

ULAS BALIK

Evolusi Mikroba dan Kaitannya dengan Sistemik Molekuler

ANTONIUS SUWANTO

*Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144
dan PAU Bwteknologi IPB, Kotak Pos 1, Darmaga, Bogor 16610*

Diterima 11 Mei 1994/Disetujui 31 Agustus 1994

PENDAHULUAN

Dengan pencacah radioaktif, para pakar geologi memperkirakan bahwa umur bumi sekitar 4.6 miliar tahun. Air cair sudah ada sekitar empat miliar tahun yang lalu, yang memungkinkan perkembangan yang pesat dan menjadi syarat mutlak untuk menyokong semua kehidupan di bumi. Bukti-bukti fosil mikroba pada stromatolit, yaitu lapisan massa mikroba prokariot berfilamen yang terperangkap dalam sedimen, menunjukkan bahwa sudah ada kehidupan sedikitnya pada 3.5 miliar tahun yang lalu. Stromatolit yang berumur lebih tua dari 2.5 miliar tahun diperkirakan hanya terdiri dari fototrof anoksigen (bakteri ungu dan hijau), karena kondisi bumi pada waktu itu masih anaerob. Sedangkan stromatolit yang lebih muda umumnya terdiri dari sianobakter. Bukti-bukti fosil tersebut juga menunjukkan bahwa prokariot telah menampilkan keragaman morfologi yang luar biasa antara 2-3 miliar tahun yang lalu (Brock dan Madigan, 1991).

Kondisi atmosfer bumi yang masih primitif bersifat anaerob sehingga merupakan lingkungan yang tereduksi. Selain uap air, gas-gas lain yang terdapat dalam jumlah banyak ialah CH_4 , CO_2 , N_2 , dan NH_3 . Sedangkan CO , H_2 , dan H_2S hanya terdapat dalam jumlah sedikit sekali. Pada waktu bumi masih berumur setengah miliar tahun, temperatur bumi diperkirakan lebih dari 100°C (Brock dan Madigan, 1991), sehingga air cair mungkin tidak terdapat di bumi pada waktu itu sampai suhu bumi menjadi lebih dingin (Woese, 1979). Oleh karena itu organisme termofil atau setidaknya termotoleran sangat mungkin merupakan penghuni-penghuni bumi yang pertama (Woese, 1987).

Radiasi ultraviolet dari matahari, halilintar, radioaktif, dan energi termal dari aktivitas gunung berapi merupakan energi yang mendorong terbentuknya senyawa-senyawa organik dari lingkungan bumi yang tereduksi. Berbagai macam molekul biokimia yang penting seperti gula, asam amino, purin, pirimidin, berbagai nukleotida, dan asam lemak dapat terbentuk; demikian juga polimer dari beberapa molekul-molekul tersebut (Corliss et al., 1981). Oleh karena itu, bumi yang primitif menjadi tempat penumpukan bahan organik (semacam kaldu nutrisi) yang menjadi dasar untuk memulai evolusi biologi.

