

Analisis Fenotipe dan Kemotaksonomi Rhizobia yang Diisolasi dari *Aeschynomene* spp.

Phenotypic and Chemotaxonomic Analyses of Rhizobia Isolated from Aeschynomene spp.

EVI TRIANA

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jalan Ir. H. Juanda No. 18, Bogor 16002
Tel. +62-251-324006, Fax. +62-251-325854

Diterima 23 April 2003/Disetujui 12 September 2003

Eleven strains isolated from nodules of *Aeschynomene* spp. were subjected to phenotypic characterization such as biological, morphological, and physiological characters and chemotaxonomic study. The result showed that four bacterial groups were identified as: (i) Photosynthetic rhizobia which contains 3 isolates that produce photosynthetic pigments under light-dark cycle in aerobic condition and have 16:0, 18:0, and 18:1 as major fatty acid; (ii) non-photosynthetic Bradyrhizobia have 16:0 and 18:1 as major fatty acid; (iii) *Rhodopseudomonas palustris* group which consists of 3 isolates that grow and produce photosynthetic pigment anaerobically in the presence of light and have 16:0, 16:1, 18:0, and 18:1 as major fatty acid; and (iv) an isolate that produce photosynthetic pigment anaerobically in the presence of light and has 16:0, 16:1, and 18:1 as major fatty acid. These data suggest that the first group is photosynthetic rhizobia, the second group is non-photosynthetic rhizobia, the third and fourth group are anaerobic photosynthetic bacteria.

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 di 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. Unikanya, bakteri ini memiliki gabungan kedua karakter tersebut. Oleh karena itu, isolat-isolat dari *Aeschynomene* dikelompokkan terpisah dari kelompok *R. palustris* dan *B. japonicum*. Bakteri yang pertama kali ditemukan dalam kelompok ini ialah BTA11, 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 & So 1994).

Sejak ditemukan isolat BTA11 yang merupakan bakteri pengikat nitrogen fotosintetik adalah *Bradyrhizobium* (Young *et al.* 1991), banyak penelitian ditujukan pada keragaman isolat-isolat *Aeschynomene*. Ladha dan So (1994) melakukan analisis terhadap 150 karakter fenotipe dan menemukan bahwa 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 memperlihatkan bahwa keragaman di antara isolat *Aeschynomene* sangat besar (Willem *et al.* 2000). Tujuan penelitian ini ialah mengelompokkan 12 galur yang diisolasi dari *Aeschynomene* spp. berdasarkan pada karakter biologi, morfologi, dan analisis kemotaksonomi.

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-agar, dan 1000 ml akuades. Galur 99C dan 99D dibiakkan secara anaerob dengan mengisi tabung sampai penuh atau menggunakan kantong 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*, 3.0 g NaCl dalam 1000 ml akuades (Hamada 11 Feb 2000, komunikasi pribadi).

Tabel 1. Galur bakteri yang digunakan untuk analisis fenotipe dan kemotaksonomi

Galur	Media	Tumbuhan inang	Negara asal	Sumber
<i>Photorhizobium</i> IRBG2	Agar-agar TGY	<i>A. afraspera</i>	Filipina	IRRI
<i>Photorhizobium</i> IRBG228	Agar-agar TGY	<i>A. nilotica</i>	Filipina	IRRI
<i>Photorhizobium</i> 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>	Jepang	Plant Biotechnology Laboratory, Osaka University
Isolat HMD89	Agar-agar TGY	<i>A. indica</i>	Jepang	Plant Biotechnology Laboratory, Osaka University
Isolat 99C	Nutrien cair	<i>A. indica</i>	Jepang	Plant Biotechnology Laboratory, Osaka University
Isolat 99D	Nutrien cair	<i>A. indica</i>	Jepang	Plant Biotechnology Laboratory, Osaka University

IRRI: International Rice Research Institute; MAFF: Minister of Agriculture, Forestry, and Fisheries; TGY: Tryptone-Glucose-Yeast Extract

Morfologi dan Biologi. Karakter morfologi dan biologi yang diamati dalam penelitian ini ialah bentuk dan motilitas sel, suhu dan pH optimum, dan pembentukan pigmen fotosintetik. Bentuk dan motilitas sel diamati di bawah mikroskop medan terang. Suhu optimum diamati berdasarkan pada pertumbuhan bakteri pada suhu 28, 32, dan 37°C. Sedangkan pH optimum diamati dengan menumbuhkan bakteri pada media dengan pH 5, 6, 7, 8, dan 9 dengan menambahkan HCl 0.1 N atau NaOH 0.1 N. Pertumbuhan diamati setelah diinkubasi selama 3-10 hari pada suhu 28°C.

