The Relationships Of Rhizobia Based On *nifD* Gene Similarity For Potency Analysis As Biofertilizer

Hubungan Kekerabatan Rhizobia Berdasarkan Similaritas Gen *nifD* Untuk Analisis Potensinya Sebagai Pupuk Hayati

Janne Hillary

Universitas Gadjah Mada
Jalan Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia
Hillaryjanne@gmail.com

Abstrak: Biological fertilizer is an inoculant contained active living organisms, with function in facilitating the availability of nutrients in the soil for plants. Rhizobia are one type of microbes that used as biological fertilizer, which is able to fixed nitrogen in association with the presence of nitrogenase enzyme. This enzymes consists of dinitrogenase components encoded by one gene *nifD*. *NifD* genes are often used as a marker of a microorganism that can be fixed nitrogen. This research aims were to study the kinship between Rhizobia and its potential as a biological fertilizer based on the similaritas *nifD* gene using bioinformatics from molecular gene bank DDBJ (DNA Data Bank of Japan). BioEdit software used for alignment, calculation of the index similaritas, and construction of phylogenetic trees based on complex algorithms of phylogeny Neighbour-Joining. There are nine species examined, namely *Burkholderia vietnamiensis* G. (1995), *Sinorhizobium medicae* R. (1996), *S. meliloti* L. (1994), *Mesorhizobium ciceri* J. (1997), *M. huakuii* J. (1997), *M. plurifarium* L. (1998), *M. septentrionale* G. (2004), *M. temperatum*, G. (2004), and *Bradyrhizobium japonicum* J. (1982). Rhizobia species in one genus has higher similaritas value in *nifD* gene compared with species from different genera. The higher the value of the *nifD* gene between similaritas species of Rhizobia, the higher the kinship. The higher the level of *nifD* genes similarities, the more similarities of enzyme nitrogenase. The results of the tree phylogeny analysis indicates that Rhizobia are classified into three groups, namely the fast-growing Rhizobia, meso growing Rhizobia and slow-growing Rhizobia. Fast-growing Rhizobia potential as biological fertiliser. Slow-growing Rhizobia can be combined with fast-growing Rhizobia as biological fertilizer on acidic soils.

Keywords: biological fertilizer, Rhizobia, *nifD* Genes, bioinformatics

I. PENDAHULUAN

Pupuk hayati merupakan alternatif dari pupuk kimia yang berfungsi untuk menambah kesuburan tanah dan produktivitas tanaman. Pupuk hayati tersusun atas mikrobia tanah yang dapat menyediakan hara dalam tanah, sehingga dapat tersedia bagi tanaman (Wu *et al.*, 2005).

Rhizobia merupakan salah satu jenis mikrobia yang dimanfaatkan sebagai pupuk hayati karena mampu memfiksasi nitrogen. Kemampuan tersebut terkait dengan keberadaan enzim nitrogenase (Simanungkalit *dkk.*, 2006; Campbell *et al.*, 2003). Enzim ini terdiri atas dua komponen protein yang terpisah yang disebut dinitrogenase dan

dinitrogenase reduktase (Rosmarkam dan Yuwono, 2002). Komponen dinitrogenase merupakan heterodimer yang dikode oleh gen *nifD* dan *nifK*. Gen *nifD* sering digunakan sebagai penanda suatu mikroorganisme yang dapat memfiksasi nitrogen. Similaritas gen *nifD* tersebut digunakan sebagai dasar identifikasi (Mulligan and Haselkorn, 1989).

Bioinformatika adalah ilmu yang mempelajari penerapan sistem komputansi untuk mengelola dan menganalisis informasi hayati. Bidang ini mencakup penerapan metode matematika, statistika, dan informatika untuk memecahkan berbagai masalah biologi, terutama yang terkait dengan penggunaan sekuens DNA dan asam amino. Gen *nifD*, yang berupa data biologi molekuler, dapat dianalisis

dengan memanfaatkan aplikasi bioinformatika, untuk menganalisis tingkat similaritas gen *nifD* pada Rhizobia, sehingga dapat diketahui pula potensinya sebagai pupuk hayati. Informasi tersebut bermanfaat untuk mendukung pemanfaatan Rhizobia sebagai penambat nitrogen di lahan pertanian.

2. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) untuk mengumpulkan database nukleotida gen *nifD* Rhizobia. Aplikasi lain yang digunakan yaitu bio-edit untuk *alignment*, perhitungan indeks similaritas, dan konstruksi pohon filogeni berdasarkan algoritma filogenetik *Neighbour-Joining*.

