

## Sistematik Filogenetik *Pseudomonas* Strain *Indigenous* Pendegradasi Linier Alkilbenzen Sulfonat

### Phylogenetic Systematic of Indigenous Strain of *Pseudomonas* Linear Alkylbenzene Sulphonate-Degrading

Suharjono<sup>1\*</sup>, Langkah Sembiring<sup>2</sup>, Yusup Subagja<sup>2</sup>, dan Wiwik E. Widayati<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya, Malang

<sup>2</sup>Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup>Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI), Pasuruan

E-mail: calistus@brawijaya.ac.id \*Penulis untuk korespondensi

#### Abstract

Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS) was the dominant pollutant in the river ecosystem. Indigenous strains of *Pseudomonas* in river ecosystem had highly potency to LAS degradation. This research was carried out to study relationship of *indigenous* strains of LAS degrading to *Pseudomonas* strains. Indigenous strains of bacteria of LAS degrading were characterized based on ARDRA (Amplified Ribosomal 16S rDNA Restriction Analysis) and 16S rDNA sequence. Result of the research shows that *Pseudomonas* strain J and R which LAS degrading from detergent polluted river ecosystem based on 16S rDNA sequence, isolate J has 98.37% similarity and it has relationship to *P. pseudoalcaligenes* LMG 1225<sup>T</sup> whereas isolate R has 84.86% similarity and related to *P. stutzeri* phen8.

**Key words:** Phylogenetic, relationship, LAS, *Pseudomonas*

#### Abstrak

Linier Alkilbenzen Sulfonat (LAS) merupakan pencemar utama di ekosistem sungai. Strain-strain *indigenous* anggota Genus *Pseudomonas* di ekosistem sungai diketahui memiliki potensi tinggi dalam mendegradasi LAS. Penelitian ini bertujuan mempelajari kekerabatan strain-strain *indigenous* pendegradasi LAS terhadap strain-strain anggota Genus *Pseudomonas*. Strain-strain bakteri *indigenous* pendegradasi LAS dikarakterisasi berdasarkan ARDRA (Amplified Ribosomal 16S rDNA Restriction Analysis) dan sekuen 16S rDNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Pseudomonas* strain J dan R dari ekosistem sungai tercemar deterjen pendegradasi LAS berdasarkan ARDRA dan sekuen 16S rDNA, isolat J memiliki nilai similaritas sekuen 16S rDNA 98,37% dan secara filogenetik berkerabat dekat dengan *P. pseudoalcaligenes* LMG 1225<sup>T</sup> sedangkan isolat R berkerabat dengan *P. stutzeri* phen8 dengan nilai similaritas 84,86%.

**Kata kunci:** Filogenetik, kekerabatan, LAS, *Pseudomonas*

Diterima: 23 Februari 2009, disetujui: 23 November 2009

## Pendahuluan

Deterjen sintetik sebagai agen pembersih mengandung surfaktan anionik Linier Alkilbenzen Sulfonat (LAS) (Campos-Garcia *et al.*, 1999; Jerabkova *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Schleheck *et al.*, 2000). Surfaktan tersebut selalu ada dalam limbah permukiman dan terakumulasi di air dan sedimen ekosistem sungai (Jerabkova *et al.*, 1999; Kenzaka *et al.*, 2001). Hasil penelitian menunjukkan bahwa

kandungan deterjen di dalam air Sungai Brantas sudah melampaui nilai ambang 0,5 mg/L (Retnaningdyah *et al.*, 1999; Mitakda *et al.*, 2000; Suharjono, 2008).

Strain-strain bakteri anggota Genus *Pseudomonas* dominan di ekosistem sungai yang tercemar deterjen (Suharjono, 2008). Beberapa strain anggota genus tersebut berperan penting dalam biodegradasi dan mereduksi toksisitas limbah deterjen (Campos-Garcia *et al.*, 1999; Jerabkova *et al.*, 1999; Schleheck *et al.*,

2000 dan 2003; Suharjo *et al.*, 2007a). Strain-strain bakteri memiliki plasmid *Octana* (OCT) penyandi enzim pendegradasi rantai alkil (Van Beilen *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 2002; Dinamarca *et al.*, 2003), plasmid Toluene (TOL) penyandi enzim pengatalisis pemecahan cincin benzene (McCoy, 2000; Wackett, 2003), dan operon *ssu* (sulfonatesulfurutilization) *EADCBF* penyandi enzim untuk desulfonasi LAS (Kahnert *et al.*, 2000; Schleheck *et al.*, 2003).

Strain-strain bakteri *Indigenus* pendegradasi LAS berdasarkan sifat fenotip dan sidik jari protein termasuk anggota Genus *Pseudomonas* (Suharjo *et al.*, 2007b; Suharjo, 2008). Analisis sekuen 16S rDNA dengan *ARDRA* (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) sudah banyak digunakan untuk klasifikasi strain-strain bakteri anggota Genus *Pseudomonas* (Widmer *et al.*, 1998; Cho dan Tiedje, 2000; Rangel-Castro *et al.*, 2002; Scortichini *et al.*, 2002; Di Battista – Leboeuf *et al.*, 2003; Lagace *et al.*, 2004). Menurut Spilker *et al.*, (2004) amplifikasi gen 16S rDNA dengan *PCR* yang diikuti *ARDRA* dapat digunakan untuk mendeteksi dan diferensiasi strain-strain atau spesies anggota Genus *Pseudomonas*. Dalam penelitian ini digunakan enzim restriksi *RsaI* dan *HinfI* karena keduanya dapat menghasilkan fragmen-fragmen 16S rDNA yang dapat membedakan beberapa kelompok strain bakteri.

