

Identifikasi dan Kekerabatan Rhizobia Pohon Mangium dan Sengon Berdasarkan *nodD1* dan *nifH*

(Identification and Phylogeny of Rhizobia of Mangium and Sengon Based on *nodD1* and *nifH*)

Misbakhul Bait^{1*}, Rumella Simarmata², Rahayu Widyastuti³

(Diterima Maret 2022/Disetujui Oktober 2022)

ABSTRAK

Rhizobia dari tanaman legum *Acacia mangium* (Mangium) dan *Paraserianthes falcataria* (Sengon) telah sering diisolasi dan dipelajari aplikasinya pada tanaman, namun studi tentang gen *nod* dan *nif* masih sangat kurang. Padahal, tanaman ini sering kali menjadi sumber bahan baku kertas dan penghijauan. Tujuan penelitian ini ialah untuk mendefinisikan hubungan genetik sekelompok strain potensial yang telah diisolasi dari pohon legum tropis ditinjau dari 16S rRNA, gen *nodD1*, dan *nifH*. Metode penelitian ini meliputi seleksi isolat berdasarkan karakter utama Rhizobiales, mengisolasi gen 16S rRNA, *nodD1*, dan *nifH* dari isolat terpilih, dan mengonstruksi pohon filogenetik berdasarkan gen yang diisolasi. Dua rhizobia yang dipilih berdasarkan uji seleksi, yakni DCM 212 dari *A. mangium* dan DF13 dari *P. falcataria*. Isolat DCM 212 teridentifikasi memiliki kemiripan paling dekat dengan *Rhizobium multihospitium* CC-13H. Isolat DF13 memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Bradyrhizobium elkanii*, baik berdasarkan 16S rRNA, *nodD1*, dan *nifH*. Pasangan primer degeneratif yang digunakan dalam penelitian ini tidak mampu mendeteksi gen *nodD1* pada isolat DCM212.

Kata kunci: Bradyrhizobium, filogenetik, rhizobium

ABSTRACT

Rhizobia from legumes *Acacia mangium* (Mangium) and *Paraserianthes falcataria* (Sengon) have often been isolated and studied for their applications to plants, but studies on the *nod* and *nif* genes are still lacking. Even though this plant were often used as a source of paper raw materials and reforestation plants. The aim of this study was to define the genetic relationship of a group of potential strains isolated from tropical legume trees in terms of 16S rRNA, *nodD1*, and *nifH* genes. This research method includes the selection of isolates based on the main character of Rhizobiales, to isolate the 16S rRNA, *nodD1*, and *nifH* genes from the selected isolates, and to construct a phylogeny tree based on the isolated genes. Two rhizobia were selected based on a selection test, namely DCM 212 from *A. mangium* and DF13 from *P. falcataria*. DCM 212 isolate was identified as having the closest similarity to *Rhizobium multihospitium* CC-13H. The isolate of DF13 had high similarity with *Bradyrhizobium elkanii* based on 16S rRNA, *nodD1*, and *nifH*. The degenerative primer pairs used in this study could not detect *nodD1* gene from DCM 212 isolate.

Keywords: Bradyrhizobium, phylogeny, rhizobium

PENDAHULUAN

Bakteri rhizobia dikenal dengan kemampuannya dalam membentuk bintil akar penambat nitrogen pada berbagai jenis tanaman legum. Selama ini, penggunaan Rhizobia sebagai pupuk dilakukan spesifik pada jenis tanaman inang aslinya, namun hal

ini dianggap kurang efisien (Hernandez-Lucas *et al.* 1995). Berbagai penelitian telah menunjukkan adanya nodulasi silang pada rhizobia ke jenis tanaman legum yang bukan inang aslinya (Bala & Giller 2001). Hal ini dimungkinkan karena rhizobia dapat menghasilkan berbagai *Nod Factor* atau *Lipo-chitoooligosaccharide* yang dapat menstimulasi nodulasi rambut akar di berbagai tanaman legum (Bisseling & Geurts 2020). Jenis rhizobia yang memiliki kemampuan *nod factor* ini dikenal juga sebagai *Broad-Host Rhizobia* (Ormeño-Orrillo *et al.* 2012). Beberapa jenis rhizobia yang cukup terkenal dengan kemampuan *Nod Factor* dan telah dikomersilkan beserta *Nod Factor* yang dihasilkannya, seperti *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76, dan *Rhizobium tropici* CIAT 899 (Kaneko *et al.* 2011; del Cerro *et al.* 2017; Reeve *et al.* 2017).

