

## R E V I E W:

**Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen  
Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein****Species definition of procaryotes based on 16S rRNA and protein coding genes  
sequence**

ARTINI PANGASTUTI\*

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126.

Diterima: 21 Maret 2006. Disetujui: 16 Juni 2006.

## ABSTRACT

Until now it is complicated for demarcating species of prokaryotes. The 16S rRNA gene sequence provide phylogenetic basis for classification. It has been widely accepted that more than 97% similarity in 16S rRNA gene sequence is a species definition for prokaryotes. However, this criterion can not correspond to real ecological unit, thus can not reveal the functional diversity in nature. The interaction with the environment is defined at the level of functional genes, not 16S rRNA gene. Protein-coding genes sequence can be expected to disclose much previously unknown ecological population of prokaryotes. These are the genes that determine the role of the species. Sequence similarity in multiple protein-coding genes is recommended as a primary criterion for demarcating taxa.

© 2006 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** species definition, 16S rRNA, prokaryotes, systematics.

## PENDAHULUAN

Definisi spesies merupakan tujuan dari sistematik. Sistematik diperlukan untuk mengenali kelompok organisme yang serupa dalam suatu skema hirarki. Dalam sistematik, keanekaragaman diatur dalam suatu tatanan melalui proses karakterisasi dan pengelompokan. Unit fundamental dari keanekaragaman adalah spesies, sehingga definisi yang tepat mengenai spesies penting untuk mempelajari keanekaragaman hayati di alam. Prokaryota menempati dua domain kehidupan, yaitu Bacteria dan Archaea. Kelompok mikroorganisme ini memiliki peran yang penting di alam dan sangat mudah tumbuh (*versatile*). Mereka berperan dalam berbagai siklus biogeokimia dan degradasi berbagai senyawa, baik senyawa alami maupun xenobiotik. Metabolisme yang dimiliki kelompok ini sangat beragam, seluruh jalur metabolisme yang dikenal pada makhluk hidup dapat ditemukan pada prokaryota. Mengingat pentingnya peranan prokaryota dalam menjaga stabilitas ekosistem, perlu dipahami keanekaragaman dan peranan komunitas mikroorganisme ini di alam. Walau mikroorganisme lebih berperan jika berada dalam suatu komunitas dibandingkan dengan jika berada sebagai individu yang berdiri sendiri (Buckley dan Schmidt, 2002), pengetahuan mengenai

spesies-spesies yang menyusun struktur komunitas penting untuk memahami keseluruhan sistem. Sampai saat ini masih menjadi perdebatan tentang definisi yang tepat untuk menggambarkan spesies pada prokaryota.

## DEFINISI SPESIES PROKARYOTA

Berbeda dengan hewan atau tumbuhan, penentuan definisi spesies pada prokaryota tidak mudah. Parameter yang dengan mudah digunakan untuk kelompok organisme lain sulit untuk diterapkan pada prokaryota. Prokaryota memiliki karakter khusus, berukuran mikroskopis dan memiliki struktur yang relatif sederhana. Beberapa definisi spesies untuk prokaryota dibuat berdasarkan parameter fenotipe dan genotipe untuk menggambarkan kekerabatan secara filogeni. Konsep spesies filogenetik lebih sesuai untuk diterapkan pada prokaryota dibandingkan dengan konsep spesies biologi karena kelompok ini bereproduksi secara aseksual. Definisi spesies untuk prokaryota yang diterima secara luas sampai saat ini adalah suatu kategori yang membatasi suatu kelompok dari isolat atau galur individual yang memiliki derajat kesamaan tinggi pada banyak ciri independen, terutama jika koheren secara genomik (Rosello-Mora dan Amann 2001). Perbandingan harus dilakukan dalam suatu uji yang terstandarisasi dengan baik.

Parameter morfologi jarang digunakan untuk mengkarakterisasi prokaryota, karena kesederhanaan struktur selnya. Pada kelompok prokaryota yang memiliki morfologi relatif kompleks, seperti cyanobacteria dan

## \* Alamat korespondensi:

Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126  
Tel./Fax.: +62-271-663375  
e-mail: artini\_pangastuti@yahoo.com

actinomycetes, penentuan spesies berdasar morfologinya dapat dilakukan. Morfologi masih digunakan dalam taksonomi bakteri, seperti pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteria* (Krieg dan Holt, 1984), walaupun hanya untuk membedakan takson yang lebih tinggi.