Sekuen 16S rDNA sudah lama digunakan sebagai acuan dalam bidang taksonomi untuk klasifikasi dan penentuan filogeni spesies-spesies bakteri (Rangel-Castro *et al.*, 2002). Dijelaskan pula bahwa identifikasi berdasarkan genotip tersebut untuk identifikasi spesies atau strain lebih akurat, andal, sederhana, objektif, serta memungkinkan pembedaan antarstrain atau spesies (Spilker *et al.*, 2004). Menurut Di Battista-Leboeuf *et al.*, (2003) metode tersebut untuk estimasi komposisi dan keanekaragaman anggota Genus *Pseudomonas* dalam habitat yang kompleks karena efektif untuk diskriminasi di antara spesies-spesies. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kekerabatan strain-strain bakteri pendegradasi LAS *indigenus* ekosistem tercemar deterjen terhadap strain-strain anggota Genus *Pseudomonas* secara filogenetik berdasarkan similaritas sekuen 16S rDNA.

## Metode Penelitian

Kromosom (DNA) isolat bakteri diisolasi dengan metode miniprep CTAB menurut Ausubel *et al.*, (1997). Bahan genetik hasil isolasi disentrifugasi pada suhu 4°C, 3600 x g, selama satu menit, kemudian gen 16S rDNA diamplifikasi dengan *Thermocycler Gene Cyclor* (Biorad). Primer digunakan untuk amplifikasi gen 16S rDNA adalah P0(5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') dan P6(5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3') dari Roche. Primer tersebut universal untuk berbagai strain bakteri (Scortichini *et al.*, 2002) dan dirancang Grifoni *et al.*, (1995 *cit.* Scortichini *et al.*, 2002) berdasarkan sekuen ujung 5' dan 3' gen 16S rRNA bakteri yang terkonservasi (posisi 27f dan 1495r pada 16S rDNA *Escherichia coli*) dan memungkinkan amplifikasi hampir keseluruhan gen.

Campuran untuk reaksi PCR terdiri atas *2X PCR Master Mix* (Fermentas) 10 µl, Primer P0 (27f) 1 µl, Primer P6 (1495r) 1 µl, DNA *template* 1 µl, dan akuabides bebas nuklease 7 µl. Sampel disentrifugasi pada suhu 4°C, 9800 x g, selama 20 detik kemudian ditempatkan dalam *Gen Cyclor* Biorad. Program amplifikasi 16S rDNA yaitu denaturasi awal 95°C selama dua menit, 35 siklus yang terdiri denaturasi pada 95°C selama 0,5 menit, *annealing* pada 55°C selama satu menit, dan ekstensi 72°C selama 1,5 menit; ekstensi akhir 72°C selama 10 menit, dan ekstensi akhir 37°C selama 5 menit. Amplikon gen 16S rDNA dimurnikan dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* (Geneaid, Taiwan).

Amplikon 16S rDNA dianalisis dengan metode *ARDRA* menurut De Baere *et al.*, (2002). Amplikon 16S rDNA sebanyak 15 µl ditambahkan dua mikroliter *buffer* enzim restriksi, 2,5 µl akuabides bebas nuklease, serta 0,5 µl enzim restriksi *RsaI* atau *HinfI* (Roche) dengan konsentrasi 1 µg/µl. Suspensi tersebut diinkubasikan selama 2,5 jam pada suhu 37°C. Restriksi DNA dihentikan dengan penambahan lima mikroliter *loading dye* (*blue juice*) dan dipanaskan pada 65°C selama lima menit. Sampel dan DNA *ladder* 100 bp (N3231S dari Biolabs) kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 2,0% (w/v) pada 50

volt selama 30 menit dalam 2x buffer Tris-borat TBE yang mengandung 0,5 µg ethidium bromida. Pola pita fragmen 16S rDNA pada gel agarosa dianalisis secara numerik dengan menggunakan program CLAD97 (Rahardi, 2002) untuk mengonstruksi dendrogram.

Amplikon 16S rDNA disekuensing dan dianalisis menurut metode Bhattacharya *et al.*, (2003). Suspensi campuran pada reaksi PCR untuk sekuensing terdiri atas Bigdye V.3.1 sebanyak 4 µl, Buffer 4 µl, Primer 4 µl, dan DNA *template* 8 µl. Primer yang digunakan dalam reaksi PCR untuk sekuensing yaitu P0 (27f:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), P4A (651f: 5'-AAT TAC TGG GCG TAA AG-3'), P4 (651r: 5'-CTT TAC GCC CAG TAA TT-3'), P3B (765r: 5'CTG TTT GCT CCC CAC GCT TTC-3'), P5 (930f: 5'-AAG GAA TTG ACG

GGG GC-3'), dan P6(1495r: 5'-CTA CGG CTA CCTTGTAC GA-3'). Suspensi 16S rDNA hasil reaksi PCR sekuensing dipurifikasi dengan metode presipitasi etanol (Ausubel *et al.*, 1997).