Terdapat sembilan spesies yang diteliti, yaitu *Burkholderia vietnamiensis* G. (1995), *Sinorhizobium medicae* R. (1996), *S. meliloti* L. (1994), *Mesorhizobium ciceri* J. (1997), *M. huakuii* J. (1997), *M. plurifarium* L.(1998), *M. septentrionale* G. (2004), *M. temperatum* G. (2004), dan *Bradyrhizobium japonicum* J. (1982).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan analisis filogeni yang telah dilakukan, diketahui bahwa spesies dalam satu genus memiliki nilai similaritas gen *nifD* yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan spesies yang berasal dari genus yang berbeda. Beberapa spesies yang memiliki nilai similaritas tinggi yaitu antara spesies *Mesorhizobium septentrionale* G. dan *M. temperatum* G. (97 %) dan antara *Sinorhizobium medicae* R. dan *S. meliloti* L (97%).

Tingkat similaritas gen *nifD* yang tinggi menunjukkan bahwa kekerabatan antara spesies-spesies yang dibandingkan semakin dekat. Semakin tinggi tingkat similaritas gen, maka enzim nitrogenase yang akan dihasilkan juga semakin mirip.

Gambar 1. Matriks similaritas pada anggota Rhizobia:
(A) *Bradyrhizobium japonicum* J.,

(B) *Burkholderia vietnamiensis* G., (C) *Mesorhizobium ciceri* J., (D) *M. huakuii* J., (E) *M. plurifarium* L., (F) *M. septentrionale* G., (G) *M. temperatum* G., (H) *Sinorhizobium medicae* R., (I) *S. meliloti* L.

Hasil alignment menunjukkan bahwa sekuens gen *nifD* tiap spesies terdapat perbedaan urutan nukleotida. Tanda asterisk (*) menunjukkan bahwa nukleotida yang dimiliki oleh spesies-spesies terdapat perbedaan urutan akibat adanya mutasi. Mutasi tersebut meliputi:

Gambar 2. Potongan multiple sequence alignment nukleotida gen *nifD* dari 9 spesies *Rhizobia* yang menunjukkan terjadinya substitusi, insersi dan delesi. Tanda panah

nomor 1, 2 dan 3 berturut – turut menunjukkan yang menunjukkan terjadinya mutasi missense, mutasi silent dan mutasi nonsense

1. Mutasi titik pada sekuens gen *nifD*. Mutasi titik dapat berupa insersi, duplikasi, delesi, ataupun substitusi nukleotida. Akibat insersi, duplikasi atau substitusi nukleotida, sekuens gen *nifD* dapat mengalami mutasi silent, missense atau nonsense. Mutasi tersebut dapat dilihat pada gambar 2. Mutasi silent ditunjukkan oleh tanda panah nomor 2 (sekuens asam amino ke 6). Pada titik ini terjadi substitusi GAG menjadi GAA, tetapi asam amino yang terkode tetap glutamin. Mutasi missense yang terjadi ditunjukkan oleh tanda panah nomor 1 (sekuens asam amino ke 2). Pada titik ini terjadi substitusi AGC menjadi ACC, dan asam amino yang terkode juga berubah, yaitu serin menjadi threonin. Mutasi nonsense mengubah pengkodean asam amino menjadi kodon stop. Mutasi ini ditunjukkan oleh tanda panah nomor 3.
2. Mutasi segmen DNA, mutasi segmen gen *nifD* yang terjadi dapat berupa delesi, duplikasi, dan insersi. Tanda (---) pada alignment sekuens DNA menunjukkan tidak adanya nukleotida pada titik atau segmen tersebut.

Selanjutnya, pohon filogeni yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan algoritma filogeni Neighbour-Joining. Spesies-spesies anggota Rhizobia yang diteliti dapat digolongkan menjadi 4 *clade* (tabel 1). *Clade* pertama dan kedua yaitu Kelompok I, *clade* ketiga yaitu Kelompok II, dan *clade* keempat yaitu Kelompok III.