Pembentukan pigmen fotosintetik pada bradyrhizobia fotosintetik diamati dengan cara menumbuhkan biakan secara aerob selama 3-5 hari pada kondisi siklus terang gelap. Pigmen diekstraksi dengan campuran aseton:metanol (7:2) dalam kondisi gelap pada suhu 4°C, kemudian dianalisis dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 765-775 nm (Hougardy 2000). Galur-galur lain yang tidak membentuk pigmen fotosintetik pada kondisi tersebut, ditumbuhkan secara anaerob pada suhu 28°C selama 3-5 hari dengan pemberian cahaya terus-menerus. Pengamatan dilakukan setelah sel dipanen dan dilarutkan dalam larutan sukrosa 60%, pada panjang gelombang 860-880 nm (Eaglesham *et al.* 1990).

Fisiologi. Karakterisasi fisiologi sel yang dipelajari meliputi (i) penggunaan sumber karbon tunggal, yaitu sukrosa, glukosa, galaktosa, fruktosa, laktosa, maltosa, manitol, xylosa, ramnosa, trehalosa, arabinosa, dulcitol, inulin, salisin, sorbitol, sorbosa, melibiosa, selobiosa, sitrat, meso-eritritol, adonitol, melezitosa, suksinat, dan amonium tartrat; (ii) penggunaan sumber nitrogen, yaitu triptofan, leusina, fenilalanina, metionina, arginina, l-isoleusina, l-valina, asam aspartat, glisina, dan l-tirosina; (iii) kebutuhan vitamin B1, B5, B6, B12, C, biotin, asam folat, dan asam nikotinat sebagai faktor pertumbuhan (Xu *et al.* 1995).

Uji fisiologi dilakukan dengan menggunakan media basal White (1972) dengan komposisi 2.5 g manitol, 2.5 g NaNO₃, 1.0 g KH₂PO₄, 2.0 g K₂HPO₄, 0.3 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g CaCl₂, 0.1 g NaCl, 0.01 g FeCl₃, 2.5 ml campuran vitamin, dan akuades sampai mencapai volume total 1 liter. Campuran vitamin terdiri atas campuran A, B, dan C. Campuran A terdiri atas 20 µg biotin, 40 µg vitamin B12 dalam 100 ml akuades. Campuran B terdiri atas 10 mg tiamin-HCl, 10 mg asam nikotinat, 10 mg kalsium pantotenat, 10 mg p-asam amino-benzoat dalam 100 ml akuades. Campuran C terdiri atas 2.0 mg asam folat dalam 100 ml 0.001N NaOH. Uji kebutuhan sumber karbon dilakukan dengan menggantikan manitol

dengan sumber karbon yang diuji dengan konsentrasi total 0.1%. Demikian pula dengan uji kebutuhan nitrogen, NaNO₃ digantikan dengan sumber nitrogen yang akan diuji. Kebutuhan vitamin (0.025%) diuji menggunakan media basal yang dilengkapi dengan campuran semua jenis vitamin kecuali satu jenis vitamin yang akan diuji (White 1972). Pengamatan dilakukan setelah diinkubasi pada suhu 28°C selama 3-10 hari.

Analisis Kemotaksonomi. Analisis kemotaksonomi yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi analisis kuinon, asam lemak dan perbandingan basa G dan C untuk mendeterminasi kesamaan di antara galur-galur yang diuji.