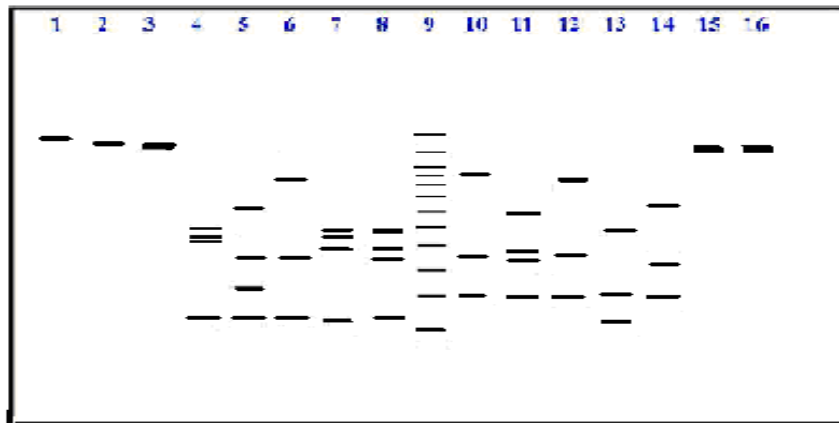
Amplikon 16S rDNA murni setiap strain disekuensing menggunakan *ABI 3130 Genetic Analyzer*. Sekuen DNA setiap strain dimasukkan ke program DNA Baser untuk menyambung dan mengoreksi setiap sekuen tersebut. Data sekuen 16S rDNA strain hasil isolasi dan strain acuan (Tabel 1) dilakukan *alignment* menggunakan program *CLUSTALX*. Pohon filogeni dikonstruksi dengan program *PHYLP* (*Phylogeny Inference Package*) berdasarkan algoritma *Neighbour-Joining* dan matriks jarak evolusi menurut model *Jukes* dan *Cantor* (Saitou dan Nei, 1987 *cit.* Kim *et al.*, 2000).

**Tabel 1.** Strain bakteri anggota Genus *Pseudomonas* untuk konstruksi pohon filogeni berdasarkan sekuen 16S rDNA.

No	Accession Number	Nama Spesies	Kode Strain
1	AF447394	<i>Pseudomonas putida</i>	DLL-E4
2	AF284764	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	phen8
3	AF321239	<i>Pseudomonas</i> sp.	PM-2001
4	AF068259	<i>Pseudomonas jessenii</i>	CIP105274 <sup>T</sup>
5	AF058286	<i>Pseudomonas mandelii</i>	CIP105273
6	AB108691	<i>Pseudomonas putida</i>	AN2
7	AF064458	<i>Pseudomonas monteilii</i>	CIP104883
8	AF072688	<i>Pseudomonas mosselii</i>	CIP105259
9	AB029257	<i>Pseudomonas putida</i>	IH-2000
10	AF094746	<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC17453
11	AB126621	<i>Pseudomonas japonica</i>	IAM15071 <sup>T</sup>
12	AF494092	<i>Burkholderia caryophylli</i>	YS13
13	AB060137	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	IAM1541 <sup>T</sup>
14	AB021397	<i>Pseudomonas asplenii</i>	ATCC23835 <sup>T</sup>
15	AY364537	<i>Pseudomonas lutea</i>	OK2 <sup>T</sup>
16	AB021381	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	MAFF301177 <sup>T</sup>
17	AY111150	<i>Pseudomonas graminis</i>	DSM11363 <sup>T</sup>
18	Z76666	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	LMG1225 <sup>T</sup>
19	AB030583	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	AL15-21
20	AF074383	<i>Pseudomonas migulae</i>	CIP105470
21	AY512614	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A1XB1-4
22	AF511433	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCCO8
23	AJ492828	<i>Pseudomonas congelans</i>	DSM14939 <sup>T</sup>
24	AJ492827	<i>Pseudomonas cannabina</i>	CFBP2341 <sup>T</sup>
25	AJ537603	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	CMS64 <sup>T</sup>
26	Z76665	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	DSM1045 <sup>T</sup>
27	D84006	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	IAM12411
28	AF267911	<i>Pseudomonas synxantha</i>	DSM13080
29	AY509898	<i>P. chlororaphis</i> ( <i>P. aureofaciens</i> )	DSM6698
30	AB021378	<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	JCM2400 <sup>T</sup>
31	AJ492830	<i>Pseudomonas fulgida</i>	DSM14938 <sup>T</sup>

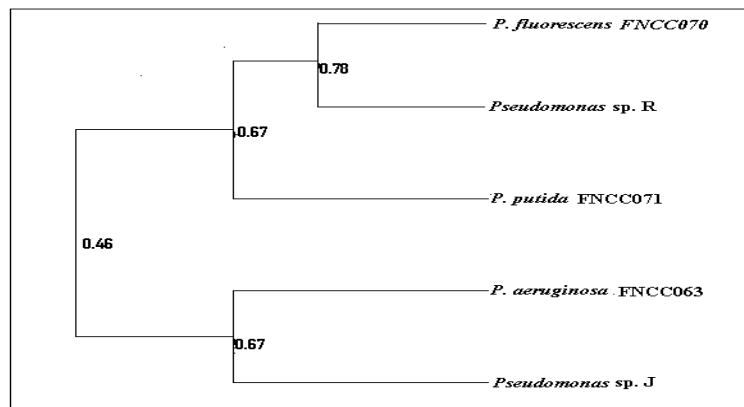
Tabel 1. (lanjutan)

No	Acession Number	Nama Spesies	Kode Strain
32	AF268968	<i>Pseudomonas brenneri</i>	CFML97-391 <sup>T</sup>
33	AF064461	<i>Pseudomonas cedrina</i> / <i>P. cedrella</i>	CFML96-198
34	Z76660	<i>Pseudomonas coronafaciens</i>	LMG13190 <sup>T</sup>
35	AF255337	<i>Pseudomonas reactans</i>	LMG5329
36	AF374472	<i>Pseudomonas costantinii</i>	CFBP5705 <sup>T</sup>
37	AB021398	<i>Pseudomonas cichorii</i>	ATCC10857 <sup>T</sup>
38	B021401	<i>Pseudomonas marginalis</i>	ATCC10844 <sup>T</sup>
39	AB021373	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	ATCC14235 <sup>T</sup>
40	AY486367	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AU4594
41	AF302795	<i>Pseudomonas indica</i>	IMT37
42	D84009	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM1603
43	S230263	<i>Pseudomonas</i> sp.	J
44	C230263	<i>Pseudomonas</i> sp.	R



**Gambar 1.** Diagram representatif profil fragmen 16S rDNA strain-strain bakteri hasil restriksi dengan enzim *RsaI* dan *HinI*.