Berbeda dengan morfologi, fisiologi pada kelompok prokaryota sangat kompleks dan beragam. Fenotipe fisiologis umum digunakan sebagai parameter penentuan spesies pada prokaryota. Jalur metabolisme yang dimiliki dapat menggambarkan jarak evolusi suatu kelompok prokaryota. Hanya saja pendekatan ini sulit untuk dilakukan karena memerlukan isolat-isolat yang dapat dikulturkan di laboratorium. Sebagian besar prokaryota sampai saat ini tidak dapat dikulturkan pada medium buatan karena keterbatasan untuk dapat menyamai kondisi sesungguhnya di alam. Diperkirakan hanya sekitar 1% saja dari seluruh prokaryota yang ada di alam yang dapat dikulturkan di laboratorium.

Pendekatan genomik lebih sering digunakan untuk penentuan spesies pada prokaryota. Pendekatan ini memungkinkan juga untuk menganalisis spesies-spesies yang tidak dapat dikulturkan di laboratorium. Kemajuan teknologi telah memungkinkan untuk melakukan isolasi DNA atau RNA langsung dari sampel yang diperoleh langsung dari lingkungan, sehingga dapat diperoleh gambaran yang menyeluruh untuk suatu komunitas. Selain itu juga dimungkinkan untuk melakukan hibridisasi DNA-DNA secara *in situ*.

Parameter standar yang diakui untuk menggambarkan spesies pada prokaryota adalah adanya hibridisasi DNA-DNA sebesar 70% dan perbedaan suhu leleh ( $T_m$ ) sebesar 5°C. Dua isolat dapat dianggap sebagai satu spesies jika terdapat hibridisasi DNA-DNA lebih dari 70% serta perbedaan  $T_m$ -nya kurang dari 5°C. Walaupun cukup andal untuk penentuan spesies, teknik hibridisasi DNA-DNA memiliki keterbatasan. Teknik ini lambat, rumit, serta sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor fisik maupun kimia. Akibatnya, reproduibilitas metode ini rendah. Selain itu, datanya bersifat tidak kumulatif, karena memerlukan galur untuk referensi. Karena itu *The Ad-Hoc Committee for the Reevaluation of the Species Definition in Bacteriology* (Stackebrandt, 2002) mendorong pengembangan metode lain untuk mengungkapkan hubungan kekerabatan interspesies maupun intraspesies prokaryota.

Berbagai metode analisis DNA yang cepat telah diperkenalkan, antara lain yang menarget keseluruhan genom seperti AFLP (Savelkoul *et al.*, 1999), RAPD (Power, 1996), ERIC (Hulton *et al.*, 1991), BOX (Martin *et al.*, 1992), REP (Gilson *et al.*, 1984), dan PFGE (Tenover *et al.*, 1995). Analisis juga dapat menarget hanya suatu klaster gen seperti ribotyping pada operon *rrn* (Khetawat *et al.*, 1999), atau bahkan gen individual seperti ARDRA (Vogel *et al.*, 2003) dan T-RFLP (Dunbar *et al.*, 2001) pada gen penyandi 16S rRNA, *intergenic spacer regions/ISR* (Garcia-Martinez *et al.*, 1999), serta elemen genetik *mobile* (Gordon *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 1999).

Di antara berbagai teknik yang digunakan, RNA ribosomal paling banyak digunakan sebagai penanda molekuler. Pada prokaryota terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Di antara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis. Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk

menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem.

16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat unik dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Molekul ini juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik. Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies. Jika urutan basa 16S rRNA menunjukkan derajat kesamaan yang rendah antara dua taksa, deskripsi suatu takson baru dapat dilakukan tanpa hibridisasi DNA-DNA (Stackebrandt dan Goebel, 1995). Biasanya jika derajat kesamaan urutan basa gen penyandi 16S rRNA kurang dari 97% dapat dianggap sebagai spesies baru.