Kandungan Kuinon. Kuinon diekstraksi dari 50-100 mg sel kering dengan 40 ml larutan kloroform-metanol (2:1), kemudian digoyang selama satu jam sampai satu malam. Filtrat dipekatkan dengan evaporator. Pelet yang diperoleh dilarutkan dengan 2-3 tetes aseton, kemudian dipaparkan pada lembaran *thin layer chromatography* (TLC) bersama standar ubikuinon dan menakuinon, menggunakan pelarut campuran heptana-dietileter dengan perbandingan 85:15 selama satu jam. Setelah kering, preparat diamati menggunakan sinar ultraviolet. Fragmen yang sesuai standar kemudian diisolasi dan diekstraksi dengan aseton, kemudian disaring dan filtratnya dipekatkan. Pelet yang diperoleh dilarutkan dengan 2-3 tetes asetonitril, kemudian dianalisis dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC) yang dilengkapi kolom Nakarai CI8, pada panjang gelombang 275 nm untuk mendeteksi ubikuinon dan 270 nm untuk menakuinon (Hougardy 2000).

Asam Lemak. Asam lemak seluler dianalisis menggunakan *gas-liquid chromatography-mass spectrometer* (GC-MS) terhadap turunan metil esternya yang disiapkan dari 10 mg sel kering yang direaksikan dengan 1 ml larutan HCl-metanol sehingga terjadi hidrolisis diferensial terhadap sel tersebut. Peranti GC dilengkapi dengan kolom DB-5 dan helium sebagai pembawa dengan kecepatan 40 cm/detik. Sebanyak 1 µl sampel diinjeksikan dan dipisah-pisahkan berdasarkan pada kenaikan suhu, mulai 80°C (dipaparkan selama 1 menit), kemudian naik 10°C/menit sampai 300°C. Spektrometer massa beroperasi dengan mode EI, suhu sumber 175°C dan suhu alur perpindahan (*transfer line temperature*) 275°C (Hougardy 2000).

Kandungan G+C. Analisis kandungan G+C dilakukan untuk mengetahui kandungan basa G dan C. Penyiapan DNA

dilakukan dengan mendenaturasi DNA pada suhu 100°C selama dua menit dan didinginkan seketika pada bongkahan es. DNA terlarut dicampur dengan 5 µl larutan nuklease P1 dan 25 µl bufer asetat, ditambah akuades steril hingga mencapai volume 75 µl. Sampel didiamkan selama dua jam pada suhu 37°C sebelum ditambahkan 2.5 µl bufer glisina hidroklorida 0.1 M dan 2 µl alkaline fosfatase. Campuran diinkubasi selama enam jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, kandungan G dan C diukur menggunakan HPLC yang dilengkapi dengan kolom Cosmosil 5CM18 (Nakarai tesk). Kondisi operasional HPLC menggunakan volume injeksi 5 µl untuk standar dan 10 µl untuk sampel dengan kecepatan aliran 1 ml/menit pada panjang gelombang 270 nm dan suhu oven 40°C. Kandungan G+C DNA tiap galur dihitung menggunakan persamaan De Ley.

HASIL

Biologi dan Morfologi. Semua galur berbentuk batang dan dapat bergerak; galur IRBG, HMD, dan 99 berwarna karena mengandung pigmen fotosintetik, sedangkan galur MAFF berwarna putih dan tidak menghasilkan pigmen fotosintetik. Umumnya semua galur tumbuh optimum pada pH 7 dan suhu 28°C (Tabel 2).

Fisiologi. Semua galur IRBG menunjukkan karakter yang hampir identik. Galur-galur MAFF memiliki karakter yang berbeda satu dengan yang lain, yaitu pada penggunaan melibiosa, selobiosa, triptofan, leusina, isoleusina, valina, tirosina, dan kebutuhan vitamin. Galur-galur HMD memiliki karakter yang identik satu dengan yang lain, tetapi berbeda dengan galur 99, sedangkan galur 99C memiliki karakter yang berbeda dengan galur 99D (Tabel 3).

Kemotaksonomi. Secara kemotaksonomi, semua galur memiliki ubiquinon 10 sebagai komponen yang dominan.

Asam lemak utama pada galur IRBG ialah 16:0, 18:0, dan 18:1; galur-galur MAFF ialah 16:0 dan 18:1; galur HMD88, HMD89, dan 99D ialah 16:0, 16:1, 18:0, dan 18:1; sedangkan galur 99C ialah 16:0, 16:1, dan 18:1. Komposisi basa dari galur 99D, HMD88, dan HMD89 secara berurutan ialah 65.8, 65.5, dan 65.9 (Tabel 4).

