nilai similaritas yang lebih besar yakni 99 %. Isolat R diketahui berkerabat dekat dengan *Enterobacter cowanii* strain 888-76 (*out group*) dengan nilai similaritas sebesar 98,3 % dan dengan *Pseudomonas stutzeri* SP1402 dengan nilai similaritas sebesar 82,8 %. Disimpulkan bahwa isolat J berkerabat dekat dengan *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain E57 dan kemungkinan merupakan strain baru, dan untuk isolat R tidak termasuk dalam Spesies *Pseudomonas stutzeri*.

Kata kunci: identifikasi, isolat J, isolat R, *Pseudomonas* sp., 16S rDNA

IDENTIFICATION OF *Pseudomonas* BACTERIA ISOLATE J AND R DEGRADING LINIAR ALKYL BENZEN SULFONAT (LAS) BASED ON 16S rDNA SEQUENCES

Elly M. Latifa, Suharjono, Nia Kurniawan
Biology Department, Mathematics and Natural Science Faculty,
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

Pseudomonas isolates J and R indigenous river ecosystems in Malang effective in degrading detergent. *Pseudomonas* isolate R have the highest similarity with *Pseudomonas stutzeri* phen 8 and isolate J have the highest similarity with *Pseudomonas pseudoalcaligenes* LMG 1225^T and *Pseudomonas oleovorans* DSM1045^T. The purpose of this study was to determine the degree of similarity *Pseudomonas* isolate J with a member strains of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas oleovorans* and then *Pseudomonas* isolate R with a member strains of *Pseudomonas stutzeri* based on 16S rDNA sequences. Method was carried out with data collection from NCBI, analysis similarity experiment isolate (isolate J and R) from previously research with reference strains from NCBI, haplotype analysis and network depiction. The results showed that the matrix of similarity between isolates J with *Pseudomonas oleovorans* RS1 at 98%, while isolate J with *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain E57 showed matrix of similarity more high that is 99%. Isolate R were closely related with *Enterobacter cowanii* 888-76 (out group) with matrix of similarity at 98,3 % and with *Pseudomonas stutzeri* SP1402 have matrix of similarity at 82,8 %. Concluded that isolates J is closely related with *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain E57 and possible for a new strain, than isolate R is not included in the Species *Pseudomonas stutzeri*.

Keyword: identification, isolate J, isolate R, *Pseudomonas* sp., 16S rDNA

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, skripsi yang berjudul **“Identifikasi Bakteri *Pseudomonas* Isolat J dan R Pendegradasi Linier Alkilbenzen Sulfonat (LAS) Berdasarkan Sekuen 16S rDNA”** dapat diselesaikan. Proses penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu diucapkan terima kasih kepada:

1. **Bapak Dr. Suharjono, M.Si.** selaku pembimbing I dan penasehat akademik yang telah sabar membimbing, memberikan masukan, perhatian, motivasi, dan wawasan baru.
2. **Bapak Nia Kurniawan, D.Sc.** selaku pembimbing II atas perhatian, motivasi, dan pengarahan dalam penggunaan *software*, serta mengajari wawasan baru terkait bioinformatika.
3. **Ibu Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D** dan **Bapak Brian Rahardi, S.Si., M.Sc** selaku penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan informasi untuk perbaikan naskah skripsi ini.
4. **Ibu Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D** selaku penasehat akademik pertama yang telah memberikan wawasan, semangat, dan motivasi, serta petuah-petuah selama masa kuliah.
5. Seluruh keluarga terutama **M. Luthfi (alm), Istiqomah, Herry N. dan Jeffry S.** Atas doa dan dukungannya.
6. **Agung, Yayuk, Devy, Indrajayanti, Prilya, Septi, Wulan, Ulum, dan Galuh** atas bantuan selama pengerjaan penelitian serta motivasinya.
7. Teman-teman **BIG** yang lainnya atas doa dan segala dukungan, serta bantuannya selama penyusunan skripsi.

Skripsi ini masih belum sempurna, oleh karena itu kritik dan saran sangat diharapkan. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak. Amin ya robbal'alam.

Malang, 25Juli 2012

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENULISAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Deskripsi Genus <i>Pseudomonas</i>	3
2.2 Klasifikasi <i>Pseudomonas</i>	3
2.3 Peran Genus <i>Pseudomonas</i>	4
2.4 Sistematika Bakteri: Fenetik dan Filogenetik	5
2.5 Deskripsi terkait <i>Pseudomonas</i> Isolat J dan R.....	7
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat.....	9
3.2 Koleksi Data Sekuen	9
3.3 Analisa Kekekabatan Isolat Uji dan Strain-Strain Acuan	11
3.4Analisis <i>Haplotype</i> dan Penggambaran <i>Network</i>	12
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kekekabatan Isolat J dengan <i>Pseudomonas oleovorans</i> dan <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	13
4.2 Kekekabatan Isolat R dengan <i>Pseudomonas stutzeri</i>	17
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	20
5.2 Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	24

DAFTAR TABEL

1. Strain <i>Pseudomonas oleovorans</i> sebagai pembandingan isolat J.....	10
2. Strain <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> sebagai pembandingan isolat J.....	10
3. Strain <i>Pseudomonas stutzeri</i> sebagai pembandingan isolat R.....	11
4. <i>Outgroup</i> untuk isolat J dan isolat R.....	11

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



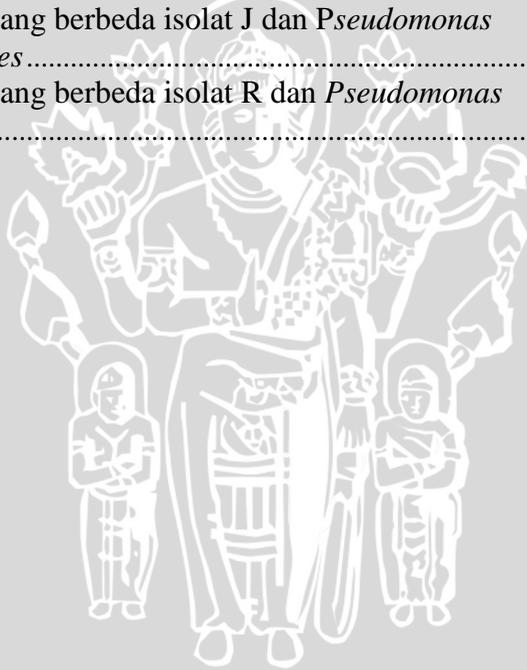
DAFTAR GAMBAR

1. Pohon filogeni <i>maximum-likelihood</i> untuk isolat J dengan <i>Pseudomonas oleovorans</i>	13
3. <i>Network</i> Isolat J dengan <i>P. oleovorans</i>	14
4. Pohon filogeni <i>maximum-likelihood</i> untuk isolat J dengan <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	15
5. <i>Network</i> Isolat J dengan <i>P. pseudoalcaligenes</i>	16
6. Pohon filogeni <i>maximum-likelihood</i> untuk isolat R dengan <i>Pseudomonas stutzeri</i>	17
7. <i>Network</i> Isolat R dengan <i>P. stutzeri</i>	18



DAFTAR LAMPIRAN

1. Alur Penelitian.....	24
2. Langkah Kerja Menggunakan <i>Software</i> DNAsp dan Network.....	25
3. Matrik similaritas isolat J dan <i>Pseudomonas oleovorans</i>	26
4. Matrik similaritas isolat J dan <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	27
5. Matrik similaritas isolat J dan <i>Pseudomonas stutzeri</i>	28
6. Jumlah basa yang berbeda isolat J dan <i>Pseudomonas oleovorans</i>	29
7. Jumlah basa yang berbeda isolat J dan <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	30
8. Jumlah basa yang berbeda isolat R dan <i>Pseudomonas stutzeri</i>	31



DAFTAR ISTILAH

<i>Alignment</i>	proses penyejajaran sekuen, untuk melihat basa-basa nitrogen yang sama.
Bakteri	organisme bersel tunggal, berfilamen, dan dapat berkembang biak dengan cepat dengan cara membelah diri.
Biodegradasi	suatu proses oksidasi senyawa organik oleh bakteri baik di tanah, di perairan, atau pada instalasi pengolahan air limbah.
Biofilm	lapisan yang bersifat gelatin yang terdiri atas sel mikroorganisme yang diselubungi matriks polimer organik.
<i>Bootstrap</i>	metode untuk melihat suatu nilai yang menunjukkan ketepatan letak percabangan.
Detergen	bahan organik yang berfungsi untuk membersihkan, dengan kandungan surfaktan yang sangat berbahaya bagi lingkungan.
<i>Haplotype</i>	sekelompok gen dalam suatu organisme yang diwariskan dari orang tua tunggal, dapat menggambarkan keseluruhan gen pada kromosom yang diwariskan dari orang tua, dapat melihat titik-titik mutasi.
Klasifikasi	penataan organisme ke dalam kelompok-kelompok (taksa) berdasarkan atas analisis hubungan evolusi atau kemiripan.
Monotrika	satu flagelum yang terletak dibagian depan atau belakang.
Mikroaerofilik	dapat hidup pada kondisi dengan kadar oksigen yang rendah.
<i>Network</i>	gambar yang menunjukkan titik mutasi, <i>locality</i> , dan jumlah basa yang berbeda antara isolat uji dengan strain acuan maupun antar strain-strain acuan.
<i>Outgroup</i>	organisme yang memiliki sedikit perbedaan dengan <i>ingroup</i> sebagai cabang terluar pada pohon filogeni, untuk memperjelas kedekatan jarak (jarak kekerabatan) antar <i>ingroup</i> .