¹ Sekolah Pascasarjana, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

² Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Cibinong, 16911

³ Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

* Penulis Korespondensi:

Email: misbakhul.bait@apps.ipb.ac.id

Gen *nodD1* merupakan regulator yang mengaktifkan *nod box*, serangkaian gen yang menghasilkan *nod factor* yang dapat memicu pembentukan bintil akar (Peck *et al.* 2006). Pada berbagai penelitian telah ditunjukkan bahwa manipulasi pada *nodD1* dapat meningkatkan kemampuan suatu rhizobia untuk mengenali berbagai penginduksi sehingga dapat lebih mudah terstimulasi untuk memproduksi *nod factor* (Fuentes-Romero *et al.* 2022). Selain membentuk bintil akar, suatu rhizobia dapat dikatakan memiliki kemampuan yang efektif bila dapat membentuk bintil akar yang mampu menambat nitrogen. Kemampuan ini dipengaruhi oleh keberadaan gen *nif*, salah satunya adalah *nifH*. Gen *nifH* dapat mengkode enzim di-nitrogenase reductase (Fe Protein) yang berperan dalam transfer elektron dari molekul pereduksi, seperti ferredoxin atau flavodoxin, ke protein nitrogenase (Aker *et al.* 2014). Gen *nifH* secara umum banyak juga ditemukan pada bakteri penambat nitrogen lain, termasuk yang bakteri endofitik penambat nitrogen (Mahmud *et al.* 2020).

Pohon legum berkayu, seperti *A. mangium* dan *P. Falcataria*, diketahui bersimbiosis dengan Rhizobia membentuk bintil akar. Kedua tanaman ini dikenal sebagai tanaman yang cepat tumbuh, yang umumnya digunakan sebagai bahan baku industri kertas hingga tanaman penghijauan. Selama ini rhizobia dari tanaman ini hanya dikoleksi, diidentifikasi berdasarkan 16S rRNA, dan diteliti aplikasinya pada pertumbuhan tanaman, namun kajian pada gen *nodD1* dan *nifH* masih sangat kurang (Clapp *et al.* 2001; Purwaningsih, 2004). Selama ini, penelitian *nodD1* dilakukan untuk mempelajari jangkauan Rhizobia yang dapat bersimbiosis dengan berbagai jenis tanaman legum (Fuentes-Romero *et al.* 2022). Sementara itu, *nifH* dikaji untuk memahami kemampuan rhizobia dalam menambat nitrogen.

Dengan mempelajari kedua gen ini, penelitian ini bertujuan untuk mendefinisikan hubungan genetik sekelompok strain potensial yang diisolasi dari pohon legum tropis ditinjau dari 16S, gen *nodD1*, dan *nifH*, sekaligus memahami potensi penambat nitrogen serta studi awal mengenai jangkauan simbiosis dengan berbagai inang tanaman legum.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Rhizobia yang digunakan dalam penelitian ini adalah rhizobia yang diperoleh dari pohon legum

berkayu, seperti *A. mangium* dan *P. falcataria* (Tabel 1). Rhizobia ini merupakan hasil koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi Simbiotik Tanaman, Bioteknologi BRIN. Isolat awal yang digunakan berjumlah 5 isolat.

Uji Selektif

Prosedur penelitian yang digunakan dalam seleksi isolat ini menyesuaikan dengan karakter Rhizobia atau ordo Rhizobiales, yang meliputi 1). Pertumbuhan koloni selama 96 jam pada media YEMA (Yeast Ekstrak Mannitol Agar) (Vincent 1970) yang terdiri atas K₂HPO₄ 0,5 g, MgSO₄·7H₂O 0,2 g, NaCl 0,1 g, CaCO₃ 3 g, Mannitol 10 g, Yeast Extract 3 g, Agar 20 g, dan Aquadest 1000 ml, dengan pH 6,8; 2). Pengujian hipersensitivitas dengan menyuntikkan isolat berumur 48 jam di media Nutrient Broth ke dalam jaringan daun tembakau. Perkembangan gejala klorosis diamati hingga 4 hari (Fahy & Persley 1982); 3). Pengujian isolat pada medium blood agar plate (BAP) yang dibuat dari Media Tryptic Soy Agar yang ditambahkan dengan 5% darah kelinci yang telah disterilkan. Isolat diinkubasi hingga 3 hari dan dicek pembentukan hemolisisnya (Buxton 2016); 4). Pengujian gram bakteri dilakukan dengan memfiksasi bakteri pada gelas kaca, dilanjutkan dengan pemberian larutan-larutan seperti alkohol, kristal violet, dan safranin hingga morfologi bakteri berwarna merah (gram negatif) atau ungu (gram positif) (Bergey 1994); 5). Pertumbuhan isolat pada media NFB semisolid dilakukan dengan menginkubasi isolat selama 7 hari di dalam media. Hasil positif terlihat bila isolat membentuk cincin di dekat permukaan media (Okon *et al.* 1977)