PEMBAHASAN

Biologi dan Morfologi. Galur yang diisolasi dari *Aeschynomene* memiliki karakter morfologi dan biologi yang sama (Tabel 2). Karakter batang dan montil merupakan sifat umum yang terdapat pada anggota kelompok α -proteobacteria. Selain itu, semua galur tumbuh optimal pada pH 7 dan suhu 28°C.

Ketiga galur IRBG yang diisolasi dari bintil batang *Aeschynomene*, IRBG2, IRBG228, dan IRBG230, tumbuh secara aerob dan memiliki koloni berwarna putih sampai merah jambu karena menghasilkan pigmen fotosintetik. Pada galur tersebut, pigmen dihasilkan di bawah siklus terang-gelap (12:12). Di bawah cahaya terus-menerus, bakteri ini tidak memproduksi pigmen. Karakter ini berbeda dengan karakter bakteri anaerob fotosintetik yang tumbuh pada kondisi anaerob dan menghasilkan pigmen dengan keberadaan cahaya terus-menerus. Analisis spektrofotometer dari pigmen yang telah diekstraksi memperlihatkan sebuah pita pada panjang gelombang 770 nm yang merupakan karakteristik bakterioklorofil a (Hougardy 2000). Kedua karakter tersebut dimiliki oleh galur referensi BTa11 yang merupakan anggota dari kelompok rhizobia fotosintetik dan membedakan ketiga galur ini dengan galur yang lain.

Galur MAFF210127, MAFF210316, MAFF210318, dan MAFF210408 memiliki karakter morfologi yang sama (Tabel 2). Galur tersebut dapat dibedakan dari galur-galur IRBG

Tabel 2. Analisis morfologi dan biologi galur rhizobia dari *Aeschynomene* spp.

Karakter	IRBG 2	IRBG 228	IRBG 230	BTa11*	MAFF 210172	MAFF 210316	MAFF 210318	MAFF 210408	HMD 88	HMD 89	99 D	99 C
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang
Motilitas	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil
Warna koloni pada agar-agar TGY	Pink	Jingga	Putih	Putih-pink	Putih	Putih	Putih	Putih	Merah	Merah	Merah	Kuning
Pigmen fotosintetik	kl a	kl a	kl a	kl a	Ta	Ta	Ta	Ta	kl a	kl a	kl a	kl a
Absorpsi maksimal (nm)	769a	769a	773a	770					863.0, 805b	863.0, 805b	863.0, 804b	863.0, 804b
Produksi pigmen												
Aerob	p	p	p	p					-	-	-	-
Anaerob	-p	-p	-p	-p					+	+	+	+
Siklus terang-gelap	p	p	p	p					Td	Td	Td	Td
Cahaya sinambung	-p	-p	-p	-p					+	+	+	+
Gelap sinambung	-p	-p	-p	-p					-	-	-	-
pH optimum	7	7	7	6-7	7	7	7	7	6-8	6-8	6	6
pH 5	+	+	+	Td	+	-	-	+	+	+	-	-
pH 6	++	++	++	Td	++	+	+	+	++	++	+++	+++
pH 7	+++	+++	+++	Td	+++	++	++	++	++	++	++	++
pH 8	-	-	-	Td	+	-	-	-	++	++	+	+
pH 9	-	-	-	Td	-	-	-	-	+	+	-	-
Suhu pertumbuhan												
28°C	+++	+++	+++	Td	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+
32°C	+++	+++	+++	Td	++	++	++	++	++	++	+	+
37°C	+++	+++	+++	Td	+	+	+	+	++	++	+	+

*Fleischman dan Kramer (1998), a: ekstrak pigmen, b: pigmen dalam sel utuh, -: tidak ada pertumbuhan, +: pertumbuhan rendah, ++: pertumbuhan sedang, +++: pertumbuhan tinggi, p: ada pigmen, -p: tidak ada pigmen, kl a: klorofil a, Ta: tidak ada kl a, Td: tidak ada data

Tabel 3. Analisis fisiologi galur rhizobia dari *Aeschynomene* spp.