- Sistematika** kajian ilmiah organisme dengan tujuan akhir untuk menngkarakterisasi dan menempatkan organisme dengan cara teratur.
- Spesies** kumpulan dari strain-strain yang saling berhubungan tetapi berbeda organisme.
- Strain** progeni atau subkultur dari isolat koloni tunggal dalam kultur murni.
- Surfaktan** zat aktif permukaan yang mempunyai ujung berbeda yaitu hidrofil (suka air) dan hidrofob (suka lemak) yang dapat menurunkan tegangan permukaan senyawa pelarutnya.
- Xenobiotik** semua senyawa kimia yang dalam keadaan normal tidak dibutuhkan oleh tubuh makhluk hidup.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pseudomonas sp. merupakan salah satu genus bakteri yang mempunyai jumlah spesies sangat banyak. Saat ini lebih dari seratus spesies anggota Genus *Pseudomonas* telah berhasil diidentifikasi. Genus *Pseudomonas* memiliki banyak spesies yang berperan penting di lingkungan, baik secara ekonomis maupun untuk kesehatan. Beberapa spesies atau strain dari Genus *Pseudomonas* telah diketahui aktivitas metabolismenya, sehingga menjadikannya sebagai kandidat untuk bioremediasi ekosistem yang tercemar, untuk pemacu pertumbuhan tanaman, dan sebagainya. Banyak penelitian telah menemukan berbagai peranan *Pseudomonas* sp. untuk mendegradasi berbagai macam senyawa (Hasanuddin, 2003; Suharjo *et al.*, 2009).

Bakteri anggota Genus *Pseudomonas* ini terdiri dari banyak spesies. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Suharjo (2008) didapatkan bakteri *Pseudomonas* isolat J dan R yang memiliki peranan sebagai agen pendegradasi LAS di ekosistem perairan sungai yang tercemar limbah rumah tangga. Hal tersebut ditunjukkan dengan kemampuan tumbuhnya yang lebih baik dan pertumbuhan yang optimum pada konsentrasi LAS tinggi dibandingkan dengan isolat lain dan isolat acuan (*Pseudomonas putida* FNCC071). Bakteri *Pseudomonas* isolat J dan R yang ditumbuhkan dalam medium mineral cair dengan sumber karbon 30,01 mg/L LAS tanpa perlakuan adaptasi terhadap LAS mampu mendegradasi sebanyak 52,67 % dan 48,9% dalam waktu empat hari (96jam), sedangkan isolat lain dan isolat acuan memiliki kemampuan mendegradasi LAS lebih rendah (Utomo, 2010). Hal tersebut membutuhkan kajian klasifikasi spesies-spesies anggota Genus *Pseudomonas* yang pada saat ini didasarkan pada kekerabatan dan hubungan evolusinya, yaitu berdasarkan sekuen 16S rDNA (Galli *et al.*, 1992).

Bakteri *Pseudomonas* isolat J dan R berdasarkan sekuen 16S rDNA dianalisis kekerabatannya dengan beberapa spesies anggota Genus *Pseudomonas* yang memiliki potensi sebagai agen pendegradasi LAS. Diketahui hasilnya bahwa *Pseudomonas* isolat J memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Pseudomonas oleovorans* DSM 1045^T sebesar 97,62 % dan *Pseudomonas pseudoalcaligenes* LMG 1225^T sebesar 98,37 %, dan isolat R memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Pseudomonas*

stutzeri 84,86 % (Suharjono, 2008). Menurut konsep spesies secara filogenetik, suatu spesies dapat dikatakan sama jika nilai similaritasnya lebih dari 95 % dan dikatakan satu strain jika nilai similaritasnya lebih dari 99 % (Davis, 1996). Hasil klasifikasi *Pseudomonas* isolat J dan R yang dilakukan oleh Suharjono (2008) menunjukkan nilai similaritas belum memenuhi persyaratan tersebut, oleh karena itu *Pseudomonas* isolat J dan R tersebut perlu diklasifikasi ulang berdasarkan sistematika filogenetik khususnya sekuen 16S rDNA dengan strain-strain anggota Spesies *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, dan *Pseudomonas stutzeri*. Selain itu penelitian ini dilakukan mengingat kemampuan bakteri *Pseudomonas* sp. sebagai agen biodegradasi untuk mengetahui tingkat kekerabatan isolat *Pseudomonas* J dan R.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikaji pada penelitian ini adalah: Bagaimanakah tingkat kekerabatan isolat *Pseudomonas* J terhadap strain-strain anggota Spesies *Pseudomonas pseudoalcaligenes* dan *Pseudomonas oleovorans* serta isolat R dengan strain-strain anggota Spesies *Pseudomonas stutzeri* berdasarkan sekuen 16S rDNA?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat kekerabatan isolat *Pseudomonas* J terhadap strain-strain anggota Spesies *Pseudomonas pseudoalcaligenes* dan *Pseudomonas oleovorans* serta isolat R dengan strain-strain anggota Spesies *Pseudomonas stutzeri* berdasarkan sekuen 16S rDNA.

1.4 Manfaat

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

- 1) Mendapatkan informasi yang lebih valid mengenai hubungan kekerabatan bakteri Genus *Pseudomonas* berdasarkan nilai similaritas sekuen 16S rDNA.
- 2) Meningkatkan peran bakteri untuk aplikasi dalam biodegradasi guna mendukung bioremediasi ekosistem yang tercemar limbah deterjen.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Genus *Pseudomonas*

Pseudomonas sp. merupakan salah satu genus dari Famili Pseudomonadaceae. Bakteri ini berbentuk batang (basil), panjang sel bakteri 1,5-5,0 μm dan diameternya 0.5-1.0 μm , tidak membentuk spora, Gram negatif, aerobik atau mikroaerofilik, bergerak menggunakan flagel monotrika, tidak memproduksi prosteka, tidak dikelilingi selubung, dan tidak mengenal adanya fase istirahat. Bakteri ini menunjukkan hasil positif pada uji katalase dan oksidase dan mampu mengakumulasi β -hidroksi butirat sebagai cadangan karbon (Stanier *et al.*, 1966; Holt *et al.*, 1981).

Strain-strain anggota Genus *Pseudomonas* tidak mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang memiliki pH < 4,5. Umumnya bakteri ini bersifat aerobik namun pada kondisi tertentu genus ini dapat bersifat anaerobik karena mampu menggunakan nitrat sebagai akseptor elektronnya. Bakteri anggota genus ini mampu menggunakan H_2 dan CO_2 sebagai sumber energi (Holt *et al.*, 1981; Holt and Krieg, 1984).

2.2 Klasifikasi *Pseudomonas*

Penamaan Genus *Pseudomonas* untuk pertama kalinya dilakukan oleh Migula pada tahun 1894 dengan *Pseudomonas aeruginosa* sebagai nama spesiesnya. Genus *Pseudomonas* ini memiliki anggota spesies yang cukup melimpah dan termasuk genus yang sangat tua. Anggota genus ini berjumlah lebih dari 140 spesies, dan dari kesemua anggota genus tersebut belum terdeskripsi dengan baik dan benar, selain itu data klasifikasi spesies anggota genus ini masih belum lengkap. Bakteri Genus *Pseudomonas* dalam buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed*, digolongkan dalam Kingdom Bacteria, dengan Fillum Eubacteria, Kelas Proteobacteria, Sub kelas Gamma Proteobacteria, Ordo Pseudomonadales, dan Famili Pseudomonadaceae (Rhodes, 1959; Lysenko, 1961; Holt and Krieg, 1984).

Pada awalnya sifat-sifat yang digunakan dalam sistim klasifikasi adalah struktur koloni, bau, produksi pigmen spesifik, kemampuan tumbuh pada suhu 42 °C, denitrifikasi, kemampuan untuk mencairkan gelatin, dan kemampuan tumbuh pada beberapa senyawa karbon. Pada perkembangan selanjutnya sistim klasifikasi menggunakan sekuen 16Sr

DNA sebagai salah satu parameternya, hal ini dikarenakan sekuen 16S rDNA merupakan daerah yang terkonservasi pada genom suatu organisme. Hasil analisis menggunakan sekuen 16S rDNA mengakibatkan adanya beberapa perubahan dalam sistim klasifikasi anggota genus tersebut (Holt and Krieg, 1984; Galli et al., 1995; Euzaby, 2003).

2.3 Peran Genus *Pseudomonas*

Bakteri *Pseudomonas* ini distribusinya tersebar luas di seluruh dunia. Genus ini menarik banyak perhatian para ilmuwan karena peranan pentingnya sebagai agen pendegradasi xenobiotik, salah satu yang termasuk xenobiotik adalah surfaktan anionik. Beberapa spesies anggota Genus *Pseudomonas* berperan sebagai agen fitopatogen, dan penghasil biosurfaktan, mampu memfiksasi nitrogen molekular, dan dapat berasosiasi dengan mikhoriza *musroom* (Barraquio et al., 1983; Rangel et al., 2002).