Analisis gen penyandi 16S rRNA praktis untuk definisi spesies, karena molekul ini bersifat unik, sehingga dapat dirancang suatu primer yang universal untuk seluruh kelompok. Penentuan spesies baru pun dapat dilakukan tanpa mengisolasi mikroorganisme yang bersangkutan. Taksa baru yang ditetapkan hanya berdasarkan data molekuler oleh *The International Committee on Systematic Bacteriology* diberi status provisional candidatus (Murray dan Stackebrandt, 1995).

## GEN PENYANDI 16S rRNA VERSUS PENGARUH LINGKUNGAN

Data urutan basa gen penyandi 16S rRNA memungkinkan digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik yang dapat menunjukkan nenek moyang dan hubungan kekerabatan organisme, tetapi organisme yang sekerabat atau identik berdasarkan parameter ini belum tentu memiliki kesamaan secara fisiologi (Ward, 2002). Hal ini disebabkan gen penyandi 16S rRNA bukan merupakan suatu gen yang fungsional untuk kelangsungan hidup dan adaptasi prokaryota pada lingkungan tertentu.

Ward (1998) mengamati fenomena adanya perbedaan secara ekologi dari suhu optimum yang dimiliki oleh mikrobia termofil dengan kurang dari 1% perbedaan urutan basa gen 16S rRNA, yang mendorongnya untuk mengajukan konsep spesies natural, yang merupakan adaptasi dari *ecological species concept* (ESC) dari Simpson (1961). ESC menggabungkan informasi peranan mikroorganisme dalam lingkungannya dengan informasi genetik, berdasarkan pemikiran bahwa fenotipe merupakan kombinasi dari ekspresi genetik dan pengaruh lingkungan. Pada bakteri dikenal ekotipe, yaitu kelompok yang menempati relung ekologi yang sama yang pemisahannya akibat seleksi alam. Jika ekotipe ini dianggap sebagai spesies, maka banyak bakteri yang ada selama ini akan naik tingkatannya menjadi genus (Cohan, 2002).

Untuk menggambarkan keanekaragaman dalam kaitannya dengan fungsi secara ekologi, diperlukan analisis suatu gen yang fungsional. Gen yang fungsional adalah gen yang mengkodekan suatu protein. Pada gen semacam ini, keragaman pada tingkat DNA tidak selalu menghasilkan keragaman pada tingkat protein karena adanya *third codon wobble*. Kurang diskriminatifnya gen penyandi 16S rRNA prokaryota dibandingkan dengan gen pengkode protein

adalah karena gen fungsional berevolusi lebih cepat dibandingkan dengan gen 16S rRNA, karena berhubungan erat dengan proses adaptasi (Avisé, 1994). Populasi yang berbeda secara ekologi mungkin baru saja berevolusi, dan perubahan ini baru dapat diakumulasikan pada lokus yang berevolusi secara cepat, sehingga belum sempat diakumulasikan pada gen yang konservatif seperti gen 16S rRNA (Palys *et al.*, 1997).

Taksa yang berkerabat sangat dekat sering memiliki kesamaan yang ekstrim pada gen penyandi 16S rRNA-nya. Ketidakmampuan analisis berdasarkan gen 16S rRNA untuk membedakan kelompok bakteri berkerabat dekat yang secara ekologi berbeda teramati pada kasus *Mycobacterium avium* dan *M. Intracellulare*. Keduanya memiliki sekuens gen 16S rRNA yang 99,8% identik (Boddinghaus *et al.*, 1990), tetapi keduanya dapat dibedakan menjadi kluster yang terpisah berdasarkan sekuens dua gen penyandi protein, yaitu *hsp* (Kapur *et al.*, 1995; Ros dan Belak, 1996) serta protein 32 kDa (Soini *et al.*, 1994).