Karakteristik	IRBG 2	IRBG 228	IRBG 230	BTAii*	MAFF 210172	MAFF 210316	MAFF 210318	MAFF 210408	HMD 88	HMD 89	99 D	99 C
Sukrosa	+	+	+	Td	-	-	-	-	+	+	+	+
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Galaktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fruktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Manitol	+	+	+	Td	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Trehalosa	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Dulkitol	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Inulin	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Salisin	+	+	+	Td	-	-	-	-	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	Td	-	-	-	-	+	+	-	+
Sorbosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Melibiosa	+	+	+	Td	+	+	+	-	+	+	+	+
Selobiosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Sitrat	+	+	+	Td	-	-	-	-	+	+	-	+
Meso-eritritol	-	+/-	+l	Td	-	-	-	-	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Melezitosa	-	-	+/-	Td	-	-	-	-	+	+	-	+
Suksinat	+	+	+	Td	+	+	+	+	+	+	-	+
Laktosa	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Amonium tartrat	+	+	+	Td	-	-	-	+	+	+	-	+
Triptofan	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Leusina	+	+	+	Td	-	+	+	-	-	-	-	+
Fenilalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Metionina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
L-Isoleusina	+	+	+	Td	+	+	+	-	-	-	-	-
L-Valina	+	+	+	Td	+	+	+	-	-	-	-	+
Asam aspartat	+	+	+	Td	+	+	+	+	+	+	+	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-Tirosina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Kebutuhan vitamin	-	-	-	Td	-	-	-	B1,B5, B6, B12, C, asam folat, asam nikotinat	asam nikotinat	asam nikotinat	B1, B5, B6, B12, C, biotin, asam folat asam nikotinat	tidak ada

*Fleischman dan Kramer (1998), Td: tidak ada data, +: tumbuh subur, -: tidak tumbuh, +/-: pertumbuhan sangat lemah, +l: pertumbuhan lemah

Tabel 4. Analisis karakter kemotaksonomi rhizobia dari *Aeschynomene* spp.

Galur	Kuinin	Asam lemak utama (%)					mol G+C (%)
		16:0	16:1	18:0	18:1	Lainnya	
IRBG 2	10	16.4		9.4	70.5	3.7	
IRBG 228	10	11.7		1.1	32.9	54.3	
IRBG 230	10	19.3		19.0	56.8	4.9	
MAFF 210172	10	15.0			79.9	5.1	
MAFF 210316	10	15.7			73.6	10.7	
MAFF 210318	10	13.9			80.6	5.5	
MAFF 210408	10	12.5			70.2	17.3	
HMD 88	10	16.3	3.9	25.4	50.9	3.5	65.5
HMD 89	10	17.1	4.0	21.5	53.0	4.4	65.9
99 D	10	24.7	4.9	9.1	60.2	1.1	65.8
99 C	10	26.2	37.5		33.1	3.2	

fotosintetik. Tekstur koloni yang kaya akan polisakarida (tekstur "gummy") bila ditumbuhkan pada media YMA (data tidak disertakan) memperkuat dugaan bahwa galur MAFF merupakan kelompok *Bradyrhizobium* nonfotosintetik.

Karakter morfologi dan biologi galur HMD88, HMD89, 99C, dan 99D hampir serupa. Perbedaan kecil karakter morfologi yang membedakan galur 99C dengan galur yang lain ialah warna koloni cokelat kekuningan, sementara galur lain berwarna cokelat kemerahan. Perbedaan ini mungkin menunjukkan adanya perbedaan jenis pigmen yang dihasilkan selain bakterioklorofil a. Untuk memastikan hal tersebut perlu dilakukan analisis terhadap kandungan seluruh pigmen yang dihasilkan. Karakter biologi yang paling penting dari keempat galur tersebut ialah dihasilkannya pigmen fotosintetik di bawah kondisi anaerob dengan adanya cahaya terus-menerus. Sifat ini serupa dengan sifat bakteri anaerob fotosintetik. Absorbansi dari bakterioklorofil a yang dideteksi secara *in vivo* ialah sekitar 870 nm, yang juga serupa dengan panjang gelombang dari bakteri ungu fotosintetik yang mengandung bchl a (Eaglesham *et al.* 1990). Selain itu, HMD 88 dan HMD 89 memiliki sifat anaerob

berdasarkan pada warna koloninya yang putih, baik yang ditumbuhkan di bawah cahaya secara terus-menerus maupun siklus terang-gelap, sehingga diduga galur tersebut tidak menghasilkan pigmen fotosintetik. Dugaan ini diperkuat oleh hasil ekstraksi pigmen maupun pengujian pigmen secara *in vivo* yang menunjukkan tidak diproduksinya pigmen

fakultatif karena juga dapat tumbuh di bawah kondisi aerob. Karakter morfologi dan biologi galur tersebut dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan pada karakter tersebut, keempat galur ini diduga memiliki hubungan yang lebih dekat dengan kelompok bakteri anaerob fotosintetik, termasuk *R. palustris*.