Pseudomonas sp. merupakan salah satu bakteri yang bersifat hidrokarbonoklastik, karena bakteri genus ini mampu mendegradasi berbagai jenis hidrokarbon. Kemampuan *Pseudomonas* sp. dalam mendegradasi hidrokarbon inilah yang menjadi bukti bahwa bakteri genus ini mampu berperan sebagai agen bioremediasilingkungan yang tercemar oleh hidrokarbon dan deterjen (Hasanuddin, 2003).

Deterjen merupakan senyawa kimia yang banyak digunakan dalam rumah tangga maupun industri. Bahan tersebut telah diketahui merupakan salah satu penyebab tercemarnya ekosistem perairan (Budiawan et al., 2009). Deterjen memiliki sifat basa dan memiliki kandungan kimia berupa alkil sulfonat linier dan alkil benzena sulfonat (Cahaya, 2003). Surfaktan, *filler*, aditif, senyawa pembentuk busa, dan *fluorescent* merupakan bahan-bahan penyusun deterjen (Pohan, 2004).

Saat ini senyawa surfaktan anionik yang paling sering digunakan pada deterjen adalah Linier Alkilbenzen Sulfonat (LAS) (Lutfi, 2004). Linear alkilbenzen sulfonat (LAS) adalah surfaktan dalam deterjen yang bersifat toksik terhadap organisme aquatik. LAS (Gambar 1) adalah surfaktan anionik yang digunakan secara luas untuk menggantikan golongan Alkil Benzena Sulfonat (ABS) sebagai bahan pembersih (detergen). Produksi dunia tahunan untuk surfaktan tidak termasuk sabun, pada tahun 1990 diperkirakan mencapai 7 juta ton, sedangkan pada tahun 1997 produksi surfaktan meningkat mencapai 18 juta ton. Sejak tahun 1990, LAS menjadi perhatian peneliti karena

terbukti residu LAS terdistribusi predominan dalam air (97,5%), tanah (0,5%) dan sedimen (2%). Adanya LAS dalam tanah dan air memiliki dampak merugikan terhadap pertumbuhan bakteri aerobik tertentu. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengurangi dampak pencemaran limbah LAS adalah dengan biodegradasi (Budiawan *et al.*, 2009).

LAS mampu didegradasi dengan sempurna oleh mikroorganisme yang memiliki peranan dalam proses mineralisasi dan mendegradasi setiap molekul dari molekul tersebut (Garcia *et al.*, 1999). Dalam biodegradasi LAS membutuhkan keberadaan komunitas beberapa spesies bakteri termasuk *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* spp., dan *Acinetobacter* sp. (Budiawan *et al.*, 2009).

Telah dilaporkan bahwa Genus *Pseudomonas* dapat tumbuh pada beberapa aromatik sulfonat. *Pseudomonas* resisten terhadap kelaparan dan dapat tetap hidup saat periode lama dalam ekosistem yang mengandung populasi mikrobial alami (Budiawan *et al.*, 2009). Genus ini mampu menggunakan senyawa alkil, gugus benzen, dan gugus sulfonat sebagai sumber karbon, sulfur, dan energi untuk pertumbuhannya. Kemampuannya dalam mendegradasi LAS ini dikode oleh gen-gen yang berada di DNA plasmid (Utomo, 2010).

2.4 Sistematika Bakteri: Fenetik dan Filogenetik

Tidak adanya korelasi yang baik antara sistim klasifikasi fenetik dengan sistim klasifikasi filogenetik pada Genus *Pseudomonas* menyebabkan dilakukannya peninjauan kembali terhadap sistim klasifikasi yang telah ada. Klasifikasi fenetik (numerik) merupakan sebuah usaha pengelompokan organisme dengan metode numerik berdasarkan kesamaan sejumlah besar tipe-tipe fenotip. Setiap ciri fenotip diberi bobot nilai yang sama. Tujuan dari sistim klasifikasi ini untuk mengelompokkan strain-strain bakteri dalam kelompok-kelompok yang homogen (taksospecies) (Holt and Krieg, 1984).

Sistem klasifikasi fenetik ini tergolong cara yang tradisional dan penggolongannya berdasarkan beberapa sifat fenotip yang dipilih secara subjektif. Data yang dapat digunakan sebagai dasar sistim klasifikasi fenetik ini antara lain berdasarkan karakter morfologi baik sel maupun koloni, reaksi fisiologis, reaksi dan hasil reaksi biokimiawi, serta sifat toleransi dan resistansi terhadap antigenik. Prinsip utama dari sistim klasifikasi numerik adalah mengandung informasi yang banyak berdasarkan banyaknya karakter yang diuji dan setiap karakter memiliki

bobot nilai yang sama. Tingkat similaritas yang dimiliki strain-strai uji menunjukkan proporsi kesamaan sifat yang dimiliki bersama, similaritas tidak bersifat filogenetis melainkan fenetis dan taksa yang berbeda dibentuk berdasarkan sifat-sifat yang dimiliki. Klasifikasi seperti ini cenderung menunjukkan hasil yang stabil, objektif dan memudahkan, selain itu hasilnya juga berisi informasi yang banyak dan cukup teliti. Hasil dari klasifikasi fenetik biasanya ditampilkan dalam bentuk pohon yang disebut fenogram, dinamakan seperti itu karena setiap cabang dari pohon (fenogram) ini menunjukkan hubungan fenetik berdasarkan kesamaan sifat yang dimiliki bersama (Holt and Krieg, 1984).

Klasifikasi filogenetik merupakan usaha pengelompokan organisme berdasarkan sejarah evolusinya, yang mampu menggambarkan pertalian keturunan antar organisme-organisme melalui jalur keturunan dari leluhurnya. Hasil klasifikasi ini digambarkan dengan kladogram yakni dendogram yang menyatakan hubungan evolusi antarorganisme dan menunjukkan perubahan yang terjadi sepanjang waktu. Setiap percabangan menunjukkan perbedaan garis keturunan dan setiap keturunan memiliki satu garis nenek moyang (Davis, 1996).

Asam nukleat telah digunakan untuk menentukan beberapa sifat genotip bakteri, dan terbukti memiliki pengaruh terhadap identifikasi dan klasifikasi setiap organisme. Teknik baru ini muncul untuk memperbaharui sistem identifikasi dan klasifikasi yang hanya berdasar pada beberapa sifat-sifat fenetik saja, khususnya pada organisme yang secara fenotipik sama namun ternyata secara genetiknya berbeda. Sistematika molekuler yang didasarkan pada teknik ini meliputi penentuan ukuran, komposisi basa dan homologi sekuen (Galli *et al.*, 1992; Goodfellow and O'Donnel, 1993, Suwanto, 1994; Davis, 1996).

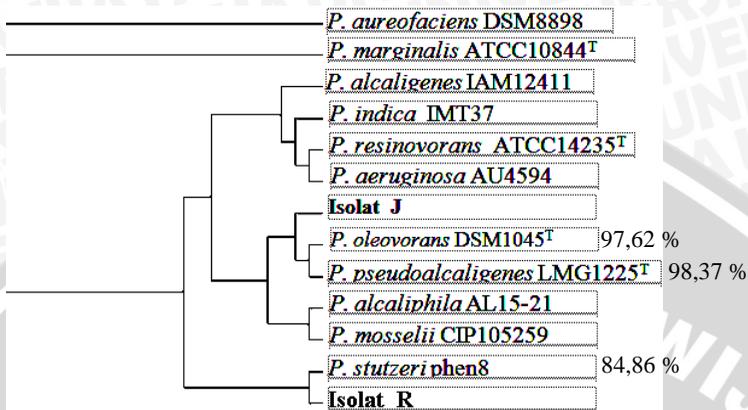
Parameter yang dapat digunakan dalam sistem klasifikasi filogenetik ini salah satunya adalah sekuen 16S rDNA. Selain karena sudah banyak digunakan untuk mengklasifikasi prokariot, sekuen 16S rDNA dipilih juga karena sifat gen-gennya yang sangat terkonservasisehingga tidak mudah mengalami perubahan. Hubungan kekerabatan antara dua strain didasarkan pada analisis sekuen 16S rDNA karena dapat dijadikan kronometer yang handal, terdapat pada semua makhluk hidup, memiliki fungsi yang identik, dapat dibandingkan secara obyektif, serta parameter tersebut berubah sesuai jarak evolusinya. Keuntungan yang dapat diperoleh dari sistem ini antara lain mampu memberikan konsep spesies mikrobial secara lebih pasti, lebih stabil, setelah dilakukan klasifikasi filogenetik dapat dilakukan skema identifikasi yang handal, dan

tentunya memberikan informasi mengenai hubungan evolusi dan filogeninya (Holt and Krieg, 1984; Galli *et al.*, 1992; Goodfellow and O'Donnel, 1993; Schleifer and Stackenbrandt, 1993, Suwanto, 1994; Davis, 1996).

Konsep spesies secara filogenetik memiliki peranan untuk menentukan spesies-spesies secara filogenetik dan menggambarkan hirarki keturunan. Suatu spesies merupakan strain-strain yang menunjukkan hasil reasosiasi DNA-DNA 70 % atau lebih dan perbedaan termalnya kurang dari atau sama dengan lima derajat Celsius. Tingginya derajat kesamaan sekuens asam nukleat menunjukkan adanya kemungkinan hibridisasi dalam suatu spesies telah terjadi. Menurut hasil studi komparasi, dapat diketahui bila nilai similaritas dari analisis sekuens 16S rDNA lebih dari 95% menunjukkan adanya perbedaan strain dan dapat dikatakan satu strain jika nilai similaritasnya lebih dari atau sama dengan 99% (Goodfellow and O'Donnel, 1993; Amann *et al.*, 1995; Davis, 1996).