Contoh kasus lain adalah pada *Bacillus globisporus* dan *B. psychrophilus* yang hampir identik berdasar sekuens 16S rRNA, yakni hanya memiliki perbedaan pada dua basa yang konsisten pada sekuens 16S rRNA (Fox *et al.* 1992; Suzuki dan Yamasato, 1994), tetapi kedua spesies ini memiliki beberapa perbedaan dalam beberapa karakter fenotipe seperti kondisi optimum untuk pertumbuhan, serta dapat dengan mudah dibedakan dengan reasosiasi DNA-DNA (Nakamura, 1984). Keduanya dapat dimasukkan ke dalam kluster yang berbeda berdasarkan urutan basa gen penyandi piruvat kinase dan alanin dehidrogenase (Palys *et al.*, 2000). Oleh karena itu, definisi spesies berdasarkan urutan basa gen 16S rRNA tidak cukup untuk menggambarkan keanekaragaman fungsional suatu komunitas prokaryota.

Beberapa gen fungsional telah digunakan dalam analisis dan terbukti dapat membedakan populasi yang secara ekologi berbeda, walaupun urutan basa gen 16S rRNA-nya serupa. Curtis *et al.* (2002) menggunakan analisis gen *amo* untuk menggambarkan keanekaragaman bakteri pengoksidasi ammonia (AOB, *ammonia oxidizing bacteria*). Kelompok AOB memiliki distribusi yang monofiletik berdasarkan gen 16S rRNA. Dalam kelompok ini hanya terdapat satu jalur untuk oksidasi ammonia yang diatur oleh gen *amo* (mengkodekan enzim ammonia monooksigenase). Hasilnya, populasi yang secara ekologi berbeda menunjukkan adanya keragaman pada urutan basa gen *amo*. Curtis menggunakan tingkat perbedaan sebesar 5% untuk menentukan spesies karena gen fungsional memiliki keragaman lebih besar dibandingkan dengan gen 16S rRNA. Sebagai perbandingan, manusia dengan simpanse memiliki perbedaan kurang dari 3% (Enard *et al.*, 2002), jauh lebih kecil dari definisi spesies untuk prokaryota.

Gen pengkode lain yang telah banyak digunakan untuk penentuan spesies adalah gen penyandi protein ribosomal, *Hsp60* (GroEL), *Hsp70* (DnaK), suksinil-CoA sintetase, pirofosfatase, Lon protease, biotin sintase, DNA gyrase B, UDP-glukosa epimerase, PAC-transformilase, dan RecA (Gupta, 2000). Tidak seperti gen penyandi 16S rRNA, belum banyak database yang dikembangkan untuk gen penyandi protein. Masih diperlukan identifikasi dan karakterisasi dari gen-gen penyandi protein untuk spesies-spesies yang telah lama dikenal maupun baru, untuk menyusun suatu database yang diperlukan jika parameter ini dijadikan sebagai prioritas dalam penentuan spesies prokaryota.

Perbandingan langsung gen 16S rRNA dengan gen fungsional pada kelompok mikroorganisme tidak selalu menunjukkan hasil yang konsisten, misalnya pada kelompok bakteri denitrifikasi. Kemampuan untuk melakukan proses denitrifikasi dimiliki oleh organisme dari 3 domain kehidupan, tetapi pada organisme yang terdapat pada satu kluster 16SrRNA, kemampuan ini tersebar secara sporadis (Zumft, 1997). Gen-gen fungsional yang terkait jalur denitrifikasi (menyandikan nitrit reduktase dan nitrooksida reduktase) menunjukkan keragaman urutan basa yang sangat tinggi, sehingga sulit untuk dijadikan suatu kronometer evolusi.

## TRANSFER GEN SECARA HORIZONTAL

Pengaruh lingkungan juga digambarkan oleh adanya transfer gen secara horizontal dalam suatu komunitas. Untuk organisme yang bereproduksi secara aseksual, diasumsikan bahwa taksa pada prokaryota bersifat monofiletik, tetapi pada taksa ini terdapat fenomena umum berupa terjadinya rekombinasi genetik antar kelompok yang tidak sekerabat. Transfer gen semacam ini telah diketahui sejak tahun 1928. Transfer gen dapat terjadi langsung melalui kontak antar sel (konjugasi) maupun dengan perantara virus (transduksi). Bahkan sel bakteri juga memiliki kemampuan untuk mengambil molekul DNA bebas yang ada di lingkungannya. Hal ini merupakan salah satu penyebab tingginya laju mutasi pada genom bakteri.