Berdasarkan pada persamaan dan perbedaan karakter morfologi dan biologinya, semua galur yang digunakan dalam penelitian ini dibedakan dalam tiga kelompok: (i) kelompok rhizobia fotosintetik, terdiri atas IRBG2, IRBG228, dan IRBG 230; (ii) kelompok rhizobia nonfotosintetik, terdiri atas MAFF210172, MAFF210316, MAFF210318, dan MAFF210408; (iii) dan (iv) kelompok bakteri anaerob fotosintetik, terdiri atas HMD88, HMD89, 99C, dan 99D.

Fisiologi. Dari 40 sumber karbon dan nitrogen yang diuji, kelompok rhizobia fotosintetik memiliki karakter fisiologi yang hampir identik satu dengan yang lain, termasuk karakter negatif, yaitu penggunaan arginina dan lisina serta kebutuhan vitamin. Perbedaan yang ada hanya pada kualitas pertumbuhannya, yaitu pada penggunaan trehalosa, meso-eritritol, dan melezitose, ada yang pertumbuhannya sangat lemah dan ada yang sangat subur (Tabel 3). Banyaknya karakter yang identik dari galur anggota kelompok ini menunjukkan adanya kemungkinan bahwa mereka merupakan anggota satu kelompok yang berbeda dari kelompok *Bradyrhizobium* sebagaimana yang ditunjukkan oleh galur-galur MAFF, dan berbeda dari kelompok *R. palustris* yang ditunjukkan oleh galur-galur HMD dan 99 sehingga nama genus pantas diberikan untuk kelompok ini.

Anggota kelompok *Bradyrhizobium* nonfotosintetik, antara satu dengan yang lain, memiliki banyak karakter fisiologi yang berbeda (Tabel 5). Hal tersebut mungkin disebabkan oleh keragaman galur-galur bradyrhizobia yang sangat tinggi, sehingga diduga setiap galur MAFF memiliki hubungan yang lebih dekat dengan galur-galur *Bradyrhizobium* yang berbeda daripada di antara galur-galur MAFF sendiri. Untuk itu perlu dilakukan analisis 16S DNA yang dapat memberi informasi yang lebih rinci dan tepat tentang hubungan kekerabatan antar galur dan dengan galur *Bradyrhizobium* yang telah ada dalam kelompok bradyrhizobia nonfotosintetik.

Dalam kelompok ini, MAFF210316 dan MAFF210318 memiliki karakter fisiologi yang hampir identik. Kedua galur ini berbeda dengan MAFF210172 berdasarkan pada penggunaan selobiosa, triptofan dan leusina. Di lain pihak, galur-galur tersebut berbeda dengan MAFF210408 berdasarkan pada penggunaan melibiosa, triptofan, leusina, isoleusina, dan tirosina. Semua galur tidak membutuhkan vitamin sebagai faktor pertumbuhan, kecuali MAFF210408, yang membutuhkan vitamin B1, B5, B6, B12, C, asam folat, dan asam nikotinat.

Dalam kelompok bakteri anaerob fotosintetik, terdapat banyak karakter yang berbeda dalam penggunaan sumber karbon dan nitrogen dan kebutuhan vitamin. Galur HMD88 dan HMD 89 memiliki karakter fisiologi yang sama, sehingga diduga keduanya merupakan spesies yang sama (Tabel 3). Selanjutnya galur HMD mungkin merupakan spesies yang berbeda dengan galur 99D karena galur 99D memiliki banyak karakter fisiologi yang berbeda dengan galur HMD88 dan HMD89 (Tabel 6). Sementara itu, setengah dari hasil uji penggunaan karbon dan nitrogen serta kebutuhan vitamin pada galur 99D dan 99C

menunjukkan perbedaan (Tabel 3) sehingga untuk sementara diduga keduanya juga merupakan spesies yang berbeda. Berdasarkan pada perbedaan dan persamaan karakter fisiologi ini, kelompok bakteri anaerob fotosintetik diduga terdiri atas tiga spesies yang berbeda. Untuk mendeterminasi galur-galur ini pada tingkat spesies sangat sulit jika hanya mengacu pada karakter-karakter tersebut karena dalam uji karakterisasi ini galur referensi tidak diikutsertakan. Oleh karena itu, analisis 16S DNA dan hibridisasi DNA sangat diperlukan.