A. Fast growing Rhizobia

Dari hasil penelitian didapatkan 2 jenis Rhizobia yang masuk dalam kelompok ini, yaitu dari α -proteobacteria Genus *Sinorhizobium* dan dari β -proteobacteria Genus *Burkholderia*. Anggota kelompok *fast growing Rhizobia* dari Genus *Sinorhizobium* memiliki similaritas 97% dengan spesies dari genus yang sama dan diatas 59% dengan spesies dari genus lain. Sedangkan anggota kelompok *fast growing Rhizobia* dari Genus *Burkholderia* memiliki similaritas diatas 69% dengan spesies dari genus lain. Efektifitas kelompok ini dalam memasok nitrogen pada tanaman inang melalui proses fiksasi tergantung pada jenis tanamannya (Sucahyono, 2007). *Sinorhizobium medicae* mampu membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman *Medicago* (Semanggi duri). *S. meliloti* mampu membentuk nodul akar secara

efektif pada tanaman *Acacia* (Akasia) dan *Sesbania* (Turi). *Burkholderia vietnamiensis* mampu membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman *Oryza sativa* (Padi).

Gambar 3. Pohon filogeni yang menunjukkan kekerabatan beberapa spesies anggota Rhizobia berdasarkan similaritas gen *nifD*. Terdapat 4 *clade* berdasarkan pohon filogeni ini yaitu *clade* 1, *clade* 2 (kelompok I), *clade* 3(kelompok II), dan *clade* 4 (kelompok III) .

Rhizobia yang termasuk dalam kelompok *fast growing Rhizobia* memiliki karakteristik mampu membentuk nodul dalam waktu kurang dari tiga hari, mampu memproduksi polisakarida dengan jumlah yang sangat banyak dan kurang toleran terhadap tanah asam (Simanungkalit dkk.,2006). Pola pertumbuhan dari masing-masing Rhizobia mencerminkan pola potensi dalam memfiksasi N dari masing-masing isolat tersebut. Waktu pembentukan nodul yang cepat pada akar tanaman menunjukkan kemampuan Rhizobia dalam memfiksasi N yang ada di udara juga cepat (Widawati dan Rahayu, 2001). Adapun polisakarida yang dihasilkan dapat meningkatkan pelekatan akar pada tanah dan secara mekanik dapat meningkatkan

kemantapan agregat tanah di rizosfer (Santi, 2012). Dengan alasan – alasan tersebut, kelompok ini dikatakan sangat berpotensi untuk dijadikan pupuk hayati.

B. *Meso growing Rhizobia*

Spesies *Rhizobia* yang masuk dalam kelompok ini memiliki similaritas diatas 90% dengan spesies dari genus yang sama dan diatas 60% dengan spesies dari genus lain. Efektifitas kelompok ini dalam memasok nitrogen pada tanaman inang melalui proses fiksasi tergantung pada jenis tanamannya (Sucahyono, 2007). *Mesorhizobium ciceri* mampu membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman *Cicer arietinum* (Kacang arab). *M. huakuii* mampu membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman *Astragalus sinicus* (Chinese Milkvetch). *M. plurifarum* mampu membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman *Acacia* (Akasia). *M. septentrionale* dan *M. Temperatum* mampu membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman *Astragalus adsurgens* (Prairie/Rattee Milkvetch).

Rhizobia yang termasuk dalam kelompok *meso growing Rhizobia* memiliki karakteristik mampu membentuk nodul dalam waktu berkisar empat sampai lima hari, memproduksi polisakarida dengan jumlah yang banyak dan kurang toleran terhadap tanah asam (Simanungkalit dkk.,2006). Beberapa spesies pada kelompok ini diketahui dapat membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman bergenus sama, yaitu *M. huakuii*, *M. septentrionale* dan *M. temperatum* membentuk akar secara efektif pada tanaman *Astragalus* (Milkvetch). Selain itu terdapat pula spesies kelompok ini yaitu *M. plurifarum* yang memiliki kesamaan dengan spesies kelompok I, yaitu *S. meliloti* dapat membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman *Acacia* (Akasia). Hal ini mungkin terjadi karena tingkat similaritas gen *nifD* antar spesies dalam kelompok ini lebih dari 88% dan kedua kelompok tersebut lebih dari 81%. Persentase yang tinggi dikarenakan gen *nifD* yang dimiliki mempunyai panjang nukleotida yang sama, yaitu 1503 bp.

C. *Slow Growing Rhizobia*

Spesies *Rhizobia* yang masuk dalam kelompok ini memiliki similaritas di atas 55% dengan spesies dari genus lain. Efektifitas kelompok ini dalam memasok nitrogen pada tanaman inang melalui proses fiksasi tergantung pada jenis tanamannya (Sucahyono, 2007). *Bradyrhizobium japonicum* mampu membentuk nodul akar secara efektif pada tanaman *Lotononis*

(Lotus) dan *Macroptilium atropurpureum* (Purple Bush-Bean).