Gen yang umumnya dipertukarkan dalam komunitas biasanya berhubungan dengan kemampuan kelangsungan hidup, misalnya gen penyandi resistensi terhadap antibiotik, logam berat, serta fiksasi nitrogen. Gen-gen tersebut biasanya berukuran kecil, fungsional, dan adaptif. Tetapi beberapa penelitian akhir-akhir ini menunjukkan bahwa transfer gen secara horizontal ternyata lebih umum terjadi daripada yang diperkirakan. Sistem gen integrase yang berfungsi untuk memfasilitasi pertukaran gen, ternyata umum dimiliki oleh banyak kelompok bakteri, bersama dengan gen fungsional yang diperoleh dengan cara ini (Mazel *et al.* 1998).

Transfer gen secara horizontal teramati pada gen *hrp*, yang berfungsi dalam interaksi patogen dengan inang dan dapat ditemukan pada berbagai sub kelas proteobacteria. Gen ini diduga diperoleh melalui pertukaran gen secara horizontal daripada melalui pewarisan oleh tetua (Gabriel, 1999). Pada *Escherichia coli* (Milkman dan Bridges, 1993) dan *Pseudomonas* (Haubold dan Rainey, 1996) transfer gen semacam ini sangat sering terjadi, bahkan pada *E. coli* diperkirakan sekitar 18% dari total genomnya merupakan hasil integrasi gen yang ditransfer secara horizontal (Lawrence dan Ochman, 1998). Pada bakteri pemfiksasi nitrogen, lebih dari 5% bagian kromosom merupakan hasil pertukaran gen dan sebagian besar berhubungan dengan fungsi simbiosis (Sullivan dan Ronson, 1998).

Transfer gen secara horizontal berpotensi untuk meningkatkan kemampuan adaptasi di lingkungan yang baru. Dubnau (1999) menyimpulkan bahwa integrasi gen asing pada bakteri gram negatif maupun gram positif berfungsi untuk menciptakan keragaman genetik, yang kemudian diekspresikan menjadi keragaman fenotipe, untuk mempertahankan kebugaran evolusioner dari populasi. Selanjutnya stabilitas gen asing ini dipertahankan dengan seleksi alam, gen yang sesuai dengan lingkungan akan dipertahankan, sedangkan yang tidak diinginkan akan cenderung dipertukarkan lagi. Adanya sekuens gen yang tidak diinginkan pada spesies bakteri tertentu akan

mendukung terjadinya pertukaran gen tersebut (Lan dan Reeves, 1996).

Dengan adanya transfer gen secara horizontal ini maka spesies dan genus bakteri sebaiknya dilihat sebagai kelompok organisme yang memiliki suatu inti struktur kromosom yang umum dimiliki kelompok tersebut dengan kemungkinan bahwa individu berpotensi menerima gen apa pun dari kelompok yang tidak sekerabat. Pandangan bahwa taksa bakteri bersifat monofiletik perlu ditinjau kembali. Spesies harus didefinisikan kembali dengan pendekatan yang juga menggabungkan adanya pengaruh lingkungan.

### PERLUNYA PENDEKATAN MULTILOKUS

Perbedaan antara populasi yang berbeda secara ekologi dapat dilihat dengan analisis gen-gen yang terletak pada lokus yang tidak berpautan, yang dikenal sebagai teknik *multiple locus sequence typing* (MLST). Teknik ini berkembang dari teknik *multi locus enzyme electrophoresis* (MLEE) yang digunakan untuk melihat keragaman alel enzim. Prinsip dari MLST adalah, galur atau klon yang berada dalam satu klaster yang sama berdasarkan sekuens tertentu (misalnya klaster A) akan memiliki frekuensi yang lebih tinggi untuk terjadinya transfer gen horizontal di antara gen-gen ortologus dibanding dengan galur atau klon dari klaster lain (misalnya klaster B). Dengan tidak adanya rekombinasi akibat pertukaran gen di antara klon A dan klon B maka dapat diasumsikan bahwa kedua klon telah mencapai level isolasi tertentu hingga dapat dianggap sebagai suatu spesies (Lan dan Reeves, 2001). Pendekatan dilakukan secara multi lokus karena ada kemungkinan terjadi rekombinasi homolog antar taksa yang berbeda yang dapat mengubah keragaman urutan basa pada lokus tunggal (Gutman dan Dykhuysen, 1994). Pengaruh rekombinasi akan berkurang dengan dilakukannya analisis pada dua atau lebih lokus yang tidak berpautan.