ORGANISME PRIMITIF

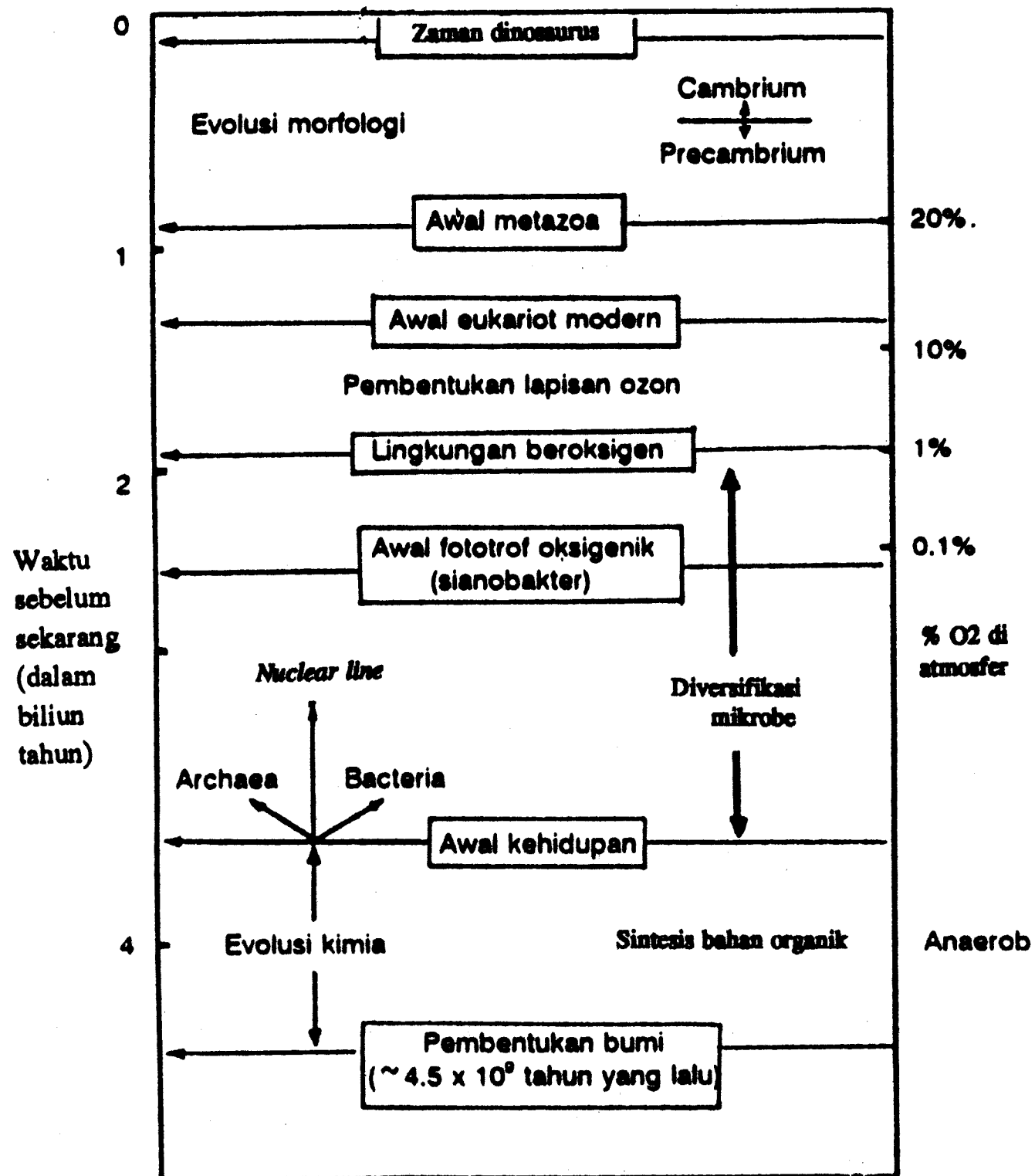
Seperti apakah bentuk organisme yang pertama? Meskipun ada berbagai teori tentang pembentukan organisme yang pertama, yang jelas tiap organisme harus memiliki sifat-sifat

berikut: (i) *metabolisme*, yaitu kemampuan mengakumulasi, mengubah, dan mentransformasikan nutrisi dan energi; dan (ii) *mekanisme pewarisan sifat*, yaitu kemampuan untuk bereplikasi dan memindahkan sifat-sifatnya pada keturunannya. Kedua karakter tersebut memerlukan adanya struktur seluler. Struktur tersebut diduga terbentuk karena agregasi spontan dari molekul-molekul lipid dan protein. Agregat tersebut kemudian membentuk struktur membran yang melingkupi sejumlah polinukleotida, polipeptida, dan senyawa lain (Corliss et al., 1981). Dengan demikian organisme pemula (primordial) tersebut mestinya mempunyai struktur yang amat sederhana yang mirip dengan sel prokariot dan juga bergantung pada cara-cara yang sangat sederhana dalam produksi energi maupun mekanisme replikasinya (Brock dan Madigan, 1991).

Adanya fosil mikroba yang ditemukan pada batuan berumur 3.5 miliar tahun menunjukkan bahwa awal kehidupan mulai terbentuk antara 3.5 dan 3.8 miliar tahun yang lalu (Corliss et al., 1981). Karena air cair diperkirakan ada sejak 4.0-4.2 miliar tahun yang lalu, maka pembentukan organisme pemula berlangsung sangat cepat (200-400 juta tahun) setelah bumi menjadi lebih dingin (ada air cair).

Metabolisme primitif mungkin anaerob dan organotrof, fototrof, atau litotrof. Namun, karena organisme tersebut harus sederhana secara biokimia, maka metabolisme yang paling mungkin adalah fermentatif organotrof (Brock dan Madigan, 1991). Setelah organisme tersebut dapat membentuk senyawa porfirin, mulailah terjadi perubahan gaya produksi energi dari fermentatif ke litotrof dan fotosintetik. Pada mulanya fotosintesis hanya bersifat anoksigen, yang berlanjut dengan ditemukannya dua macam fotosistem yang menjadi ciri organisme fotosintetik oksigen. Produksi oksigen oleh organisme fotosintetik oksigen membuat bumi menjadi semakin teroksidasi. Meskipun demikian awal eukariot modern dan metazoa baru mulai terbentuk setelah konsentrasi oksigen di bumi memungkinkan terbentuknya lapisan ozon (sekitar 2-1 miliar tahun yang lalu). Kelompok dinosaurus baru terdapat di bumi sekitar 180 juta tahun yang lalu (Gambar 1).