2.5 Deskripsi tentang *Pseudomonas* Isolat J dan R

Pseudomonas isolat J dan R merupakan bakteri yang diperoleh Suharjono (2008) pada saat melakukan penelitiannya mengenai Keanekaragaman dan Potensi *Pseudomonas* Strain Indigenus Pendegradasi Surfaktan Anionik di Ekosistem Sungai Tercemar Deterjen. Bakteri ini ditemukan pada sampel batu yang telah ditumbuhi biofilm bakteri di sedimen ekosistem sungai Perumahan Sawojajar I Kota Malang yang telah tercemar deterjen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari komunitas bakteri yang membentuk biofilm, hanya isolat J dan R yang memiliki kemampuan tinggi dalam mendegradasi LAS. Setelah dilakukan analisis kekerabatan berdasarkan 16S rDNA dengan beberapa spesies acuan anggota Genus *Pseudomonas*, diketahui bahwa *Pseudomonas* isolat J memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Pseudomonas oleovorans* DSM 1045^T dan *Pseudomonas pseudoalcaligenes* LMG 1225^T, sedangkan *Pseudomonas* isolat R memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Pseudomonas stutzeri* phen8. Analisis kekerabatan ini merupakan hasil perbandingan antara isolat yang diperoleh dengan bakteri *Pseudomonas* pendegradasi LAS menggunakan sekuens 16S rDNA, dan berdasarkan kemampuan yang dimiliki dalam mendegradasi LAS (Suharjono, 2008).



Gambar 2.1 Pohon filogeni *Pseudomonas* isolat J dan isolat R (Suharjono, 2008)

Berdasarkan analisis filogenetik dari sekuen 16S rDNA tersebut diketahui bahwa, isolat J lebih berkerabat dengan *P. pseudoalcaligenes* LMG 1225^T dengan nilai similaritas 98,37 % sedangkan isolat R lebih berkerabat dengan *P. stutzeri* phen8 dengan nilai similaritas 84,86 % (Suharjono, 2008). Nilai similaritas yang diperoleh tersebut masih belum memenuhi persyaratan konsep spesies secara filogenetik, maka hasil ini digunakan sebagai informasi dasar untuk mencari strain-strain lain yang lebih dekat dengan kedua isolat tersebut. Harapan lain dari penelitian ini adalah mengetahui nilai similaritas *Pseudomonas* isolat J dan R berdasarkan sekuen 16S rDNA dengan strain-strain lain dari *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas stutzeri* apakah terdapat nilai similaritas yang lebih dari 99 % atau kurang dari 95 %.

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian "Identifikasi Bakteri *Pseudomonas* Isolat J dan R Pendegradasi Liniar Alkilbenzen Sulfonat (LAS) Berdasarkan sekuen 16s rDNA" dilaksanakan pada Oktober 2011 – Maret 2012, bertempat di Laboratorium Biokomputasi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Koleksi Data Sekuen

Data sekuen yang akan diteliti (isolat J dan R) diperoleh dari penelitian terdahulu dan dibandingkan dengan sekuen uji yang diperoleh dari NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), yakni dengan membuka alamat <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Data yang ada pada NCBI telah dihubungkan dengan *link* situs yang serupa dengan *gene bank* NCBI yaitu dengan DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) dan EMBL (*European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database*). Data yang dipilih berupa data nukleotida. Sekuen yang dipilih merupakan sekuen 16S rRNA dengan panjang basa lebih dari atau sama dengan 1.300 bp, dipilih *link* FASTA pada halaman informasi tersebut untuk memperoleh sekuen nukleotida dalam bentuk FASTA. Sekuen nukleotida yang sesuai dengan keinginan kemudian diunduh dan disimpan dalam format *.FASTA pada *note pad*.



Tabel 1. Strain *Pseudomonasoleovorans* sebagai acuan isolat J

No.	Ascesion Number (A.N)	Strain	(bp)	Authors
1.	EU047553.1	TMPSB5	1500	Shrivastava,M. dan D'Souza,S.F.
2.	GU357740.1	PAMD_1	1495	Aranganathan,V. dan Palvannan,T.
3.	GQ387664.1	DT4	1453	Chen,J.M., Zhou,Y.Y., Chen,D.Z. dan Jin,X.J.
4.	NR_043423.1	IAM 1508	1526	Anzai,Y., Kudo,Y. dan Oyaizu,H.
5.	JN128264.1	HNS030	1409	Su,P., Zhao,J., Wang,X.D., Jiang,R.Q. dan Zeng,Z.
6.	HQ697330.1	B21	1423	Javed,C.H.C.Hassan., Tan,Z. dan Peng,G.
7.	JF496274.1	XA4-2	1400	Liu,H.J., Li,L.B., Guo,X.J., Yang,K., Wu,B. dan Sun,L.
8.	AB680450.1	NBRC 13583	1462	Nakagawa,Y., Muramatsu,Y., Miyashita,M., Sugimoto,M., Yoshino,M. dan Kamakura,Y.
9.	DQ842018.3	RS1	1460	Saha,R., Sproer,C., Beck,B. dan Bagley,S. T.

Tabel 2. Strain *Pseudomonaspseudoalcaligenes* sebagai acuan isolat J

No	Accecion Number (A.N)	Strain	(bp)	Authors
1	EU216598.1	ZW23	1408	Zhu,X.-Y., Zhou,L.-X. dan Wang,S.-M.
2	EF608169.1	HT16	1450	Pandey,S.K. dan Das,S.K.
3	GU447236.1	A2	1568	Sybiya Vasantha Packiavathy,I., Veera Ravi,A., Syed Musthafa,K., Annapoorani,A. dan Karutha Pandian,S.
4	FJ472854.1	JM2	1475	Ma,J., Gao,H., Jia,L., Xu,L. dan Xie,J.
5	HQ263249.1	RF5	1350	Xiao,J.-J. dan Zhu,C.-X.
6	HQ455006.1	MSSRF D398	1432	Jegan,S., Prabavathy,V.R. dan Sudha,N.
7	FJ544382.1	sw04	1390	Liu,Z., Duan,S., Guo,G., Feng,X., Zheng,K. dan Cheng,L.
8	FJ544383.1	sw05	1388	Liu,Z., Duan,S., Guo,G., Feng,X., Zheng,K. dan Cheng,L.
9	JF911373.1	ECAe51	1403	Chang,C.-F. dan Su,J.-J.
10	GU593619.1	2-D-2	1472	Wang,W., Wang,L. dan Shao,Z.
11	HQ407234.1	E57	1519	Gupta,A.K., Nayduch,D., Verma,P., Shah,B., Ghate,H.V., Patole,M.S. dan Shouche,Y.S.

Tabel 3. Strain *Pseudomonasstutzeri* sebagai acuan isolat R

No	Accession Number (A.N)	Strain	(bp)	Authors
1	HQ219990.1	ATY71	1407	Trivedi,P., Spann,T. dan Wang,N.
2	HM481449.1	SD4	1409	Wu,R.J. dan Jia,H.
3	EU481507.1	SWI26	1456	Shikha,S.K., Alvin Raj,S., Manilal,A., Panikkar,M.V.N., Rajagopal,R., Sujith,S., Shanmugapriya,S. dan Gandhimathi,R.
4	GU339296.1	EH71	1500	Ahmed,E.H. dan Madamwar, D.
5	U26418	SP1402	1456	Bennasar,A., Rossello-Mora,R., Lalucat,J. dan Moore,E.R.
6	GU339277.1	EH49	1500	Ahmed,E.H. dan Madamwar, D.
7	FJ493028.1	TOS2	1390	Pradhan,S. dan Heerden,E.
8	AF411219.1	JJ	1498	Dijk,J.A., Stams,A.J., Schraa,G., Ballerstedt,H., de Bont,J.A. dan Gerritse,J.
9	AJ006107.2	ATCC 17682	1372	Sikorski,J., Rossello-Mora,R. dan Lorenz,M.G.
10	GQ480478.1	MR-5	1458	Mohanram,R. dan Kumar,P.
11	FJ223883.1	isolate 3	1389	Parker,J.L. dan Miller,T.A.
12	FJ223881.1	isolate 1	1547	Parker,J.L. dan Miller,T.A.
13	JF727659.1	H3	1497	Wang,X., Bai,Z. dan Zhuang,G.

Tabel 4. Outgroup untuk isolat J dan R

No	Accession Number (A.N)	Outgroup	(bp)	Authors
1	NR_026532.1	<i>Pseudomonas cichorii</i> strain PC1 (isolat J)	1494	Moore,E.R.B., Mau,M., Arnscheidt,A., Boettger,E.C., Hutson,R.A., Collins,M.D., Van de Peer,Y., De Wachter,R. dan Timmis,K.N.
2	NR_025566.1	<i>Enterobacter cowanii</i> strain 888-76 (Isolat R)	1362	De Baere,T., Verhelst,R. dan Vaneechoutte, M.