Pendekatan ini dapat mengungkap kekerabatan genomik interspesies dan intraspesies dengan melakukan analisis urutan basa dari gen-gen yang disebut *housekeeping gene*, yang merupakan target dari seleksi stabilisasi. Pada teknik ini, digunakan lokus yang memiliki sifat sangat variatif yang menyandikan enzim-enzim *housekeeping*. *Housekeeping gene* merupakan gen-gen yang fungsional dan mengkodekan protein. Gen-gen yang sering digunakan untuk MLST, antara lain DMSO reduktase rantai A, glutamine sintetase, fosfomannomutase, aspartokinase, thymidilat kinase, dan anthranilat sintase komponen A (Achtmann *et al.*, 1999).

Pada awalnya MLST lebih banyak digunakan untuk studi epidemiologi, untuk isolat-isolat klinis seperti *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998). MLST mulai digunakan juga untuk studi ekologi. MLST terbukti dapat membedakan populasi yang berbeda secara ekologi. MLST yang dilakukan pada 36 isolat archaea *Pyrococcus* yang berasal dari sistem hidrotermal berbeda di Samudera Pasifik dan Laut Mediterania menunjukkan bahwa populasi dari lokasi geografi yang berbeda ternyata berdiferensiasi secara genetik (Escobar-Paramo *et al.*, 2005). Jika dibandingkan dengan analisis gen penyandi 16S rRNA, MLST lebih diskriminatif, tetapi dalam beberapa hal kurang aplikatif. Tidak seperti pada analisis gen penyandi 16S rRNA yang dapat diamplifikasi dengan satu primer universal, gen pengkode protein untuk MLST memiliki laju mutasi yang lebih tinggi sehingga primer baru dengan nukleotida "wobble" perlu dikembangkan. Berbagai set gen berbeda

perlu dikembangkan untuk pengenalan koherensi genomik secara optimal.

Selain itu, sulit untuk menyamai karakteristik universalitas dari gen penyandi 16S rRNA. Hanya sedikit gen, diperkirakan jumlahnya sekitar 100 gen, yang keberadaannya bersifat universal pada bakteri (Santos dan Ochman, 2004; Koonin, 2003). Penggunaan lebih dari satu gen juga akan menimbulkan masalah praktis dalam pengerjaan, misalnya saja untuk mensekuens seluruh gen akan membutuhkan waktu, biaya, dan tenaga yang lebih besar, sehingga perlu diatasi menggunakan teknik-teknik yang menghilangkan keharusan untuk mengklon dan mensekuens gen, seperti *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) dan *terminal restriction fragment length polymorphism* (TRFLP).

### PENUTUP

Menurut Young (2001) perubahan evolusioner diasumsikan terjadi melalui seleksi alam dari mutasi dalam genom yang relatif stabil. Pengaruh lingkungan berfungsi untuk menginduksi perubahan, sehingga stabilitas merupakan fungsi dari struktur genom. Perubahan evolusi merupakan hasil dari tekanan lingkungan. Genom prokaryota sangat mudah mengalami mutasi karena secara alami laju mutasinya tinggi dan ditambah oleh adanya transfer gen horizontal. Seleksi alam memegang peran utama dalam mempertahankan stabilitas suatu taksa yang telah ada atau menghasilkan perubahan adaptasional yang akan menuju evolusi suatu taksa baru.