Dari kronologi evolusi yang telah diuraikan sebelumnya, dapat dilihat bahwa metazoa hanya menempati kurang dari seperempat sejarah bumi sedangkan mikroorganisme menempati hampir seluruh sejarah bumi. Oleh karena itu keragaman metabolisme yang luar biasa pada mikroorganisme merupakan hasil evolusi yang sudah berlangsung setua umur bumi itu sendiri (Woese, 1994).



Gambar 1. Tonggak Sejarah dalam Evolusi Biologi (Brock dan Madigan, 1991)

Metazoa secara tradisional menjadi obyek yang penting dalam memahami evolusi karena banyaknya fosil yang ditinggalkannya. Meskipun mikroba menduduki bagian yang penting untuk merunut asal-usul kehidupan, bukti fosil mikroba lebih sulit dianalisis. Namun sekitar sepuluh tahun terakhir ini perkembangan biologi molekuler telah mengubah pandangan orang dalam memahami evolusi biologi. Teknik-teknik baru yang berdasarkan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mampu menampilkan keragaman mikroorganisme yang *viable but non-culturable* (Steffan dan Atlas, 1991; Stahl, 1993). Diperkirakan hanya satu persen saja dari seluruh mikroba yang ada, yang dapat dipelajari karena dapat dibiakkan di laboratorium. Perkembangan ini sangat pesat dan telah memberikan banyak pandangan baru mengenai evolusi mikroba dan upaya lebih memahami awal terbentuknya organisme.

RNA RIBOSOM (rRNA) SEBAGAI KRONOMETER EVOLUSI

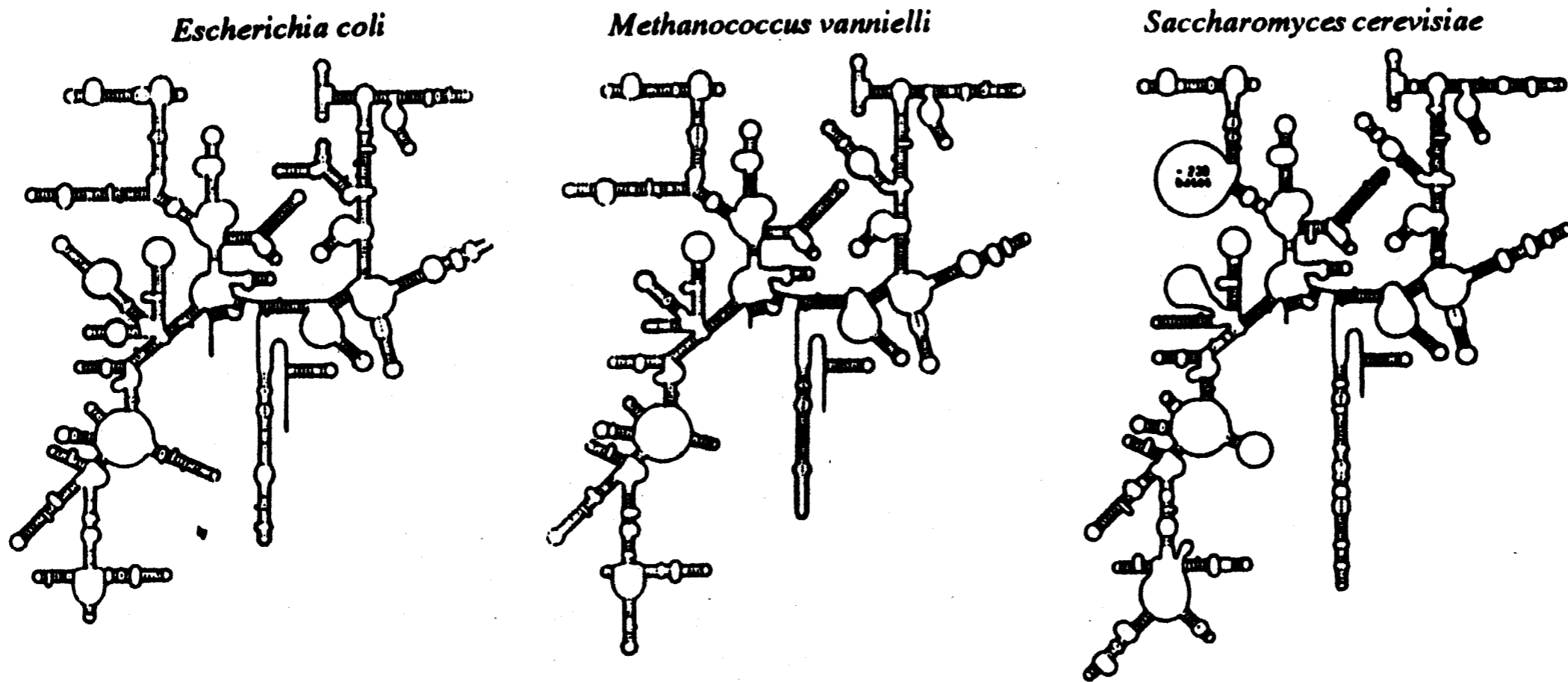
Dari pelajaran biologi umum kita tahu bahwa padi lebih sekerabat dengan jagung dibandingkan antara padi dengan kedelai. Hal ini antara lain berdasarkan sifat keping bijinya. Padi dan jagung sama-sama berkeping satu (monokotil) sedangkan biji kedelai berkeping dua (dikotil). Pengelompokan berdasarkan keping biji ini sangat berguna untuk klasifikasi tanaman, khususnya Angiospermae. Demikian juga pada klasifikasi hewan, kita bisa mengatakan bahwa gajah lebih sekerabat dengan kelelawar dibandingkan antara gajah dengan kupu-kupu karena gajah dan kelelawar sama-sama bertulang belakang (Vertebrata), sedangkan kupu-kupu termasuk hewan yang tidak bertulang belakang.