Isolasi Genom

Isolasi dan purifikasi genom dilakukan menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid, Taiwan). Kualitas genom dicek dengan menggunakan spektrofotometer NanoDrop One (Thermo Scientific™, USA). Produk PCR dari genom diuji secara elektroforesis dengan menggunakan 1,2% TAE Agarose pada elektroforesis Mupid EXu Submarine. Penanda DNA dicek melalui gel agarose yang diwarnai dengan FloroSafe DNA Stain 1st Base (Axil Scientific, Singapore) dan ditampilkan melalui ultraviolet transilluminator.

Amplifikasi gen 16S rRNA

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan menggunakan kit PCR 2x My Taq HS Red Mix #BIO-25048 (Bioline,

Tabel 1 Uji selektif pada rhizobia terpilih

Jenis isolat	Inang asli	Lokasi sampling	Inang lainnya	YEMA	BA	Hip	NFB
DCM 212	<i>A. mangium</i>	Cibinong, Jawa Barat, ID	<i>P. falcataria</i> , <i>G. Max</i>	++	-	-	+
DF13	<i>P. falcataria</i>	Cibinong, Jawa Barat, ID	-	+	-	-	+

Keterangan: YEMA = Yeast Extract Manitol Agar, ++ = Tumbuh cepat, + = tumbuh lambat; BA = Blood agar, Hip = Uji Hipersensitivitas pada daun tembakau, NFB = uji NFB semi solid - = non reaktif, + = reaktif.

Singapore) dan primer universal 27F dan 1492R (Tabel 2). Proses siklus PCR dilakukan pada alat PCR Takara Bio dengan prosedur yang diatur sebagai berikut: suhu 95°C, waktu 1 menit; denaturasi: suhu 95°C, waktu 15 detik; annealing: suhu 53°C, waktu 30 detik; elongasi: suhu 72°C, waktu 45 detik; final elongasi: suhu 72°C, waktu 5 menit; akhir: suhu 4°C, waktu ∞; siklus PCR 30x. Hasil PCR secara kualitatif dicek dengan proses elektroforesis pada 1,2% TAE gel agarose dan diamati pada UV Box. Pita DNA yang teramati dirunut dengan menggunakan ABI-Prism 3730 xl DNA Sequencer (First Base, Malaysia).

Desain primer dan analisis PCR gen *nodD1* dan *nifH*

Desain primer gen *nodD1* dan *nifH* dilakukan menggunakan sekuens *nodD1* dan *nifH* rhizobia yang diperoleh dari NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>), mengacu pada hasil identifikasi 16S rRNA. Data yang diperoleh selanjutnya diolah dengan software Geneious Prime versi 2021.2.2 (Geneious 2021). Kandidat PCR dicek kembali secara PCR *in silico*. Amplifikasi gen *nodD1* dan *nifH* menggunakan kit PCR 2x My Taq HS Red Mix #BIO-25048 (Bioline, Singapore) dan primer sesuai dengan hasil desain primer sebelumnya (Tabel 2). Proses siklus PCR dilakukan pada alat PCR Takara Bio dengan prosedur yang diatur sebagai berikut: pre-denaturasi: suhu 95°C, waktu 1 menit; denaturasi: suhu 95°C, waktu 15 detik; annealing: suhu 55°C, waktu 15 detik; elongasi: suhu 72°C, waktu 10 detik; siklus PCR 30X; elongasi akhir PCR: suhu 72°C, waktu 5 menit; akhir: suhu 4°C, waktu ∞. Hasil PCR secara kualitatif dicek dengan proses elektroforesis pada 1,2% TAE gel agarose dan diamati pada UV Box. Pita DNA yang teramati dirunut dengan menggunakan ABI-Prism 3730 xl DNA Sequencer (First Base, Malaysia).

Analisis homologi sekuens 16S rRNA, gen *nodD1* dan *nifH*

Sekuens 16S rRNA, gen *nodD1*, dan gen *nifH* dari tiap isolate yang diperoleh kemudian dianalisis tingkat homologinya dengan sekuens sejenis pada database menggunakan BLASTN pada situs NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>). Hasil dari BLASTN digunakan untuk melakukan alignment dengan metode MUSCLE atau Multiple Sequence Alignment (Edgar 2004). Hasil dari analisis ini disajikan dalam tabel 4–6.