Keterangan: 1, 2, 3, 15, dan 16 yaitu 16S rDNA utuh hasil PCR untuk strain R, J, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, dan *P. putida*. No. 4–8 adalah hasil restriksi 16S rDNA dengan *RsaI* untuk strain R, J, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, dan *P. putida*. No. 10–14 adalah hasil restriksi 16S rDNA dengan *HinI* untuk strain R, J, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, dan *P. putida*. No. 9 sebagai *MarkerDNA ladder* 100bp.



**Gambar 2.** Dendrogram yang menunjukkan hubungan antara lima strain anggota Genus *Pseudomonas* didasarkan atas analisis SS<sub>M</sub> dan algoritma UPGMA terhadap profil fragmen 16S rDNA hasil restriksi enzim *RsaI*.

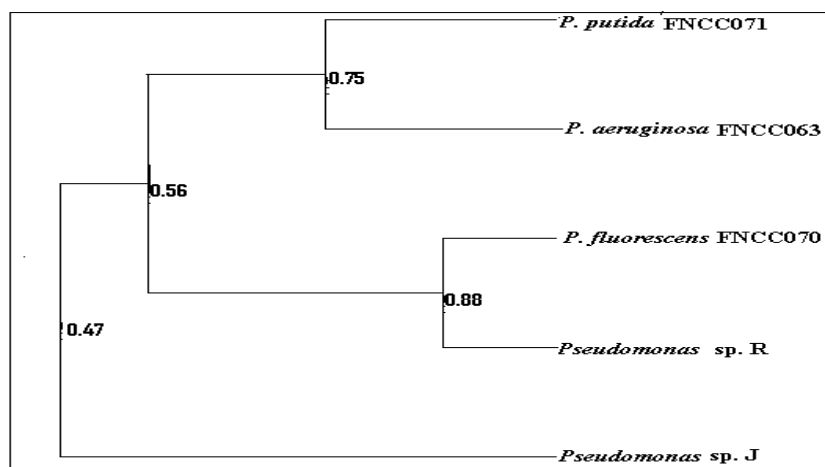
## Hasil dan Pembahasan

Sekuen 16S rDNA tiap-tiap strain bakteri yang dipotong dengan enzim restriksi *RsaI* atau *HinfI* disajikan dalam bentuk diagram representatif (Gambar 1). Hasil analisis secara numerik sekuen 16S rDNA yang dipotong dengan enzim restriksi *RsaI* (Gambar 2) menunjukkan *Pseudomonas* sp. R memiliki nilai similaritas paling tinggi sebesar 0,78 dengan *P. fluorescens* FNCC070, keduanya mempunyai fragmen 16S rDNA dengan jumlah pasangan basa 140, 420, dan 460 bp; tetapi tidak memiliki fragmen 220, 330, 590, dan 900 bp. *Pseudomonas* sp. R berbeda dengan *P. fluorescens* FNCC070 karena memiliki fragmen 16S rDNA 390 bp tetapi tidak memiliki 380 bp. *Pseudomonas* sp. J paling tinggi nilai similaritasnya sebesar 0,67 dengan *P. aeruginosa* FNCC063, keduanya memiliki fragmen 16S rDNA 140 dan 330 bp serta tidak memiliki fragmen-fragmen 380, 390, 420, dan 460 bp. Fragmen 16S rDNA yang membedakan kedua strain tersebut yaitu *Pseudomonas* sp. J memiliki fragmen 220 dan 590 bp tetapi tidak memiliki fragmen 900 bp, sedangkan *P. aeruginosa* FNCC063 memiliki ciri sebaliknya.

Hasil analisis secara numerik sekuen 16S rDNA yang dipotong dengan enzim restriksi *HinfI* (Gambar 3) menunjukkan *Pseudomonas*

sp. R juga memiliki nilai similaritas paling tinggi sebesar 0,88 dengan *P. fluorescens* FNCC070, keduanya memiliki fragmen 190, 340, dan 600 bp tetapi tidak memiliki fragmen 130, 460, 820, dan 970 bp. *P. fluorescens* FNCC070 memiliki fragmen 16S rDNA 300 bp tetapi *Pseudomonas* sp. R tidak memilikinya. *Pseudomonas* sp. J memiliki nilai similaritas terendah 0,47 terhadap strain bakteri lainnya.