3.3 Analisis Kekekabatan Isolat Acuan dengan Strain-Strain Pembanding

Analisis kekerabatan antar isolat uji dengan strain-strain acuan dilakukan dengan mensejajarkan sekuen-sekuen nukleotida (*alignment*) dan ditambah satu individu diluar strain pembanding sebagai *outgroup*. Analisis *alignment* ini menggunakan ClustalX dengan model *multiple alignment mode*. Hasil penyejajaran yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan Bioedit. Data sekuen yang diperoleh pada

umumnyamemiliki gap, sehingga untuk hasil analisis yang lebih komparatif perlu dilakukan pemotongan gap (gap dihilangkan)menggunakan Gblock. Setelah dilakukan pemotongan gap data disimpan lagi dalam format *.FASTA-GB. Data yang telah disimpan tersebut kemudian dibuat pohon filogeni dari variable sekuen-sekuen tersebut untuk memvisualisasikan hasil penyejajaran, sehingga dari pohon tersebut dapat diketahui kekerabatan dan nilai similaritas dari isolat uji dengan strain-strain acuan yang digunakan. Pohon filogeni yang digunakan adalah *maximum-likelihood* dengan model Kimura 2-parameter. Sedangkan untuk melihat nilai ketepatan percabangan digunakan tiga macam pohon yakni neighbour-joining, *maximum-parsimony*, *maximum-likelihood*dengan metode bootstrap sebesar 1000. Setelah didapatkan pohon filogeni dihitung nilai matriks similaritasnya menggunakan perintah *compute pairwise distances*dengan menggunakan *software* MEGA5 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Detil analisis dapat dilihat pada lampiran 1.

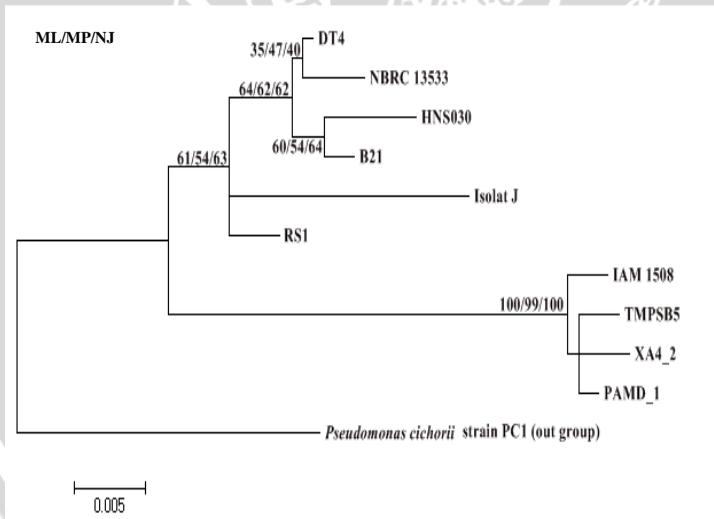
3.4 Analisis *Haplotype* dan Penggambaran Network

Data hasil penyejajaran yang telah dihilangkan gapnya tadi dilakukan analisis *haplotype* untuk melihat banyaknya *haplotype* yang terbentuk dalam satu perlakuan (perbandingan isolat uji dengan strain-strain acuan). *Haplotype* yang terbentuk dapat dilihat menggunakan *software* DNAsp5, dengan menggunakan perintah *haplotype data file* pada menu *general* hasilnya disimpan dalam format *.rdf. Hasil pembacaan *haplotype* menggunakan DNAsp kemudian divisualisasikan menggunakan *software* Network (detail langkah kerja dapat dilihat pada lampiran 2). Dari data ini dapat diketahui jumlah basa yang berbeda antara *haplotype* satu dengan *haplotype* yang lain, yang dapat membantu menjelaskan hasil dari pohon filogeni, dapat mendeteksi adanya titik-titik mutasi antar strain, dan dapat digunakan untuk mendeteksi phylogeografi.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

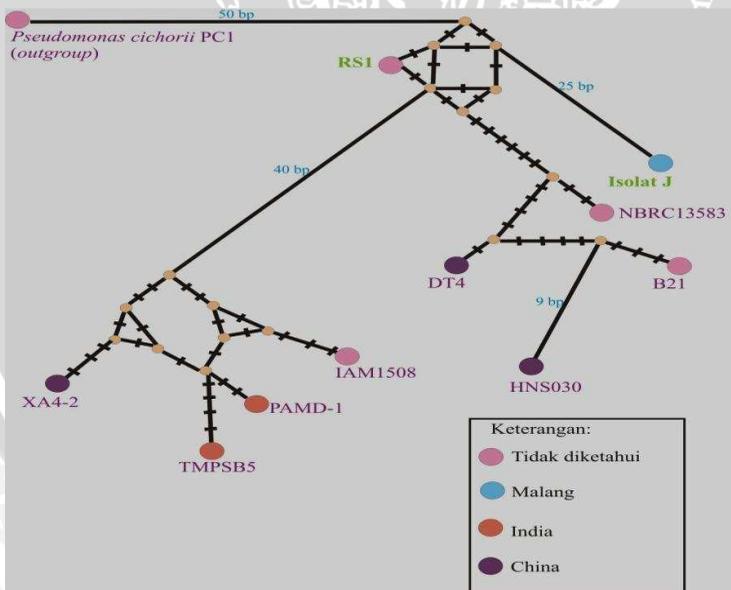
4.1 Kekerabatan Isolat J dengan *Pseudomonas oleovorans* dan *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

Pseudomonas isolat J yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Suharjono, 2008) dianalisis kembali kekerabatannya dengan strain-strain anggota *P. oleovorans* dan *P. pseudoalcaligenes*. Pohon filogeni hasil analisis isolat J dengan beberapa strain *P. oleovorans* menunjukkan bahwa isolat J memiliki kekerabatan yang dekat dengan strain RS1 dengan nilai similaritas sebesar 98 % (Lampiran 3). Pada pohon filogeni dapat dilihat pula adanya nilai *bootstrap* yang menunjukkan ketepatan letak percabangan. Ketepatan percabangan antara isolat J dengan *P. oleovorans* RS1 tergolong masih rendah dan berkemungkinan besar mengalami perubahan saat terdapat penambahan sekuen yang disejajarkan (*alignment*). Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebesar 61/54/63 (ML/MP/NJ). Menurut Tamura *et al.* (2007) jika nilai *bootstrap* sebesar 95 % atau lebih menunjukkan bahwa topologi dari percabangan pohon filogeni dapat dikatakan benar atau tepat.



Gambar 1. Pohon filogeni *maximum-likelihood* untuk isolat J dengan *Pseudomonas oleovorans*

Selain pembentukan pohon filogeni, dilakukan pula analisis *haplotype* untuk pembentukan *network*. *Network* hasil analisis *haplotype* menunjukkan bahwa isolat J lokasinya berdekatan dengan *P. oleovorans* RS1 dengan perbedaan basa sebesar 27 bp (Lampiran 6). Basa-basa yang berbeda antara *Pseudomonas* isolat J dengan strain RS1 terletak pada basa nomer 14, 388, 395,399,762,763,773,774,874,875, 880, 883, 887, 889, 892, 1060, 1062, 1063, 1064, 1354, 1355, 1357, 1359, 1361, 1362, 1363, 1364. Gambar *network* ini sesuai dan mendukung pohon filogeni. Gambar *network* juga menunjukkan adanya pola persebaran daerah (filogeografi), diketahui bahwa strain TMPSB5 dengan PAMD-1 berkerabat dekat dengan perbedaan basa sebesar 6 bp, dan berasal dari wilayah yang sama yakni India. Selain itu diketahui pula strain DT4 berkerabat dekat dengan HNS030 dengan jumlah basa yang berbeda sebesar 14 bp dan berasal dari wilayah China. Strain XA4-2 diketahui juga berasal dari daerah China namun tidak berkerabat dekat dengan HNS030 maupun DT4, strain XA4-2 justru diketahui berkerabat dekat dengan strain-strain yang berasal dari daerah India, hal ini dimungkinkan karena adanya evolusi pada strain XA4-2 yang menyebabkan susunan basanya menjadi berbeda dengan kedua strain yang berasal dari China.