Rhizobia yang termasuk dalam kelompok *slow growing Rhizobia* memiliki karakteristik mampu membentuk nodul dalam waktu lebih dari enam hari, memproduksi polisakarida dengan jumlah yang sedikit dan toleran terhadap tanah asam (Simanungkalit dkk., 2006). Pertumbuhan *Rhizobia* yang lambat ini merugikan bagi industri pupuk hayati, karena biomassa yang terbentuk sedikit dan banyak substrat yang tersisa. Namun *Rhizobia* ini dapat dikombinasikan dengan *fast growing Rhizobia* sebagai pupuk hayati pada tanah asam (Saraswati dkk., 2003).

Rhizobia yang telah digolongkan ke dalam tiga kelompok seperti yang telah dipaparkan di atas, dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Penggolongan spesies anggota *Rhizobia*

Kelas	Spesies	Kelompok
β – proteobacteria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G. (1995)	Fast growing <i>Rhizobia</i>
	<i>Sinorhizobium medicae</i> R. (1996)	
	<i>S. meliloti</i> L. (1994)	
	<i>Mesorhizobium ciceri</i> J. (1997)	
α – proteobacteria	<i>M. huakuii</i> J. (1997)	Meso growing <i>Rhizobia</i>
	<i>M. plurifarum</i> L.(1998)	
	<i>M. septentrionale</i> G. (2004)	
	<i>M. temperatum</i> G. (2004)	
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> J. (1982)	Slow growing <i>Rhizobia</i>

4. KESIMPULAN

Simpulan yang dapat diperoleh dalam penelitian ini adalah *Sinorhizobium medicae*, *S. meliloti* dan *Burkholderia vietnamiensis* termasuk dalam kelompok *fast growing Rhizobia*, dan sangat berpotensi untuk dijadikan pupuk hayati. *Bradyrhizobium japonicum* termasuk dalam kelompok *slow growing Rhizobia*, dan dapat dikombinasikan dengan *fast growing Rhizobia* sebagai pupuk hayati pada tanah asam. Berkaitan dengan manfaatnya sebagai pupuk hayati, kedua kelompok bakteri tersebut masih perlu diuji lapangan.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Fakultas Biologi, Laboratorium Genetika Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, dan Balai

Penelitian Tanah yang telah memberikan banyak masukan dan ilmu pengetahuan sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan karya tulis ini.

6. REFERENSI DAN SITASI

- Campbell, N.A., J.B. Reece and L.G. Mitchell. (2003). *Biologi*. Ed 5. Jil 2. Erlangga. Jakarta, hal: 354.
- Mulligan, M.E. and R. Haselkorn. (1989). Nitrogen Fixation (*Nif*) Genes of The Cyanobacterium *Anabaena* Species Strain PCC 7120. *Journal of Biological Chemistry* 264 (32): 19200 – 19207.
- Rosmarkam, A. dan N.W. Yuwono. (2002). *Ilmu Kesuburan Tanah*. Kanisius. Yogyakarta, hal: 97 – 100.
- Santi, L. P . (2011). *Disertasi: Peran Bakteri Penghasil Eksopolisakarida dalam Agregat Tanah Tekstur Berpasir*. ITB. Bogor, hal: 8 – 12.
- Saraswati, R., K. Syamsu, D. N. Susilowati. B. Laila, dan R.S. Andhayani. (2003). Produksi Masal Sel *Rhizobium* dengan Teknologi Bioproses. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 8 (2): 47 – 52.
- Simanungkalit, R.D.M., D.A. Suriadikarta, R. Saraswati, D. Setyorini dan W. Hartatik. (2006). *Pupuk Organik dan Pupuk Hayati*. Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian. Bogor, hal: 117 – 123.
- Sucahyono, D. (2007). Toleransi Isolat *Rhizobium* Kacang Tanah pada Kondisi Masam Berkadar Fe Tinggi. *Agritek* 15: 152 – 158.
- Widawati, S. dan S. H. Rahayu. (2001). Peranan Inokulan *Rhizobium* Toleran Tahan Asam di Tanah Bereaksi Masam pada Pertumbuhan dan Hasil Panen Kedelai. *Prosiding Seminar Keanekaragaman Hayati dan Aplikasi Bioteknologi Pertanian* :347 – 359.
- Wu, S.C., Z.H. Cao, Z.G. Li, K.C. Cheung and M.H. Wong. (2005). Effects of Biofertilizer Containing N Fixer, P and K Solubilizers and A M Fungi on Maize Growth: A green House Trial. *Geoderma* 125: 155 – 156.