Lingkungan memiliki andil cukup signifikan dalam evolusi prokaryota. Perlu atau tidaknya suatu definisi spesies yang juga dapat menggambarkan keanekaragaman fungsional di alam ini berpulang kembali kepada tujuan akhir dari sistematik, misalnya untuk membuat pengelompokan atau mengungkap keanekaragaman di alam. Keanekaragaman prokaryota tidak dapat hanya dilihat sebagai kumpulan spesies-spesies, tetapi juga merupakan kumpulan peran ekologi dan interaksi antar spesies yang menyusunnya.

Penggunaan analisis gen 16S rRNA sebagai satu-satunya pendekatan untuk definisi spesies pada prokaryota dapat menunjukkan hubungan kekerabatan, tetapi tidak dapat menggambarkan keanekaragaman prokaryota di alam. Untuk dapat memahami efek keanekaragaman terhadap fungsi ekosistem, suatu definisi spesies yang dapat menggambarkan fungsinya secara ekologi diperlukan. Penggunaan analisis gen penyandi protein pada multilokus dapat dijadikan kriteria utama dalam penentuan taksa. Pencarian dan pencirian berbagai gen penyandi protein yang baru dan membuat suatu database yang memadai mendesak untuk dilakukan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Achtmann, M., K. Zurth, G. Morelli, F.G. Torrea, A. Gulyoule, and E. Carniel. 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceeding of the National Academic of Science U.S.A.* 96: 14043-14048.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Boddinghaus, B., J. Wolters, W. Heikens, and E.C. Bottger. 1990. Phylogenetic analysis and identification of different serovars of *Mycobacterium intracellulare* at the molecular level. *FEMS Microbiology Letter* 70: 197-204.
- Buckley, D. and T. Schmidt. 2002. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* 42: 11-21.