Gambar 2. *Network* isolat J dengan *P. oleovorans*

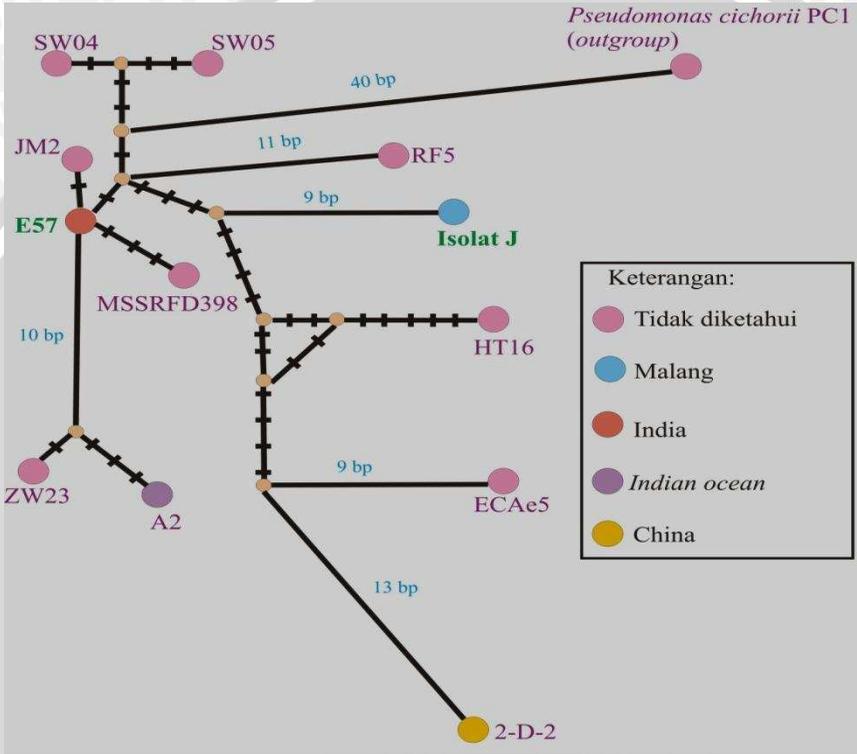
Pohon filogeni hasil analisis isolat J dengan beberapa strain *P. pseudoalcaligenes* menunjukkan bahwa isolat J memiliki kekerabatan yang dekat dengan strain E57 dengan nilai similaritas sebesar 99 % (Lampiran 4). Pada pohon filogeni dapat dilihat pula adanya nilai *bootstrap* sebesar 55/46/58 (ML/MP/NJ). Hal tersebut menunjukkan bahwa ketepatan percabangan antara isolat J dengan *P.pseudoalcaligenes* E57 tergolong masih rendah dan berkemungkinan besar mengalami perubahan saat terdapat penambahan sekuen yang disejajarkan (*alignment*).



Gambar 3. Pohon filogeni *maximum-likelihood* untuk isolat J dengan *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

Network hasil analisis *haplotype* untuk isolat J dengan *P. pseudoalcaligenes* menunjukkan posisi isolat J berdekatan dengan *Pseudomonas pseudoalcaligenes* E57, dengan jumlah basa yang berbeda sebanyak 13 bp (Lampiran 7). Basa-basa yang berbeda antara *Pseudomonas* isolat J dengan strain E57 terletak pada basa nomer 58, 826, 827, 831, 834, 838, 840, 843, 1011, 1013, 1014, 1307, 1308. Gambar *network* ini sesuai dan mendukung pohon filogeni. Gambar *network* juga menunjukkan adanya pola persebaran daerah (filogeografi), diketahui bahwa isolat J yang berasal dari daerah Malang berkerabat dekat dengan strain E57 yang berasal dari India. Strain A2

yang berasal dari *Indian ocean* berkerabat dekat dengan ZW23 yang tidak diketahui asalnya, selain itu diketahui pula strain 2-D-2 berasal dari daerah China berkerabat dekat dengan ECAe5 yang asalnya tidak diketahui.



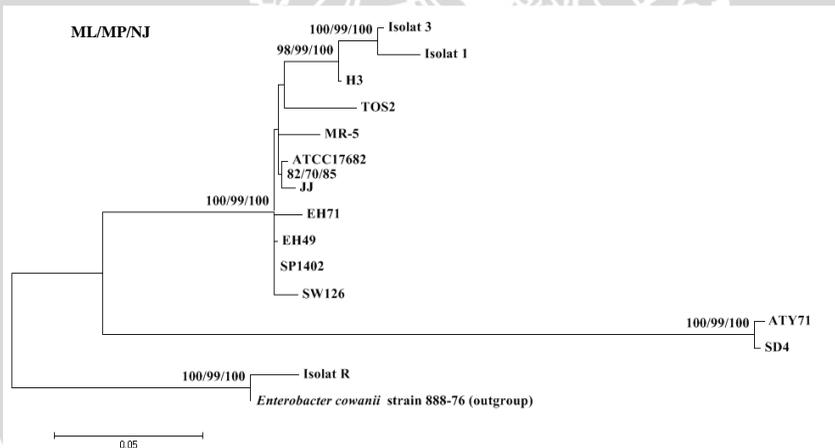
Gambar 4. *Network* isolat J dengan *P. pseudoalcaligenes*

Pohon filogeni dan *network* menunjukkan hasil bahwa isolat J cenderung lebih berkerabat dekat dengan *P. pseudoalcaligenes* dibandingkan dengan *P. oleovorans*. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai similaritas antara isolat J dengan *P. pseudoalcaligenes* E57 yang lebih besar daripada isolat J dengan *P. oleovorans* RS1 yakni sebesar 98 % dan jumlah basa yang berbeda lebih sedikit yaitu sebanyak 13 bp. Menurut Chen *et al.* (2000) 16S rDNA paling banyak digunakan untuk memperoleh informasi mengenai klasifikasi bakteri pada tingkatan famili, genus, spesies, dan strain. Menurut konsep spesies secara filogenetik yang dinyatakan Davis (1996) bahwa suatu spesies dapat

dikatakan sama jika nilai similaritasnya lebih dari 95 % dan dikatakan satu strain jika nilai similaritasnya lebih dari 99 %. Melihat nilai similaritas isolat J dengan *P. pseudoalcaligenes* E57 sebesar 99 % dapat dinyatakan dengan pasti bahwa keduanya merupakan spesies yang sama namun memiliki kemungkinan isolat J merupakan salah satu strain baru dari *P. pseudoalcaligenes*.

4.2 Kekeabatan Isolat R dengan *Pseudomonas stutzeri*

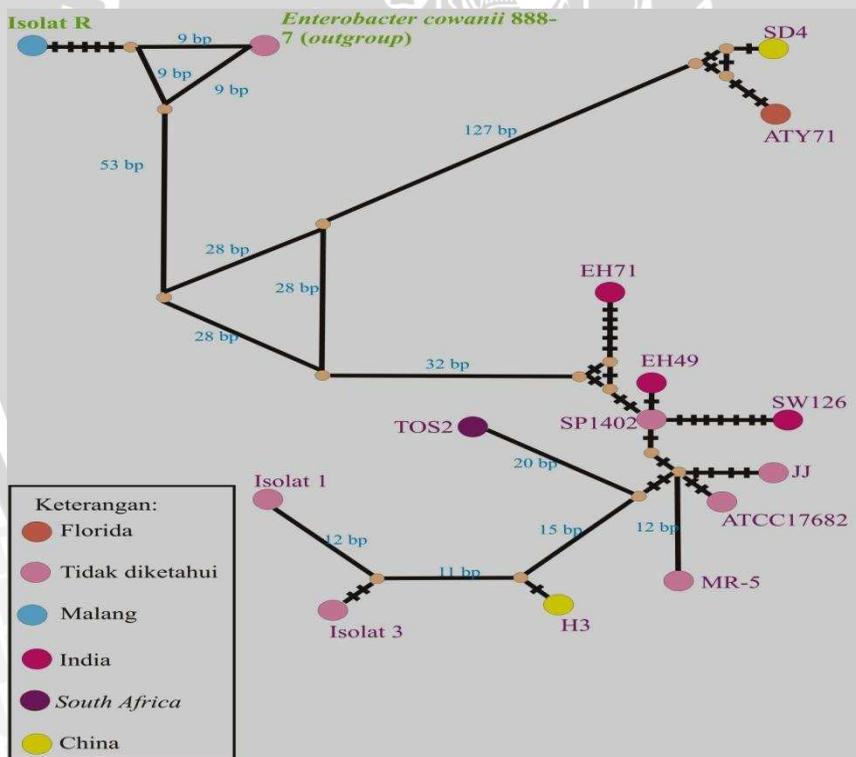
Pseudomonas isolat R yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Suharjono, 2008) dianalisis kembali kekerabatannya dengan strain-strain anggota *P. stutzeri*. Pohon filogeni hasil analisis isolat R dengan beberapa strain *P. stutzeri* menunjukkan bahwa isolat R memiliki kekerabatan yang dekat dengan *outgroup* yakni *Enterobacter cowanii* strain 888-76 dengan nilai similaritas sebesar 98,3 % (Lampiran 5). Diketahui pula nilai bootstrap pada pohon filogeni sebesar 100/99/100 (ML/MP/NJ) yang menunjukkan bahwa lokasi percabangan pada pohon filogeni sudah benar atau tepat.



Gambar 5. Pohon filogeni *maximum-likelihood* untuk isolat R dengan *Pseudomonas stutzeri*

Hasil analisis *haplotype* pada *network* untuk isolat R dengan beberapa strain *P. stutzeri* menunjukkan bahwa posisi isolat R berdekatan dengan *Enterobacter cowanii* strain 888-76, dengan jumlah basa yang berbeda sebesar 14 bp (Lampiran 8). Hal ini sesuai dengan

yang tergambar di pohon filogeni dan memperkuat dugaan jika isolat R tidak termasuk dalam spesies *P. stutzeri*. Basa-basa yang berbeda antara *Pseudomonas* isolat R dengan *Enterobacter cowanii* strain 888-76 terletak pada basa nomer 23, 65, 108, 326, 336, 447, 717, 718, 743, 744, 759, 761, 780, 781. Gambar *network* juga menunjukkan adanya pola persebaran daerah (filogeografi), diketahui bahwa strain SD4 dan H3 berasal dari daerah China, namun keduanya memiliki kekerabatan yang cukup jauh dengan jumlah basa yang berbeda 209 bp. Strain SD4 lebih berkerabat dekat dengan strain ATY71 yang berasal dari Florida dengan basa yang berbeda sebanyak 5 bp. Perbedaan basa yang cukup banyak ini dapat disebabkan beberapa hal, salah satunya karena adanya mutasi. Strain EH49 dan SW126 berasal dari daerah India dan memiliki kekerabatan yang dekat dengan strain SP1402 yang asalnya tidak diketahui. Strain TOS2 diketahui berasal dari *South Africa* berkerabat dekat dengan MR-5 dengan jumlah basa yang berda sebanyak 32 bp.