Analisis pohon filogenetik gen 16S rRNA, *nifH*, dan *nodD1*

Sekuens gen 16S rRNA, *nifH*, dan *nodD1* yang telah diperoleh selanjutnya dianalisis lebih lanjut kekerabatannya dengan sekuens gen sejenis dari berbagai spesies/strain hasil analisis BLASTN (Tabel 4–6) menggunakan software Geneious Prime versi 2021.2.2 (Geneious 2021) yang telah dilengkapi dengan plugins PHYML 3.3.20180621 (Guindon *et al.* 2010). Pohon filogenetik dibuat dengan metode Maximum Likelihood bootstraps 1000x menggunakan model Tamura-Nei (Tamura *et al.* 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri koleksi dari Pusat Riset Bioteknologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), baik yang telah teridentifikasi ataupun yang belum (Lekatompessy *et al.* 2019). Bakteri yang digunakan merupakan bakteri yang diisolasi dari bintil akar tanaman legum berkayu di Indonesia (Tabel 1). *Paraserianthes falcataria* (sengon) dan *Acacia mangium* (mangium) merupakan tanaman legum berkayu yang sering digunakan untuk bahan baku industri kertas.

Berdasarkan hasil berbagai uji seleksi (Tabel 1), isolat bakteri yang digunakan menunjukkan ciri khas rhizobia atau ordo Rhizobiales, yakni bakteri gram negatif dan dapat tumbuh pada Media Yeast Extract Manitol Agar (YEMA) dengan kecepatan pertumbuhan yang beragam. Dari hasil uji hipersensitivitas dan blood agar, isolat yang digunakan tidak memiliki sifat patogen pada tumbuhan dan hewan. Kedua isolat memiliki kemampuan aktivitas nitrogenase berdasarkan hasil uji NFB semisolid.

Konsentrasi DNA dari genom yang diperoleh dari isolat rhizobia berkisar antara 30,2–183,6 ng/μL dengan rasio 260/280 nm kemurnian DNA bakteri berkisar 1,90–1,96 (Tabel 3). Data ini menunjukkan bahwa semua bakteri memiliki kemurnian yang berkualitas tinggi. Rasio 260/230 nm berkisar pada 1,74 hingga 2,03 yang menunjukkan bakteri memiliki kualitas yang baik, namun ada sedikit pengotor pada RNA isolat DF13.

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan menggunakan pasangan primer universal 27F dan 1492R (Tabel 2). Gen 16S rRNA dari DCM 212 isolat memiliki panjang

Tabel 2 Primer 16S rRNA, *nodD1*, dan *nifH* yang digunakan

Primer	Gene Target	Sekuens
27F	16S rRNA	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492 R	16S rRNA	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'
NOD1BE-F	<i>nodD1</i>	5'-ACGCCTCCTCBAACAATATCCGS-3'
NOD1-R	<i>nodD1</i>	5'-AATCTTCTCGTCGCGCTCG-3'
NifH-F	<i>nifH</i>	5'-GGCATCGGCAAGTCSACCA-3'
NIFHBY-R	<i>nifH</i>	5'-GCCTTTGCCGCCATTATTGT-3
NifH-R	<i>nifH</i>	5'-AKCAGCATGTCTCGAGCTC-3'

1271 pb dengan ukuran protein 423 aa, bobot molekul 44,125 kDa, dan nilai pl 11,11. Isolat DF13 memiliki gen 16S rRNA dengan panjang 1352 pb dengan ukuran protein 450 aa, bobot molekul mencapai 46,744 kDa, dan nilai pl 15,96.

Amplifikasi primer *nodD1* dan *nifH* menggunakan primer degeneratif yang didesain sendiri. Isolat DF13 menggunakan pasangan primer NODD1BE-F dan NOD1-R untuk isolasi *nodD1* dan pasangan primer NifH-F dan NifH-R untuk gen *nifH*. Isolat DCM 212 menggunakan pasangan primer NifH-F dan NIFHBY-R

untuk isolasi gen *nifH*. Perbedaan primer *nifH* ini disebabkan oleh tingkat *conserved gene* yang digunakan sebagai penempelan primer cukup rendah. Hal ini juga terjadi pada primer *nodD1* yang digunakan hanya dapat mengisolasi dari isolat DF13.