Dalam penelitian ini digunakan enzim restriksi *RsaI* dan *HinfI* karena keduanya dapat menghasilkan fragmen-fragmen 16S rDNA yang dapat membedakan beberapa kelompok strain bakteri, sedangkan enzim *AluI* dan *MspI* hanya menghasilkan satu kelompok strain. Hasil *ARDRA* dengan enzim *RsaI* dan *HinfI* dalam penelitian ini menghasilkan pola fragmen 16S rDNA yang berbeda. Klasifikasi berdasarkan *ARDRA* ini memiliki korelasi positif dengan klasifikasi berdasarkan sidik jari protein, dan hasilnya lebih baik dan objektif dibandingkan dengan sistem klasifikasi fenotipik. Berdasarkan ketiga sistem klasifikasi tersebut menunjukkan bahwa kedua strain hasil isolasi merupakan spesies yang berbeda dari anggota *Genus Pseudomonas*. Menurut Spilker et al., (2004) amplifikasi gen 16S rDNA dengan *PCR* yang diikuti dengan *ARDRA/RFLP* dapat untuk mendeteksi dan diferensiasi strain atau spesies anggota *Genus Pseudomonas*.



**Gambar 3.** Dendrogram yang menunjukkan hubungan antara lima strain anggota *Genus Pseudomonas* didasarkan atas analisis *SS<sub>M</sub>* dan algoritma *UPGMA* terhadap profil fragmen 16S rDNA hasil restriksi enzim *HinfI*.

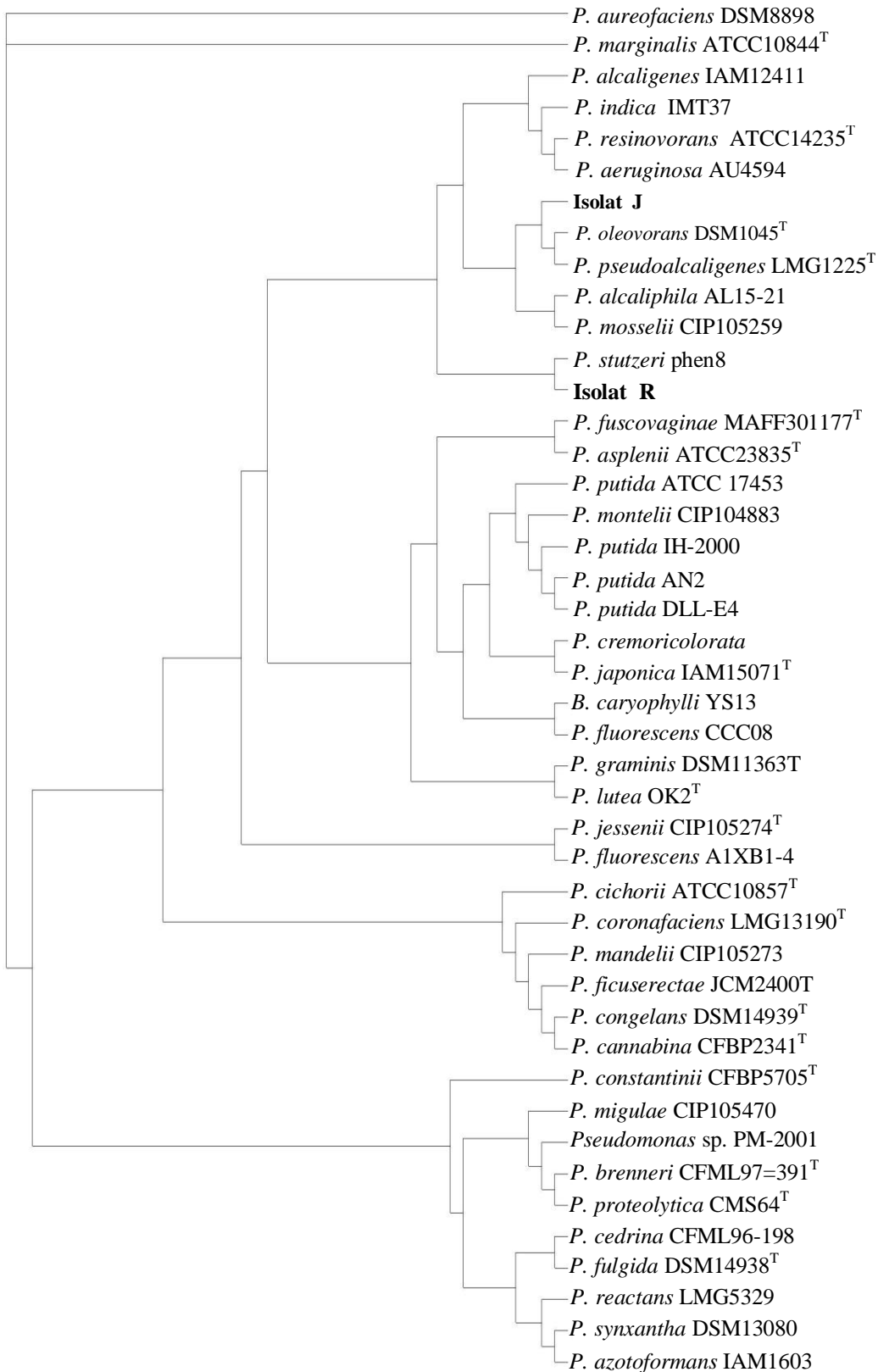
Berdasarkan *ARDRA* tersebut menunjukkan bahwa kedua strain hasil isolasi merupakan spesies yang berbeda dari anggota Genus *Pseudomonas*. Oleh karena itu dilakukan analisis berdasarkan pohon filogeni dari sekuen 16S rDNA. Sekuen 16S rDNA *Pseudomonas* sp. J memiliki panjang 1432 bp sedangkan untuk *Pseudomonas* sp. R panjangnya 1455 bp. Berdasarkan pohon filogeni (Gambar 4) dan similaritas sekuen 16S rDNA (Tabel 2) menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. J memiliki hubungan kekerabatan yang paling erat dengan kelompok bakteri *P. oleovorans* DSM1045<sup>T</sup> dan *P. pseudoalcaligenes* LMG 1225<sup>T</sup>, sedangkan *Pseudomonas* sp. R paling erat kekerabatannya dengan *P. stutzeri* phen 8. Strain bakteri *Pseudomonas* sp. J memiliki nilai similaritas sekuen 16S rDNA sebesar 97,62% terhadap *P. oleovorans* DSM1045<sup>T</sup>, yaitu sebanyak 32 nukleotida yang berbeda dari 1346 nukleotida yang dibandingkan. *Pseudomonas* sp. J tersebut memiliki nilai similaritas sekuen 16S rDNA sebesar 98,37% terhadap *P. pseudoalcaligenes* LMG1225<sup>T</sup>, yaitu ada 22 nukleotida yang berbeda dari 1349 nukleotida. Nilai similaritas sekuen 16S rDNA antara *Pseudomonas* sp. R dengan *P. stutzeri* phen8 sebesar 84,86%, yaitu ada 211 nukleotida yang berbeda dari 1394 nukleotida.