Gambar 6. *Network* isolat R dengan *P. stutzeri*

Pohon filogeni dan *network* menunjukkan hasil bahwa isolat R cenderung lebih berkerabat dekat dengan *Enterobacter cowanii* strain 888-76 (*outgroup*) dibandingkan dengan beberapa strain dari *P. stutzeri*. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai similaritas antara isolat R dengan *Enterobacter cowanii* strain 888-76 yang lebih besar daripada isolat R dengan *P. stutzeri* yakni sebesar 98,3 % dan diperkuat dengan jumlah basa yang berbeda lebih sedikit yaitu sebanyak 14 bp. Setelah berkerabat dekat dengan *outgroup*, isolat R berkerabat dekat dengan *P. stutzeri* SP1402 yang ditunjukkan dengan nilai similaritas sebesar 82,8 % dan jumlah basa yang berbeda sebanyak 130 bp. Sehingga dapat dikatakan bahwa isolat R tidak termasuk dalam spesies *P. stutzeri*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Davis (1996) bahwa suatu spesies dapat dikatakan sama jika nilai similaritasnya lebih dari 95 %. Isolat R kemungkinan merupakan spesies lain dari Genus *Pseudomonas*.



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Isolat J merupakan *Pseudomonas pseudoalcaligenes* dengan nilai similaritas sebesar 99 % dan kemungkinan merupakan strain baru. Sedangkan isolat R merupakan anggota Genus *Pseudomonas* selain *Pseudomonas stutzeri*. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai similaritas antara isolat R dengan *P. stutzeri* SP1402 sebesar 82,8 % dan jumlah basa yang berbeda sebanyak 130 bp, serta nilai similaritas yang lebih tinggi yakni 98,3 % dengan *Enterobacter cowanii* 888-7 yang merupakan *outgroup*.

5.2 Saran

Saran bagi peneliti yang selanjutnya adalah untuk mengklarifikasi hasil analisis kekerabatan secara filogenetik yang telah diperoleh ini dengan meninjau kembali hasil identifikasi secara filogenetik dengan menggunakan sekuen *cytB* yang lebih spesifik untuk menentukan strain, sehingga pembahasan yang mendalam bisa didapatkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K-H. 1995. Phylogenetic Identification and *in situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* **59** (1):143-169.
- Barraquio, W. L., Ladha, J. K. and Watanabe, I. 1983. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* Associated with Wetland rice. *Can. J. Microbiol.* **29**: 869-873.
- Budiawan, Fatisa, Y., and Khairani, N. 2009. Optimasi Biodegradabilitas dan Uji Toksisitas Hasil Degradasi Surfaktan Linear Alkilbenzena Sulfonat (LAS) sebagai Bahan Deterjen Pembersih. *Makara, Sains.* **13**(2): 125-133.
- Cahaya, I. 2003. **Ikan sebagai Alat Monitor Pencemaran.** Bagian Kesehatan Lingkungan Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Sumatera Utara, Sumatera Utara.
- Chen, J., Banks, D., Jarret, R. L., Chang, C. J., and Smith, B. J. 2000. Use of 16S rDNA Sequences as Signature Characters to Identify *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology.* **40**: 29-33.
- Davis, J. I. 1996. Phylogenetic, Molecular Variations, and Species Concepts. *Bioscience.* **46** (7): 502-510.
- Euzeby, J. P. 2003. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature- Genus *Pseudomonas*.
<http://www.bacteria.cict.fr/p/pseudomonas.htm>.
- Galli, E., Silver, S. and Witholt, B. 1992. ***Pseudomonas* : Molecular Biology and Biotechnology.** American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Garcia, J. C, Esteve, and Duhalt, R. V. 1999. The Branched-Chain Dodecylbenzene Sulfonate Degradation Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D Involves a Novel Route for Degradation of the Surfactant Lateral Alkyl Chain. *Applied and Environmental Microbiology.* **65** (8): 3730-3734.

Goodfellow, M. and O'Donnel, A. G. 1993. **Handbook of New Bacterial Systematics**. Academic Press, Harcourt Brace & Co. Publ., London.

Harijati, N., Suharjo and Kurniati, T. H. 1994. **Studi Komunitas Bakteri Pemecah Deterjen Jenis Alkil Benzen Sulfonat (ABS) dan Linear Alkil Benzen Sulfonat (LAS)**. Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

Hasanuddin.2003. **Peningkatan Peranan Mikroorganisme dalam Sistem Pengendalian Penyakit Tumbuhan secara Terpadu**.USU *Digital Library*.Sumatera.

Holt, J. G. and Krieg, N. R. 1984. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. H., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Kim, S., Chun, J., Bae, K. J. and Kim, Y. 2000. Polyphasic Assignment of an Aromatic-Degrading *Pseudomonas* sp. Strain Dj77 in the Genus *Spingomonas* as *Spingomonas chungbukensis* sp., nov. *IJSEM*.50: 1641– 1647.

Lutfi, A. 2004. **Pencemaran Lingkungan**. Bagian Proyek Pengembangan Kurikulum Direktorat Jendral Pendidikan Dasar dan Menengah Departemen Pendidikan Nasional.

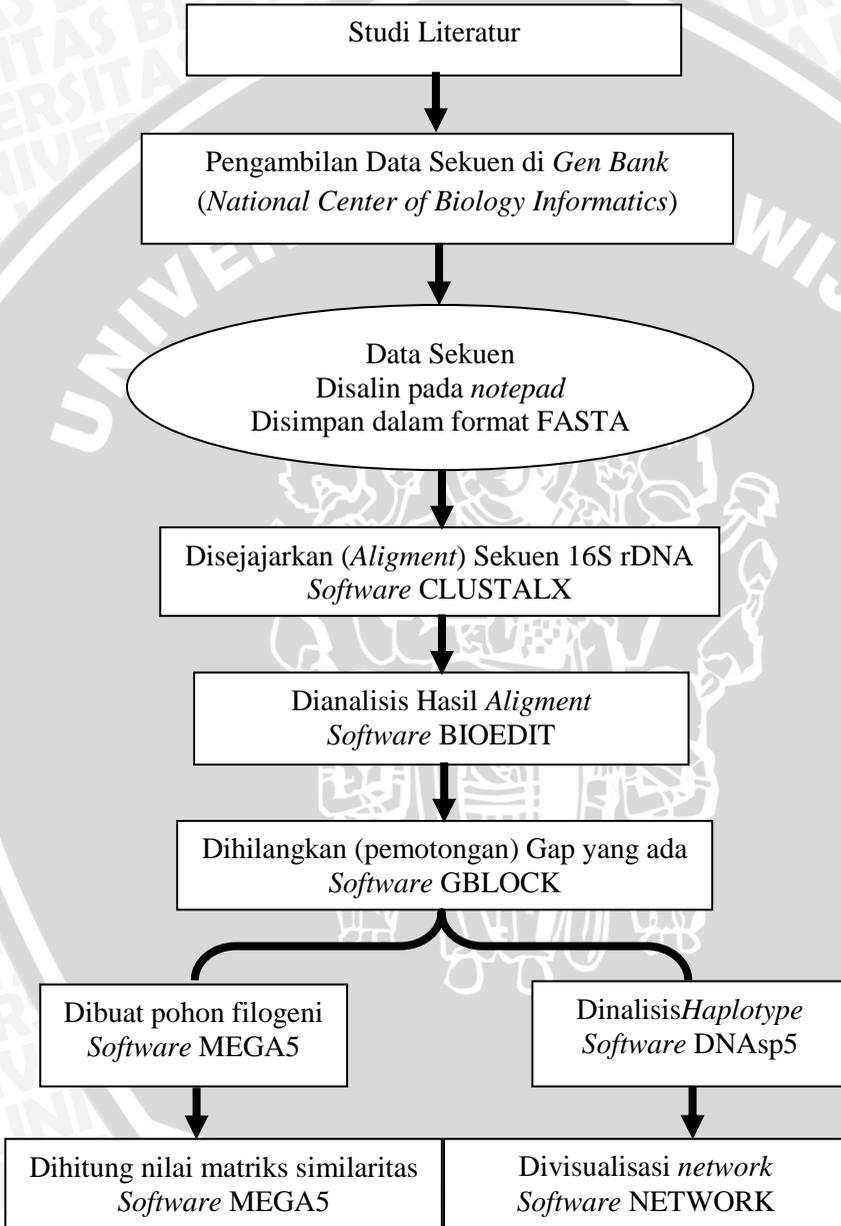
Lysenko, O. 1961.*Pseudomonas* – An Attempt at a General Classification. *J. Gen. Microbiol.* 25: 379-408.