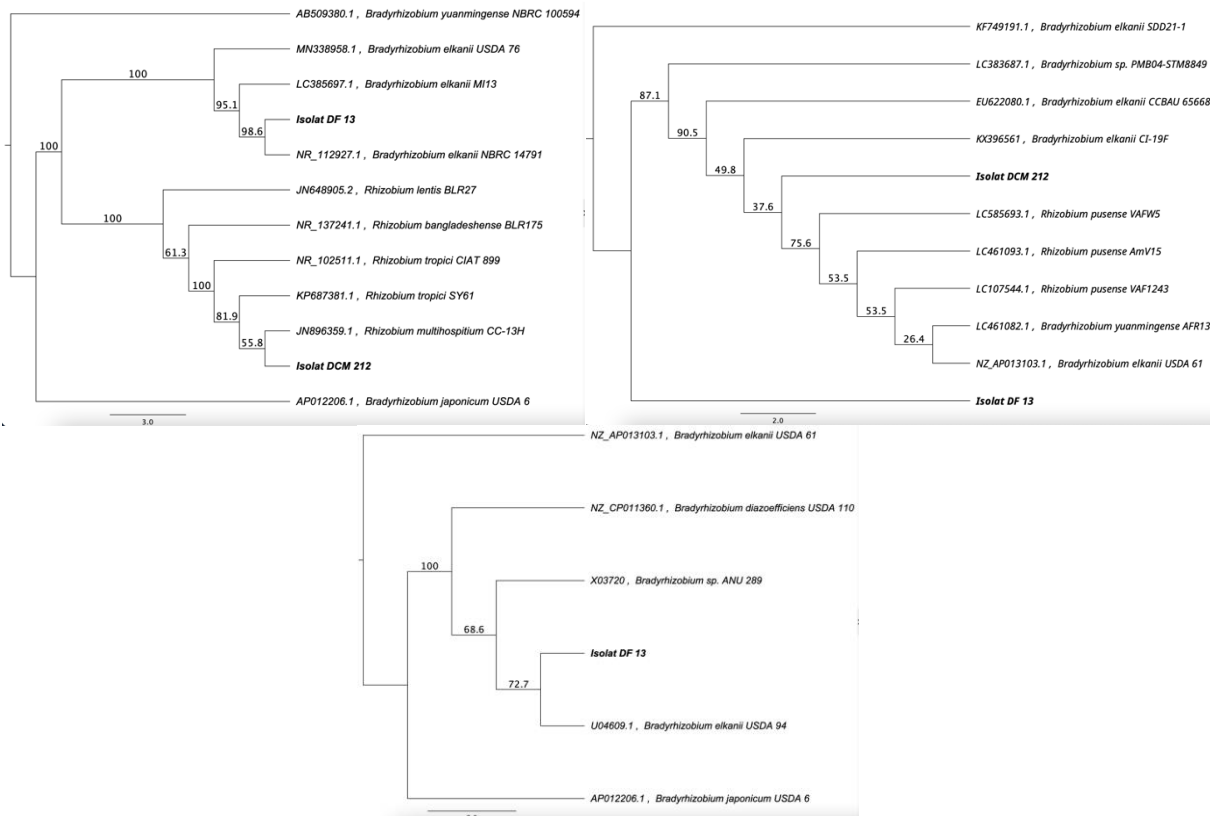
Berdasarkan uji molekuler 16S rRNA, DCM 212 memiliki kemiripan dengan *Rhizobium multihospitium* CC-13H (Tabel 4). Hal ini sejalan dengan hasil pohon filogenetik Maximum Likelihood bahwa isolat DCM 212 memiliki kekerabatan yang tinggi dengan *Rhizobium multihospitium* CC-13H (Gambar 1a). Isolat DF 13

Tabel 3 Konsentrasi DNA dari isolat rhizobia yang digunakan

Isolat	Konsentrasi (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
DCM212	183,60	1,90	2,03
DF13	30,20	1,96	1,74

Tabel 4 Hasil Pelacakan BLASTN 16S rRNA bakteri

Isolat	Strain Pemandang	Accession Number	Accession Length	Query Coverage (%)	E-Value	Percentage Identity (%)
DCM 212	<i>Rhizobium multihospitium</i> CC-13H	JN896359	1438	100,00	0	99,70
	<i>Rhizobium tropici</i> SY61	KP687381	1375	100,00	0	99,70
	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	NR_102511.1	1469	100,00	0	99,60
	<i>Rhizobium bangladeshense</i> BLR175	NR_137241.1	1469	100,00	0	97,60
	<i>Rhizobium lentis</i> BLR27	JN648905.2	1469	100,00	0	97,50
DF13	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> NBRC 14791	AB509380.1	1414	100,00	0	99,90
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	MN338958.1	1480	100,00	0	99,60
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> M113	LC385697.1	1444	100,00	0	99,90
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	AP012206.1	1400	100,00	0	97,40
	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> NBRC 100594	NR_112928.1	1414	100,00	0	97,30



Gambar 1 Pohon filogenetik antar Rhizobia uji pada uji molekule Nod Factor atau Lipo-chitoologisaccharide r 16S rRNA (a), gen *nifH* (b), dan gen *nodD1* (c) berdasarkan metode maximum likelihood dengan bootstraps 1000x model Tamura-Nei.

memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Bradyrhizobium elkanii* NBRC 14791 dengan identitas persentase 99,7%, baik berdasarkan hasil BLASTN (Tabel 4) maupun pohon filogenetik (Gambar 1a). Hasil identifikasi ini sesuai dengan pertumbuhan di media YEMA, genus *Rhizobium*, yakni DCM 212 memiliki kemampuan untuk tumbuh cepat, sedangkan DF13 merupakan *Bradyrhizobium* yang memiliki ciri pertumbuhan koloni yang lebih lambat (Tabel 1).