- Cohan, F.M. 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology* 56: 457-487.
- Curtis, T.P., W.T. Sloan, and J.W. Scannell. 2002. From the cover: estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceeding of the National Academic of Science U.S.A.* 99: 10494-10499.
- Dubnau, D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 53: 217-244.
- Dunbar, J., O.L. Ticknor, and C.R. Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragments profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 190-197.
- Enard, W., P. Khaitovich, J. Klose, S. Zollner, F. Heissig, P. Giavalisco, K. Nieselt-Struwe, E. Muchmore, A. Varki, R. Ravid, et al. 2002. Intra- and inter-specific variation in primate gene expression pattern. *Science* 296: 340-343.
- Escobar-Paramo, P., S. Gosh, and J. DiRuggiero. 2005. Evidence for genetic drift in the diversification of a geographically isolated population of hyperthermophilic archaeon **Pyrococcus**. *Molecular Biology Evolution* 22 (11): 2297-2303.
- Fox, G.E., J.D. Wisotzkey, and Jurtschuk Jr. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 42: 166-170.
- Gabriel, D.W. 1999. Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiology & Molecular Plant Pathology* 55: 205-214.
- Garcia-Martinez, J., S.G. Acinas, A.I. Anton, and F. Rodriguez-Valera. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiology Methods* 36: 55-64.
- Gilson, E., J.M. Clement, D. Brutlag, and M. Hofnung. 1984. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in **E. coli**. *EMBO Journal* 3: 1417-1421.
- Gordon, S.V., B. Heyrn, J. Parkhill, B. Barrell, and S.T. Cole. 1999. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of **Mycobacterium tuberculosis** H37Rv. *Microbiology* 145: 881-892.
- Gupta, R.S. 2000. The phylogeny of proteobacteria: relationship to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Review* 24: 367-402.
- Guttman, D.S. and D. E.Dykhuysen. 1994. Clonal divergence in **Escherichia coli** is a result of recombination, not mutation. *Science* 266: 1380-1383.
- Haubold, B. and P.B.Rainey. 1996. Genetic and ecotypic structure of a fluorescent **Pseudomonas** population. *Molecular Ecology* 5: 747-761.
- Hulton, C.S., C.F. Higgins, and P.M. Sharp. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of **Escherichia coli**, **Salmonella typhimurium** and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5: 825-834.
- Kapur, V., L.L. Li, M.R. Hamrick. 1995. Rapid **Mycobacterium** species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in **Mycobacterium tuberculosis** by automated DNA sequencing. *Archives of Pathological Laboratory Medicine* 119: 131-138.
- Khetawat, G., R.K. Bhadra, S. Nandi, and J. Das. 1999. Resurgent **Vibrio cholerae** O139: reorganization of cholera toxin genetic elements and amplification of *rrn* operon. *Infection Immunology* 67: 148-154.
- Koonin, E.V. 2003. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last common universal ancestor. *Natural Review of Microbiology* 1: 127-136.
- Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Lan, R. and P.R. Reeves. 1996. Gen transfer is the major factor in bacterial evolution. *Molecular Biology Evolution* 13: 47-55.
- Lan, R. and P.R. Reeves. 2001. When does a clone deserve a name? a perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends in Microbiology* 9: 419-424.
- Lawrence, J.G. and H. Ochman. 1998. Molecular archaeology of **Escherichia coli** genome. *Proceeding of the National Academic of Science U.S.A.* 95: 9413-9417.
- Maiden, M.C.J., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russel, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtmann, and B.G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within population of pathogenic organisms. *Proceeding of the National Academic of Science U.S.A.* 95: 3140-3145.
- Martin, B., O. Humbert, and M. Camara. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosomes of **Streptococcus pneumoniae**. *Nucleic Acid Research* 20: 3479-3483.
- Mazel, D., B. Dychinco, V.A. Webb, and J. Davies. 1998. A distinctive class of integrin in **Vibrio cholerae** genome. *Science* 280: 605-608.
- Milkman, R. and M.M. Bridges. 1993. Molecular evolution of **Escherichia coli** chromosome. *Genetics* 133: 455-468.
- Murray, R.G.E. and E. Stackebrandt. 1995. Taxonomic notes: implementation of the provisional status **Candidatus** for incompletely describes prokaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 186-187.
- Nakamura, L.K. 1984. **Bacillus psychrophilus** sp. nov., nom.rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 121-123.
- Palys, T., L.K. Nakamura, and F.M. Cohan. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 1145-1156.
- Palys, T., E. Berger, I. Mitrica, L.K. Nakamura, and F.M. Cohan. 2000. *International Journal of Systematic Bacteriology* 50: 1021-1028.
- Papadopoulos, D., D. Scheneider, J. Meier-Eiss, W. Arber, R.E. Lenski, and M. Blot. 1999. Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proceeding of the National Academic of Science U.S.A.* 96: 3807-3812.
- Power, E.G. 1996. RAPD typing in microbiology: a technical review. *Journal of Hospital Infection* 34: 247-265.
- Ros, C. and K. Belak. 1996. Detection and identification of **Mycobacteria** in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2351-2355.
- Rosello-Mora, R. and R. Amann. 2001. The species concepts for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review* 25: 39-67.
- Santos, S.R. and H. Ochman. 2004. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and protein. *Environmental Microbiology* 6: 754-759.
- Savelkoul, P.H., H.J. Aarts, J. De Haas, L. Dijkshoorn, B. Duin, M. Otsen, J.L. Rademaker, L. Schouls, and J.A. Lenstra. 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3083-3091.
- Simpson, G.G. 1961. *Principles of Animal Taxonomy*. New York: Columbia University Press.
- Soini, H., E.C. Bottger, and M.K. Viljanen. 1994. Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 2944-2947.
- Stackebrandt, E. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* 52: 1043-1047.
- Stackebrandt, E. and B.M.Goebel. 1995. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849.
- Sullivan, J.T. and C.W. Ronson. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-Kb symbiosis island that integrates into a Phe-tRNA gene. *Proceeding of the National Academic of Science U.S.A.* 95: 5145-5149.
- Suzuki, T. and K.Yasamoto. 1994. Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Lett.* 115: 13-17.
- Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2233-2239.
- Vogel, J., P. Normand, J. Thioulouse, X. Nesme, and G.L. Grundmann. 2003. Relationship between spatial and genetic distance in *Agrobacterium* spp. In 1 cubic centimeter of soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1482-1487.
- Ward, D.M. 1998. A natural species concepts for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* 1: 271-277.
- Young J.M. 2001. Implication of alternative classification and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* 51: 945-953.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Review* 61: 533-616.