Analisis Kemotaksonomi. Hasil uji karakterisasi fisiologi tidak secara pasti membagi semua galur dalam kelompok yang berbeda. Untuk itu perlu dilakukan analisis kemotaksonomi yang meliputi analisis kuinon, asam lemak dan kandungan G+C (Tabel 4).

Berdasarkan pada hasil analisis senyawa isoprenoid kuinon pada semua galur, terdapat indikasi bahwa komponen yang dominan ialah ubikuinon 10. Karakter ini umum terdapat pada organisme yang termasuk dalam α proteobakteri (Young *et al.* 1991) yang diwakili oleh *Rhizobium* sp. Hasil ini memperkuat hasil analisis biologi dan morfologi, yang menempatkan semua galur dalam kelompok α proteobakteri. Pengelompokan ini masih bersifat sangat umum karena hanya

Tabel 5. Karakter fisiologi pembeda empat galur *Bradyrhizobium* nonfotosintetik (MAFF)

Karakteristik	MAFF 210172	MAFF 210316	MAFF 210318	MAFF 210408
Melibiosa	+	+	+	-
Selobiosa	-	+	+	+
Triptofan	-	+	+	-
Leusina	-	+	+	-
Isoleusina	+	+	+	-
Valina	+	+	+	-
Tirosina	+	+	+	-
Kebutuhan vitamin	-	-	-	biotin, B1, B5, B12, C, asam nikotinat, asam folat

+: ada pertumbuhan, -: tidak ada pertumbuhan

Tabel 6. Karakter fisiologi pembeda galur HMD dan 99D

Karakteristik	HMD 88	HMD 89	99 D
Glukosa	+	+	-
Fruktosa	+	+	-
Ramnosa	+	+	-
Arabinosa	+	+	-
Inulin	+	+	-
Sorbitol	+	+	-
Sorbosa	+	+	-
Selobiosa	+	+	-
Sitrat	+	+	-
Melezitosa	+	+	-
Suksinat	+	+	-
Laktosa	+	+	-
Maltosa	+	+	-
Amonium tartrat	+	+	-
Fenilalanina	+	+	-
Metionina	+	+	-
Tirosina	+	+	-
Kebutuhan vitamin	asam nikotinat	asam nikotinat	B1, B5, B6, B12, C, biotin, asam folat, asam nikotinat

+: ada pertumbuhan, -: tidak ada pertumbuhan

dapat mengelompokkan galur tersebut dalam satu kelas. Untuk pengelompokan yang lebih spesifik perlu dilakukan analisis kemotaksonomi yang lain.

Pada beberapa penelitian terdahulu, terbukti bahwa komposisi asam lemak dapat digunakan sebagai alat bantu determinasi posisi taksonomi suatu bakteri. Hasil analisis asam lemak pada penelitian ini menunjukkan bahwa asam lemak dominan pada galur yang merupakan anggota rhizobia fotosintetik ialah 16:0, 18:0, dan 18:1. Anggota kelompok bradyrhizobia nonfotosintetik memiliki 16:0 dan 18:1 sebagai asam lemak utamanya. Tiga galur yang merupakan anggota kelompok bakteri anaerob fotosintetik, yaitu HMD88, HMD 89, dan 99D memiliki 16:0, 16:1, 18:0, dan 18:1 sebagai asam lemak utama, sedangkan 99C memiliki 16:0, 16:1, dan 18:1.

Berdasarkan pada hasil tersebut, galur IRBG dikelompokkan terpisah dari galur-galur MAFF, HMD, dan 99, galur MAFF terpisah dari HMD dan 99, galur HMD berbeda dari 99C dan 99D, dan 99C berbeda dari 99D. Pengelompokan ini sesuai dengan pengelompokan berdasarkan pada analisis karakter biologi dan morfologi.