Pohan, N. 2004. **Pengaruh Bahan-Bahan Kimia Buangan Industri terhadap Lingkungan**. Fakultas Teknik, Jurusan Teknik Mesin. Universitas Sumatera Utara, Sumatera Utara.

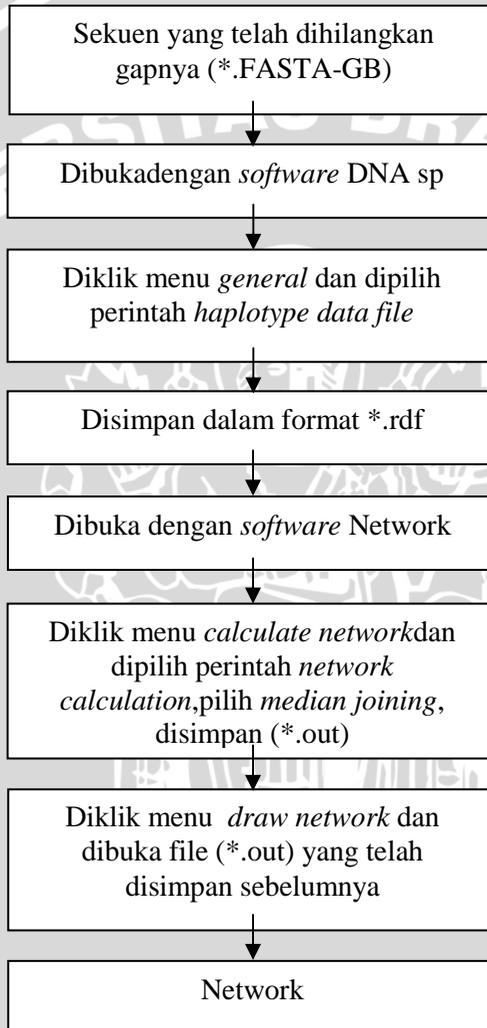
- Rangel-Castro, J. I., Leventors, J. J. and Danell, E. 2002. Physiological and Genetic Characterization of fluorescent *Pseudomonas* Associated with *Cantharellus cibarius*. *Can. J. Microbiol.* 48 : 739-748.
- Rhodes, M. E. 1959. The Caractherization of *Pseudomonas fluorencens*. *J. Gen. Microbiol.* 21 : 221-263.
- Schleifer, K. H. and Stackenbrandt, E. 1993. Molecular Systematics of Procariotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37 : 143-187.
- Sembiring, L. 2002. **Sistematik Molekular**. Petunjuk Praktikum. Yogyakarta. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. 1966. The aerobic Pseudomonads : a Taxonomic Study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 158-271.
- Suharjono, Sutrisno and Ashari, A. 2009. **Potensi Konsorsium Bakteri Pembentuk Biofilm dalam Mendegradasi Linier Alkylbenzene Sulfonat**. Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki. Malang. Prosiding Bioteknologi.
- Suharjono. 2008. **Keanekaragaman dan Potensi Pseudomonas Strain Indigenous Pendegradasi Surfaktan Anionik di Ekosistem Sungai Tercemar Deterjen**. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Disertasi.
- Suwanto, A. 1994. Ulas Balik : Evolusi Mikrobiadan Kaitannya dengan Sistematik Molekular. *Hayati.* 1 (2) : 26-31.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24: 1596-1599.
- Utomo, R. N. C. 2010. **Potensi Bakteri Pembentuk Biofilm dalam Mendegradasi Linier Alkilbenzen Sulfonat pada Berbagai Ukuran Batu**. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2. Langkah Kerja Menggunakan *Software* DNAsp dan Network



Lampiran 3. Matrik similaritas isolat J dan *Pseudomonas oleovorans*

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Isolat J											
2	RS1	98.0										
3	DT4	97.8	99.0									
4	NBRC13583	97.7	99.3	99.5								
5	B21	97.4	98.7	99.4	99.0							
6	HNS030	97.2	98.3	99.0	98.9	99.1						
7	PAMD1	95.0	96.4	95.9	96.0	96.2	96.1					
8	IAM1508	94.9	96.5	95.9	96.0	96.2	96.1	99.5				
9	XA4-2	94.9	96.4	95.9	96.0	96.1	96.0	99.5	99.3			
10	TMPSB5	94.7	96.3	95.8	95.8	96.1	96.0	99.6	99.3	99.3		
11	<i>Pseudomona cichorii</i> (outgroup)	95.1	96.1	96.1	95.8	95.8	95.7	93.8	93.8	93.8	93.6	

Lampiran 4. Matrik similaritas isolat J dan *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Isolat J												
2	E57	99.0											
3	JM2	98.9	99.9										
4	MSSRFD398	98.8	99.8	99.7									
5	SW04	98.8	99.6	99.5	99.4								
6	SW05	98.7	99.5	99.5	99.3	99.6							
7	HT16	98.5	98.8	98.8	98.6	98.6	98.5						
8	RF5	98.2	99.1	99.0	98.8	98.8	98.8	98.1					
9	ZW23	98.1	99.2	99.1	98.9	98.8	98.7	98.8	98.7				
10	A2	98.1	99.0	99.1	98.8	99.6	98.7	98.6	98.7	99.7			
11	ECAe51	97.8	98.4	98.3	98.1	98.0	97.9	98.5	97.7	97.8	97.7		
12	2-D-2	97.8	98.2	98.3	98.0	98.3	98.2	98.1	97.4	97.7	97.8	98.3	
13	<i>Pseudomonas cichorii</i> (outgroup)	95.9	96.7	96.6	96.5	96.6	96.6	96.1	96.7	96.4	96.6	95.8	95.6

Lampiran 5. Matrik similaritas isolat R dan *Pseudomonas stutzeri*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 Isolat R															
2 SP1402	82.8														
3 EH49	82.6	99.9													
4 EH71	82.3	99.0	98.9												
5 ATCC17682	82.2	99.5	99.4	98.6											
6 JJ	81.9	99.3	99.2	98.3	99.3										
7 H3	81.8	97.7	97.6	96.7	97.5	97.2									
8 SW126	81.8	99.2	99.0	98.2	98.7	98.4	96.9								
9 MR-5	81.7	98.4	98.3	97.5	98.2	98.0	96.4	97.8							
10 Isolat 3	81.7	96.5	96.4	95.5	96.0	95.7	98.3	95.9	95.4						
11 Isolat 1	80.5	95.2	95.1	94.2	94.7	94.5	97.1	94.6	93.8	98.3					
12 TOS2	79.6	97.2	97.1	96.2	97.0	96.7	95.6	96.4	95.9	94.1	92.8				
13 ATY71	68.4	72.2	72.1	72.2	71.9	71.6	71.1	71.1	71.2	69.7	67.9	70.0			
14 SD4	68.4	72.6	72.5	72.6	72.3	71.9	71.5	71.5	71.6	70.1	68.3	70.4	99.4		
15 <i>Enterobacter cowanii</i> (outgroup)	98.3	83.5	83.4	83.1	82.9	82.6	82.6	82.6	82.5	68.0	68.0	80.4	68.0	68.0	

Lampiran 6. Jumlah basa yang berbeda isolat J dan *Pseudomonas oleovorans*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Isolat J										
2	RS1	27									
3	NBRC13583	35	10								
4	DT4	38	13	7							
5	B21	44	19	13	8						
6	HNS030	50	25	19	14	12					
7	XA4-2	73	47	55	58	64	70				
8	IAM1508	73	47	55	58	64	70	10			
9	PAMD-1	73	47	55	58	64	70	7	7		
10	TMPSD5	75	49	57	60	66	72	9	9	6	
11	<i>Pseudomonas cichorii</i> (outgroup)	76	52	61	64	70	76	98	98	98	100

Lampiran 7. Jumlah basa yang berbeda isolat J dan *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Isolat J												
2	E57	13											
3	RF5	23	12										
4	JM2	14	1	13									
5	MSSRFD398	16	3	15	4								
6	ZW23	24	11	23	12	14							
7	A2	26	13	25	14	16	4						
8	SW04	16	5	15	6	8	16	18					
9	SW05	17	6	16	7	9	17	19	3				
10	HT16	20	15	25	16	18	26	28	18	29			
11	ACAe5	28	23	33	24	26	34	36	26	27	20		
12	2-D-2	32	27	37	28	30	38	40	30	31	24	22	
13	<i>Pseudomonas cichorii</i> (outgroup)	53	42	52	43	45	53	55	43	44	55	63	67

Lampiran 8. Jumlah basa yang berbeda isolat R dan *Pseudomonas stutzeri*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 Isolat R															
2 SD4	224														
3 ATY71	226	5													
4 EH71	133	195	197												
5 SP1402	130	192	194	8											
6 EH49	131	194	196	9	1										
7 SW126	137	199	201	15	7	8									
8 JJ	136	198	200	14	6	7	13								
9 ATCC17682	134	196	298	12	4	5	11	6							
10 MR-5	144	206	208	22	14	15	21	16	14						
11 TOS2	154	216	218	32	24	25	31	26	24	34					
12 H3	150	212	214	28	20	21	27	22	20	30	36				
13 Isolat 3	162	224	226	40	32	33	39	34	32	42	48	14			
14 Isolat 1	172	234	236	50	42	43	49	44	42	52	58	24	15		
15 <i>Enterobacter cowanii</i> (outgroup)	14	219	221	128	125	126	133	131	129	139	149	145	157	167	