Menurut konsep spesies untuk bakteri berdasarkan nilai similaritas sekuen 16S rDNA dinyatakan bahwa spesies merupakan kumpulan strain-strain yang memiliki nilai similaritas lebih dari 97% (Stackebrandt, 1994 *cit.* Dijkshoorn *et al.*, 2000; Bossis *et al.*, 2000). Berdasarkan konsep tersebut *Pseudomonas* sp. J merupakan anggota *P. oleovorans* atau *P. pseudoalcaligenes*, tetapi berdasarkan nilai similaritasnya *Pseudomonas* sp. J lebih mirip dengan *P. pseudoalcaligenes* LMG1225<sup>T</sup> daripada dengan *P. oleovorans* DSM1045<sup>T</sup>. Bila dilihat bahwa *P. oleovorans* DSM1045<sup>T</sup> dan *P. pseudoalcaligenes* LMG1225<sup>T</sup> yang hanya memiliki 11 nukleotida yang berbeda merupakan spesies yang berbeda, berarti kedua isolat hasil isolasi merupakan spesies yang berbeda dari

kedua spesies anggota Genus *Pseudomonas* tersebut. Menurut Bossis *et al.*, (2000) dan Cladera *et al.*, (2004) bila dua strain atau lebih memiliki nilai similaritas sekuen 16S rDNA lebih dari 97%, untuk menentukan strain-strain tersebut sebagai strain yang sama atau berbeda harus dilakukan analisis hibridisasi DNA. Suatu strain berdasarkan hibridisasi DNA memiliki similaritas sekuen lebih dari 99% dan perbedaan suhu denaturasi DNA kurang dari lima derajat celsius.

Hasil analisis sekuen 16S rDNA tersebut menunjukkan *Pseudomonas* sp. J, *Pseudomonas* sp. R, *P. stutzeri*, *P. Alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. oleovorans*, dan *P. resinovorans* berada dalam satu grup dengan *P. aeruginosa*. Hasil ini sesuai dengan klastering berdasarkan sekuen 16S rRNA yang dilakukan oleh Anzai *et al.*, (2000) dan Yamamoto *et al.*, (2000). Strain-strain bakteri yang diuji termasuk anggota *Pseudomonas* grup I berdasarkan homologi sekuen RNA yaitu Genus *Pseudomonas* yang sebenarnya menurut Krieg dan Holt (1984).

Hasil identifikasi kedua bakteri yaitu *Pseudomonas* sp. J dan *Pseudomonas* sp. R berdasarkan *ARDRA* ternyata kurang akurat dibandingkan dengan berdasarkan sekuen 16S rDNA. Untuk identifikasi bakteri berdasarkan *ARDRA* diperlukan banyak strain acuan dalam genus yang sama dan hanya menunjukkan nilai similaritasnya. Oleh karena itu identifikasi kedua bakteri tersebut lebih valid hasilnya berdasarkan sekuen 16S rDNA yang dapat menunjukkan hubungan kekerabatan dan similaritasnya. Namun, diperlukan data sekuen 16S rDNA dari seluruh strain anggota genus tersebut untuk memastikan nama strain atau spesies isolat bakteri tersebut. Selain itu hasilnya perlu diverifikasi dengan sistem klasifikasi berdasarkan hibridisasi DNA dan sistem klasifikasi yang lain. Hal ini disebabkan sistem klasifikasi yang hanya berdasarkan satu jenis karakter saja tidak dapat digunakan untuk memasukkan atau memisahkan suatu strain ke dalam atau dari suatu spesies bakteri.



**Gambar 4.** Pohon filogeni yang dibuat berdasarkan algoritma Neighbour-joining (Saitou dan Nei, 1987) yang menunjukkan hubungan antara strain acuan dan isolat bakteri pendegradasi LAS atas dasar sekuen 16S rDNA.

**Tabel 2.** Nilai similaritas 16S rDNA (%) dan jumlah nukleotida yang berbeda antara strain acuan dan isolat bakteri pendeградasi LAS dalam kluster *P. Aeruginosa*.