Dari hasil isolasi gen *nifH* isolat DCM 212 diperoleh dengan panjang 680 pb dengan ukuran protein 226 aa, bobot molekul 24,852 kDa, dan nilai pI 9,41. Berdasarkan hasil BLASTN, gen *nifH* dari isolat DCM 212 memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Bradyrhizobium* sp. PMB04-STM8849 hingga Identitas Persentase 100%. Isolat DF13 memiliki panjang gen *nifH* 696 pb, dengan ukuran protein 232 aa, bobot molekul 15,121 kDa, dan nilai pI 4,83. Berdasarkan hasil BLASTN (Tabel 5) dan pohon filogenetik (Gambar 1b), gen *nifH* dari isolat DF13 memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Bradyrhizobium elkanii* SDD21-1.

Isolat DF13 memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Bradyrhizobium elkanii* USDA 94 berdasarkan BLASTN *nodD1* (Tabel 6). Hasil ini juga diperkuat dengan hasil pohon filogenetik bahwa DF13 lebih dekat dengan *Bradyrhizobium elkanii* USDA 94 (Gambar 1c). Hasil isolasi gen *nodD1* isolat DF13 diperoleh panjang gen 851 pb dengan panjang protein 283 aa, bobot molekul 30,494 kDa, dan nilai pI 12,18.

Isolat DCM 212 memiliki kemampuan membentuk bintil akar pada berbagai tanaman inang, seperti *P. falcataria* dan *Glycine max* (Lekatompessy *et al.* 2019). Meski *Broad-host rhizobium* ini memiliki identitas persentase yang lebih tinggi pada *R. multihospitium* CC-13H, isolat DCM 212 juga memiliki kekerabatan yang tinggi dengan *R. tropici* CIAT 899 dengan identitas persentase mencapai 99,6% (Tabel 4). *R.*

tropici CIAT 899 dapat membentuk nodulasi hingga pada 20 spesies tanaman legum (Hernandez-Lucas *et al.* 1995). Tingginya rentang menginfeksi inang dimungkinkan oleh kemampuan *R. tropici* CIAT 899 dalam menghasilkan banyak jenis Lipochitooligosaccharide (LCO) (Moron *et al.* 2005; del Cerro *et al.* 2015).

Meskipun isolat DCM 212 memiliki kemampuan sebagai *broad-host rhizobium*, tapi gen *nodD1* belum berhasil ditemukan dari isolat ini. Kontruksi primer degeneratif *nodD1* cukup menantang karena karakter gen yang tidak *se-conserved* dengan *housekeeping gene*, seperti 16S rRNA (Ormeño-Orrillo *et al.* 2012). Pembuatan primer degeneratif *nodD1* tidak bisa hanya berdasarkan hasil identifikasi 16S rRNA, akan tetapi juga perlu mempelajari kecenderungan kekerabatan *nodD1* rhizobia pada studi-studi sebelumnya. Gen *nodD1* merupakan gen yang berfungsi meregulasi aktivasi nod box untuk selanjutnya mensintesis LCO yang berfungsi dalam pembentukan bintil akar tanaman. Gen ini termasuk kumpulan gen yang berada di plasmid simbiotik. Gen *nodD1* diduga lebih mudah ditransfer genetiknya secara horizontal (Risal *et al.* 2010). Hal ini yang diduga jadi penyebab *nodD1* memiliki pohon filogenetik yang berbeda dari 16S rRNA dan menjadi cukup sulit untuk digunakan sebagai pembeda spesies (Ormeño-Orrillo *et al.* 2012).