Walaupun dari hasil uji karakterisasi fisiologi terlihat bahwa galur 99D memiliki banyak perbedaan dengan galur HMD, namun pola asam lemak menunjukkan bahwa galur tersebut merupakan anggota satu kelompok yang sama karena memiliki pola yang sama. Asumsi tersebut timbul karena pola asam lemak diyakini sebagai salah satu alat identifikasi yang sangat akurat. Untuk lebih meyakinkan bahwa 99D adalah anggota kelompok yang sama dengan HMD88 dan HMD89, dilakukan analisis kandungan G+C.

Komposisi basa DNA (kandungan G+C) dari 99D, HMD88, dan HMD89 yang merupakan anggota kelompok *R. palustris*, berturut-turut ialah 65.8, 65.5, dan 65.9. Nilai ini berada dalam kisaran komposisi basa DNA dari *R. palustris* (64.8-66.3). Oleh karena itu, galur 99D, HMD88, dan HMD89 dapat dikatakan adalah anggota kelompok *R. palustris*.

Analisis karakter fenotipe yang meliputi karakter morfologi, biologi dan fisiologi, serta analisis kemotaksonomi terhadap 11 galur yang diisolasi dari nodul *Aeschynomene* menunjukkan bahwa semua galur tersebut dapat dibedakan dalam 4 kelompok, yaitu (i) rhizobia fotosintetik, terdiri atas 3 galur yang menghasilkan pigmen fotosintetik pada kondisi aerob dan siklus terang-gelap dan memiliki 16:0, 18:0, dan

18:1 sebagai asam lemak utama; (ii) bradyrhizobia non-fotosintetik terdiri atas 4 galur yang tidak menghasilkan pigmen fotosintetik dan memiliki 16:0 dan 18:1 sebagai asam lemak utama; (iii) kelompok *R. palustris*, terdiri atas 3 isolat yang menghasilkan pigmen fotosintetik pada kondisi anaerob dan membutuhkan cahaya terus-menerus serta memiliki asam lemak utama 16:0, 16:1, 18:0, dan 18:1; dan (iv) satu isolat bakteri fotosintetik anaerob yang menghasilkan pigmen fotosintetik pada kondisi anaerob dan membutuhkan cahaya terus menerus serta memiliki asam lemak utama 16:0, 16:1, dan 18:1.

DAFTAR PUSTAKA

- Eaglesham ARJ, Ellis JM, Evans WR, Fleischman DE, Hungria M, Hardy RWF. 1990. The first photosynthetic N_2 -fixing *Rhizobium*: Characteristics. Di dalam: Gresshoff R, Stacey N (ed). *Nitrogen Fixation: Achievement and Objectives*. New York: Chapman and Hall. hlm 805-812.
- Fleischman D, Kramer D. 1998. Photosynthetic rhizobia [Review]. *Biochem Biophys Acta* 1364:17-36.
- Hougardy A. 2000. *Rhodospseudomonas rhenobacensis* sp. nov., a new nitrate reducing purple non sulfur bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:985-992.
- Ladha JK, Pareek RP, So R, Becker M. 1990. Stem nodule symbiosis and its unusual properties. Di dalam: Gresshoff R, Stacey N (ed). *Nitrogen fixation: Achievement and Objectives*. New York: Chapman and Hall. hlm 633-640.
- Ladha JK, So R. 1994. Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *Int J Syst Bacteriol* 44:62-73.
- Molouba F, Lorquin J, Willems A, Hoste B, Giroud E, Dreyfus B, Gillis M, de Lajudie P, Masson-Brivin C. 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl Environ Microbiol* 65:3084-3094.
- van Berkum P, Tully RE, Keister DL. 1995. Non-pigmented and bacteriochlorophyll-containing bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* 61:623-629.
- White LO. 1972. The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other *Agrobacterium*. *J Gen Microbiol* 72:565-576.
- Willem A, Doignon-Bourcier F, Coopman R, de Lajudie BHP, Gillis M. 2000. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strain isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. *Syst Appl Microbiol* 23:137-147.
- Xu LM, Ge C, Li J, Fan H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from root nodules of soybean. *Int J Syst Bacteriol* 45:706-711.
- Young JPW, Downer HL, Eardly BD. 1991. Phylogenetic of phototrophic *Rhizobium* strain BTAil by Polymerase Chain Reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J Bacteriol* 172:2271-2277.