Strain	D 84006	AF 302795	AB 021398	AY 486367	S 230263	Z 76665	Z 76666	AB 030583	AF 072688	AF 284764	C 230263
D 84006	---	63/1142	66/1439	39/1370	48/1364	45/1425	35/1429	39/1426	696/1363	49/1433	217/1393
AF 302795	95,63	---	63/1438	47/1371	68/1347	74/1426	64/1430	69/1427	699/1360	72/1418	227/1393
AB 021398	95,41	95,62	---	74/1369	65/1348	62/1425	52/1429	51/1426	694/1361	64/1419	216/1392
AY 486367	97,15	96,57	94,59	---	46/1330	51/1368	41/1372	46/1372	676/1322	42/1373	200/1360
S 230263	96,48	94,95	95,18	96,54	---	32/1346	22/1349	27/1349	667/1303	48/1368	204/1340
Z 76665	96,84	94,81	95,65	96,27	97,62	---	11/1428	15/1425	690/1357	42/1416	217/1391
Z 76666	97,55	95,52	96,36	97,01	98,37	99,23	---	6/1429	693/1361	33/1420	212/1395
AB 030583	97,27	95,16	96,42	96,65	98,0	98,95	99,58	---	691/1361	36/1420	212/1395
AF 072688	48,94	48,6	49,0	48,87	48,8	49,2	49,1	49,2	---	706/1366	712/1342
AF 284764	96,58	94,92	95,49	96,94	96,49	97,03	97,68	97,46	48,3	---	211/1394
C 230263	84,42	83,7	84,48	85,29	84,78	84,4	84,8	84,8	46,9	84,86	---

## Simpulan dan Saran

### Simpulan

Strain-strain *indigenus* pendeградasi LAS merupakan anggota Genus *Pseudomonas* endemik Indonesia. *Pseudomonas* sp. strain J berkerabat dekat dengan *P. pseudoalcaligenes* LMG 1225<sup>T</sup> dengan nilai similaritas sekuen 16S rDNA sebesar 98,37% sedangkan isolat R lebih berkerabat dekat dengan *P. stutzeri* phen8 dengan nilai similaritas 84,86%.

### Saran

Untuk memastikan nama spesies dan strain, maka sekuen 16S rDNA kedua isolat perlu diverifikasi similaritasnya dengan strain-strain anggota Spesies *P. pseudoalcaligenes* dan *P. stutzeri*.

## Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai dari dana program TPSDP dan DPP/SPP. Oleh karena itu, ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktur SPMU TPSDP dan Dekan FMIPA Universitas Brawijaya. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Bapak Dr. Wahyu Purbowasito yang membantu dalam sekuensing 16S rDNA.

## Daftar Pustaka

Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H. dan Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic Affiliation of the *Pseudomonads* Based on 16S rRNA Sequence. *IJSEM*, 50: 1563–1589.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. dan Struhl, K. 1997. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 1. John Wiley & Sons, Inc., USA.

Bhattacharya, D., Sarma, P.M., Krishnan, S., Mishra, S. dan Lal, B. 2003. Evaluation of Genetic Diversity among *Pseudomonas citronellolis* Strains Isolated from Oily Sludge-Contaminated Sites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (3): 1435–1441.

Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. dan Gordon, L. 2000. The Taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: Current Status and Need for Revision. *Agronomie*, 20: 51–63.

Campos-Garcia, J., Esteve, A., Vasquez, R., Ramos, J.L. dan Soberon, C.G. 1999. The Branched-Chain Dodecylbenzene Sulfonate Degradation Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D Involves a Novel Route for Degradation of the Surfactant Lateral Alkyl Chain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (8): 3730–3734.

Cho, J.C. dan Tiedje, J.M. 2000. Biogeography and Degree of Endemicity of Fluorescent *Pseudomonas* Strains in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (12): 5448–5456.

Cladera, A.M., Bennasar, A., Borcelo, M., Lalucat, J. dan Garcia-Valdes, E. 2004. Comparative Genetic Diversity of *Pseudomonas stutzeri* Genomovars, Clonal Structure, and Phylogeny of the Species. *J. Bacteriol.*, 186 (16): 5239–5248.

De Baere, T., De Mendonca, K., Claeys, G., Vershraegen, G., Mijs, W., Verhelst, R., Rottiers, S., Simaey, L.V., De Ganck, C. dan Vaneechaute, M. 2002. Evaluation of Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA) for the Identification of Cultured Mycobacteria in a Diagnosis Laboratory. *BioMed Central Microbiology*, 2 (4): 1–12.