Isolat DF13 sendiri merupakan *slow-growing rhizobia* yang berasal dari tanaman legum *P. falcataria*. Tanaman ini merupakan *tropical fast-growing legume tree* yang sering digunakan sebagai bahan baku kertas. Berdasarkan uji BLASTN, isolat DF13 memiliki konsistensi kemiripan dengan *B. elkanii* baik pada gen 16s rRNA, *nifH*, dan *nodD1* (Tabel 4-6). Gen *nifH* umumnya memiliki kecenderungan memiliki kemiripan yang sama dengan pohon filogenetik 16S rRNA. Hal ini

Tabel 5 Hasil Pelacakan BLASTN *nifH* bakteri

Isolat	Strain Pemandang	Accession Number	Accession Length	Query Coverage (%)	E-Value	Percentage Identity (%)
DCM 212	<i>Bradyrhizobium</i> sp. PMB04-STM8849	LC383687	678	99,71	0	100,00
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 61	AP013103	680	100,00	0	98,10
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> CCBAU 65668	EU622080	677	99,56	0	98,40
	<i>Rhizobium pusense</i> VAF1243	LC107544	678	99,71	0	98,10
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> CI-19F	KX396561	697	100,00	0	97,80
DF13	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SDD21-1	KF749191	697	100,00	0	99,90
	<i>Rhizobium pusense</i> VAFW5	LC585693	697	100,00	0	97,70
	<i>Rhizobium pusense</i> AmV15	LC461093	697	100,00	0	97,70
	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> AFR13	LC461082	697	100,00	0	97,70
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 61	AP013103	697	100,00	0	97,70

Tabel 6 Hasil Pelacakan BLASTN *nodD1* bakteri

Isolat	Strain Pemandang	Accession Number	Accession Length	Query Coverage (%)	E-Value	Percentage Identity (%)
DF13	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 94	U04609	848	99,65	0	97,40
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 61	NZ_AP013103.1	851	100,00	0	97,30
	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ANU 289	X03720	851	100,00	0	92,00
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	AP012206	849	99,76	0	85,40
	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110	CP011360	846	99,41	0	85,30

dapat disebabkan adanya pengaruh *vertical transfer gene* pada *nifH* (Hakim *et al.* 2021).

Berdasarkan studi pada *A. mangium* maupun *P. falcataria*, rhizobia yang diisolasi dari bintil akar sebagian besar berasal dari *Bradyrhizobia*, terutama *B. japonicum* dan *B. elkanii* (Clapp *et al.* 2001; Perrineau *et al.* 2011). Jenis *broad-host range* seperti *R. tropici* masih sangat jarang dilaporkan. Hal ini bisa menjadi keunggulan isolat DCM 212 yang mampu membentuk nodul pada kedua tanaman kayu komersil tersebut, termasuk juga pada tanaman pangan kedelai (Lekatompessy *et al.* 2019).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada PT Pupuk Kalimantan Timur yang telah memberikan dana penelitian dan Pusat Bioteknologi BRIN yang telah memberikan fasilitas dan akses kegiatan penelitian ini. Terima kasih juga disampaikan kepada Ibu Nanik Rahmani dan Prof. Partomuan Simandjuntak dari BRIN atas saran-saran selama kegiatan penelitian.

KESIMPULAN

Isolat DCM 212 teridentifikasi memiliki kemiripan paling dekat dengan *Rhizobium multihospitium* CC-13H dan *Rhizobium tropici* CIAT 899 berdasarkan uji molekuler 16S rRNA. Meskipun berdasarkan *nifH* isolat DCM 212 lebih berkerabat dengan *Bradyrhizobium* sp. PMB04-STM8849, berdasarkan uji YEMA dan karakter lainnya, DCM 212 termasuk *broad-host rhizobium*, seperti genus *Rhizobium*. Isolat DF13 memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Bradyrhizobium elkanii*, baik berdasarkan 16S rRNA, *nodD1*, dan *nifH*. Pasangan primer degeneratif yang digunakan dalam penelitian ini tidak mampu mendeteksi gen *nodD1* pada isolat DCM212.

DAFTAR PUSTAKA

Akter Z, Pageni BB, Lupwayi NZ, Balasubramanian PM. 2014. Biological nitrogen fixation and *nifH* gene expression in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Canadian Journal Plant Science*. 94: 203–212. <https://doi.org/10.4141/cjps2013-200>

Bala A, Giller KE. 2001. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. *New Phytologist*. 149(3): 495–507. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00059.x>

Bergey, David H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins. USA.

Bisseling T, Geurts R. 2020. Specificity in legume nodule symbiosis. *Science* 369(6504): 620–621. <https://doi.org/10.1126/science.abd3857>

Buxton. 2016. *Blood agar plates and hemolysis protocols*. American society for microbiology. USA. 1–9 pp. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec088567>

Clapp JP, Mansur I, Dodd JC, Jeffries P. 2001. Ribotyping of rhizobia nodulating *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* from different geographical areas in Indonesia using PCR-RFLP-SSCP (PRS) and sequencing. *Environmental Microbiology* 3(4): 273–280. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00191.x>

Del Cerro P, Rolla-Santos AA, Gomes DF, Marks BB, Pérez-Montaño F, Rodríguez-Carvajal MÁ, Nakatani AS, Gil-Serrano A, Megías M, Ollero FJ, *et al.*. 2015. Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics* 16(1): 251. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1458-8>

Del Cerro P, Pérez-Montaño F, Gil-Serrano A, López-Baena FJ, Megías M, Hungria M, Ollero FJ. 2017. The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Scientific Reports* 7(46712): 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep46712>

Edgar RC. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 5: 113

Fahy PC, Persley GJ. 1983. *Plant bacterial diseases; a diagnostic guide*. Academic Press, Australia. 393 p.

Fuentes-Romero F, Navarro-Gómez P, Ayala-García P, Moyano-Bravo I, López-Baena F-J, Pérez-Montaño F, Ollero-Márquez F-J, Acosta-Jurado S, Vinardell J-M. 2022. The *nodD1* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 restores nodulation capacity on bean in a *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nodD1/nodD2* mutant but the secondary symbiotic regulators *noIR*, *nodD2* or *syrM* prevent HH103 to nodulate with this legume. *Microorganisms* 10(1): 139. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010139>

Geneious Prime. 2021.1.1.1. (<https://www.geneious.com>)

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3): 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

Hernandez-Lucas I, Segovia L, Martinez-Romero E, Pueppke SG. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Applied and Environmental*

- Microbiology* 61(7): 2775–2779. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2775-2779.1995>
- Hakim S, Imran A, Mirza MS. 2021. Phylogenetic diversity analysis reveals *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Ensifer aridi* as major symbionts of mung bean (*Vigna radiata* L.) in Pakistan. *Brazilian Journal of Microbiology* 52: 311–324. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00397-9>
- Kaneko T, Maita H, Hirakawa H, Uchiike N, Minamisawa K, Watanabe A, Sato S. 2011. Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6T. *Genes* 2(4): 763–787. <https://doi.org/10.3390/genes2040763>
- Lekatompessy S, Nurjanah L, Sukiman H. 2019. Study of cross inoculation of *Rhizobium tropici* with other potential soil microbes on their ability to support the growth of soybean. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Sciences* 308. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012041>
- Mahmud K, Makaju S, Ibrahim R, Missaoui A. 2020. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants* 9(1):97. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Morón B, Soria-Díaz ME, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro DN, Gil-Serrano A, Thomas-Oates J, Megías M, Sousa C. 2005. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chemistry & Biology* (9): 1029–1040. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.06.014>
- Okon Y, Albrecht SL, Burris RH. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Applied Environmental Microbiology* 33(1): 85–88. <https://doi.org/10.1128/aem.33.1.85-88.1977>
- Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LG, Ollero FJ, Nicolás MF, Pains Rodrigues E, Shiguyoshi Nakatani A, Silva Batista JS, Oliveira Chueire LM, Souza RC, Ribeiro Vasconcelos AT, Megias M, Hungria M, Martínez-Romero E. 2012. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13: 735–745. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735>
- Peck MC, Fisher RF, Long SR. 2006. Diverse flavonoids stimulate *nodD1* binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 188(15): 5417–5427. <https://doi.org/10.1128/JB.00376-06>
- Perrineau MM, Le Roux C, De Faria SM, De Carvalho Balieiro F, Galiana A, Prin Y, Béna G. 2011. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. *Systematic and Applied Microbiology* 34(5): 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.03.003>
- Purwaningsih R. 2004. Effect of microbe as fertilizer on the growth of *Acacia mangium* on the sand sterile in green house. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 5(2): 85–88. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d050209>
- Reeve W, van Berkum P, Ardley J, Tian R, Gollagher M, Marinova D, Elia P, Reddy TBK, Pillay M, Varghese N, Seshadri R, Ivanova N, Woyke T, Baeshen MN, Baeshen NA, Kyrpides N. 2017. High-quality permanent draft genome sequence of the *Bradyrhizobium elkanii* type strain USDA 76^T, isolated from *Glycine max* (L.) Merr. *Standards in Genomic Sciences* 12: 26. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0238-2>
- Risal CP, Djedidi S, Dhakal D, Ohkama-Ohtsu N, Sekimoto H, Yokoyama T. 2012. Phylogenetic diversity and symbiotic functioning in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) bradyrhizobia from contrast agro-ecological regions of Nepal. *Systematic and Applied Microbiology* 35: 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.06.004>
- Tamura K, Kumar S, Stecher G. 2016. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger data sets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Vincent JM. 1970. *A Manual of the Practical study of the root nodule bacteria international biological programme*. London. Handbook No 15. 164 p.