- Di Battista-Leboeuf, C., Benizri, E., Corbel, G., Piutti, S. dan Guckert, A. 2003. Distribution of *Pseudomonas* sp. Populations in Relation to Maize Root Location and Growth Stage. *Agronomie*, 23: 441–446.
- Dinamarca, M.A., Aranda-Olmedo, I., Puyet, A. dan Rojo, F. 2003. Expression of the *Pseudomonas putida* OCT Plasmid Alkane Degradation Pathway is Modulated by Two Different Global Control Signals: Evidence from Continuous Cultures. *J. Bacteriol*, 185 (6): 4772–4778.
- Huang, H., Ellis, T.G. dan Kaiser, S.K. 2000. *Extant Biodegradation Testing with Linear Alkybenzene Sulfonate in Laboratory and Field Activated Sludge Systems*. WEFTEC, Water Environmental Federation.
- Jerabkova, H., Kralova, B. dan Nahlik, J. 1999. Biofilm of *Pseudomonas* C12B on Glass Support as Catalytic Agent for Continuous SDS Removal. *Int. Biodet. Biodeg*, 44: 233–241.
- Kahnert, A., Vermeij, P., Wietek, C., James, P., Leisinger, T. dan Kartesz, M.A. 2000. The *ssu* locus Plays a Key role in Organosulfur Metabolism in *Pseudomonas putida* S-313. *J. Bacteriol*, 182 (10): 2869–2878.
- Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Prapagde, B., Mikami, E. dan Nasu, M. 2001. Bacterial Community Composition and Activity in Urban Rivers in Thailand and Malaysia. *J. Health Sci.*, 47 (4): 353–361.
- Kim, S., Chun, J., Bae, K.J. dan Kim, Y. 2000. Polyphasic Assignment of an Aromatic-degrading *Pseudomonas* sp. Strain Dj.77 in the genus *Spingomonas* as *Spingomonas chungbukensis* sp., nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 50: 1641–1647.
- Krieg, N.R. dan Holt, J.G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. William & Wilkins, London.
- Lagace, L., Pitre, M., Jacques, M. dan Roy, D. 2004. Identification of the Bacteria of the Maple Sap by Using Amplified Ribosomal DNA (rDNA) Restriction Analysis and rDNA Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol*, 70 (4): 2052–2060.
- McCoy, M.M. 2000. *Determination of the Presence of the Catabolic Alkane Monooxygenase Gene from Soil Microorganisms Isolated from Coastal Sand Dunes*. Biological Sciences Department, College of Science and Mathematics, California Polytechnic State University, San Luis Obispo.
- Mitakda, B., Prayitno, Suharjono dan Retnaningdyah, C. 2000. Perancangan dan Pemodelan Usaha Peningkatan Kemampuan Purifikasi Sungai Brantas Hilir. *Natural*, 4 (2): 38–49.
- Rahardi, B. 2002. Pemrograman Aplikasi Konstruksi Kekerabatan Taksonomi dengan *Visual C++6.0*. *Skripsi*. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.
- Rangel-Castro, J.I., Leventers, J.J. dan Donell, E. 2002. Physiological and Genetic Characterization of Fluorescent *Pseudomonas* associated with *Cantharellus cibarius*. *Can. J. Microbiol*, 48: 739–748.
- Retnaningdyah, C., Samino, S., Suharjono, I., Doddy dan Prayitno. 1999. Uji Toksisitas Akut Surfaktan Deterjen LAS dan ABS terhadap Beberapa Gastropoda Sungai. *Natural*, 3 (2): 63–74.
- Schleheck, D., Wong, W., Denger, K., Heinzle, E. dan Cook, A.M. 2000. An  $\alpha$ -Proteobacterium Converts Linear Alkylbenzene Sulfonate Surfactants into Sulfophenyl Carboxylates and Linear Alkyldiphenylether disulfonate Surfactants into Sulfodiphenyl Ether Carboxylates. *Appl. Environ. Microbiol*, 66 (5): 1911–1916.
- Schleheck, D., Lechner, M., Schonemberger, R., Suter, M.J.F. dan Cook, A.M. 2003. Desulfonation and Degradation of the Disulfodiphenylethercarboxylates from Linear Alkyldiphenyletherdisulfonate Surfactant. *Appl. Environ. Microbiol*, 69 (2): 938–944.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Rossi, M.P. dan Di Prospero, P. 2002. Bacteria Associated with Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Decline Are of Two Groups: *Pseudomonas avellanae* and Strains Resembling *P. syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol*, 68 (2): 476–484.
- Smits, T.H.M., Balada, S.B., Witholt, B. dan Van Beilen, J.B. 2002. Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram Negative and Gram Positive Bacteria. *J. Bacteriol*, 184 (6): 1733–1742.
- Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P. dan Li Puma, J.J. 2004. PCR Base Assay for Differentiation of *P. aeruginosa* from other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol*, 42 (5): 2074–2079.
- Suharjono. 2008. Keanekaragaman dan Potensi *Pseudomonas* Strain *Indigenus* Pendegradasi Surfaktan Anionik di Ekosistem Sungai Tercemar Deterjen. *Disertasi*. Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Suharjono, Subagja, J., Sembiring, L., Retnaningdyah, C. dan Putra, I.K.J.W. 2007a. Pengaruh Penambahan Nitrogen dan Fosfor terhadap Potensi Strain-Strain Anggota *Pseudomonas* dalam Mendegradasi Liniar Alkibenzen Sulfonat. *Berkala Penelitian Hayati*, 12 (2): 107–114.

- Suharjono, Sembiring, L., Subagja, J., Ardyati, T. dan Lisdiana, L. 2007b. Sistematik Numerik Strain-Strain Anggota Genus *Pseudomonas* Pendeградasi Alkilbenzen Sulfonat Linier Berdasarkan Sifat Fenotip dan Protein Fingerprinting. *Biota*, 12 (1): 47–54.
- Van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Ranchini, A.G., Rothlisberger, M. dan Witholt, B. 2001. Analysis of *Pseudomonas putida* Alkane-Degradation Gene Clusters and Flanking Insertion Sequences: Evolution and Regulation of the *alk* Genes. *Microbiology*, 147: 1621–1630.
- Wackett, L. 2003. *Pseudomonas putida* a Versatile Biocatalyst. *Nat. Biotechnol.*, 21 (2): 136–138.
- Widmer, F., Seidler, R.J., Gillavet, P.M., Watrud, L.S. dan DiGiovanni, G.D. 1998. A Highly Selective PCR Protocol for Detecting 16S rRNA Genes of the Genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (7): 2545–2553.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. dan Harayama, S. 2000. Phylogeny of the Genus *Pseudomonas*: Intragenic Structure Reconstructed from the Nucleotide Sequences of *gyrB* and *rpoD* Genes. *Microbiology*, 146: 2385–2394.