Sifat keping biji dan ada tidaknya tulang belakang dapat menjadi kriteria klasifikasi organisme dalam kelompoknya saja. Kriteria tersebut tidak dapat menerangkan atau menjawab pertanyaan mengenai klasifikasi yang sifatnya universal. Sebagai contoh: Manakah yang lebih sekerabat, padi dengan gajah atau padi dengan kupu-kupu? Jelaslah bahwa penampilan morfologi yang hanya dimiliki oleh kelompok tertentu saja tidak akan mampu menjawab pertanyaan yang lebih universal yang mengarah pada klasifikasi filogenik (Woese *et al.*, 1990; Wheelis *et al.*, 1992). Untuk menentukan kekerabatan evolusi antar spesies dalam keseluruhan sistem biologi diperlukan parameter yang memenuhi persyaratan sebagai berikut: (i) terdapat pada semua makhluk hidup, (ii) fungsinya identik, (iii) dapat dibandingkan secara obyektif, dan (iv) parameter tersebut berubah sesuai dengan jarak evolusinya, sehingga dapat dijadikan kronometer (tolak ukur kronologi) evolusi yang andal (Woese, 1987).

Semua sel melakukan sintesis protein, dan proses translasi itu sendiri termasuk proses universal yang sudah kuno. Oleh karena itu piranti dalam biosintesis protein dapat digunakan untuk melakukan sistematik molekuler. Salah satu piranti dalam proses tersebut ialah ribosom, yang merupakan struktur supramolekuler yang terdiri dari protein dan RNA ribosom (rRNA). Pada prokariot, dan juga kloroplas dan mitokondria, terdapat tiga macam rRNA, yaitu 5S, 16S, dan 23S. Molekul rRNA yang besar, rRNA 16S dan 23S (kira-kira 1500 dan 3000 nukleotida panjangnya) mempunyai beberapa daerah dengan sekuen yang konservatif dan juga daerah yang sekuen-sekuennya sangat bervariasi (Gambar 2). Perbandingan sekuen yang konservatif pada molekul rRNA 16S sangat berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetika universal karena untuk keperluan tersebut dibutuhkan molekul yang berubahnya relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, sekuen pada rRNA 16S yang bersifat hipervariabel banyak digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies.

Molekul rRNA 5S telah digunakan untuk pengukuran filogenetik, namun ukurannya yang kecil (~ 120 nukleotida) membatasi informasi yang dapat diperoleh dari molekul tersebut. Sebaliknya, meskipun banyak informasi yang dapat dipelajari dari sekuen rRNA 23S tetapi karena panjangnya sekuen, pemakaian molekul ini menjadi tidak praktis. Oleh karena itu rRNA 16S menjadi molekul pilihan yang lebih banyak digunakan untuk melacak filogeni prokariot dan eukariot. Lebih dari 600 sekuen rRNA 16S berbagai organisme telah digunakan untuk mengonstruksi kekerabatan filogenetik. Pekerjaan ini dipelopori oleh Profesor Carl Woese dari *University of Illinois* di Amerika Serikat sekitar tahun 1970-an. Sistem tersebut sekarang sudah banyak dipakai oleh berbagai kelompok sistematik molekuler di seluruh dunia.

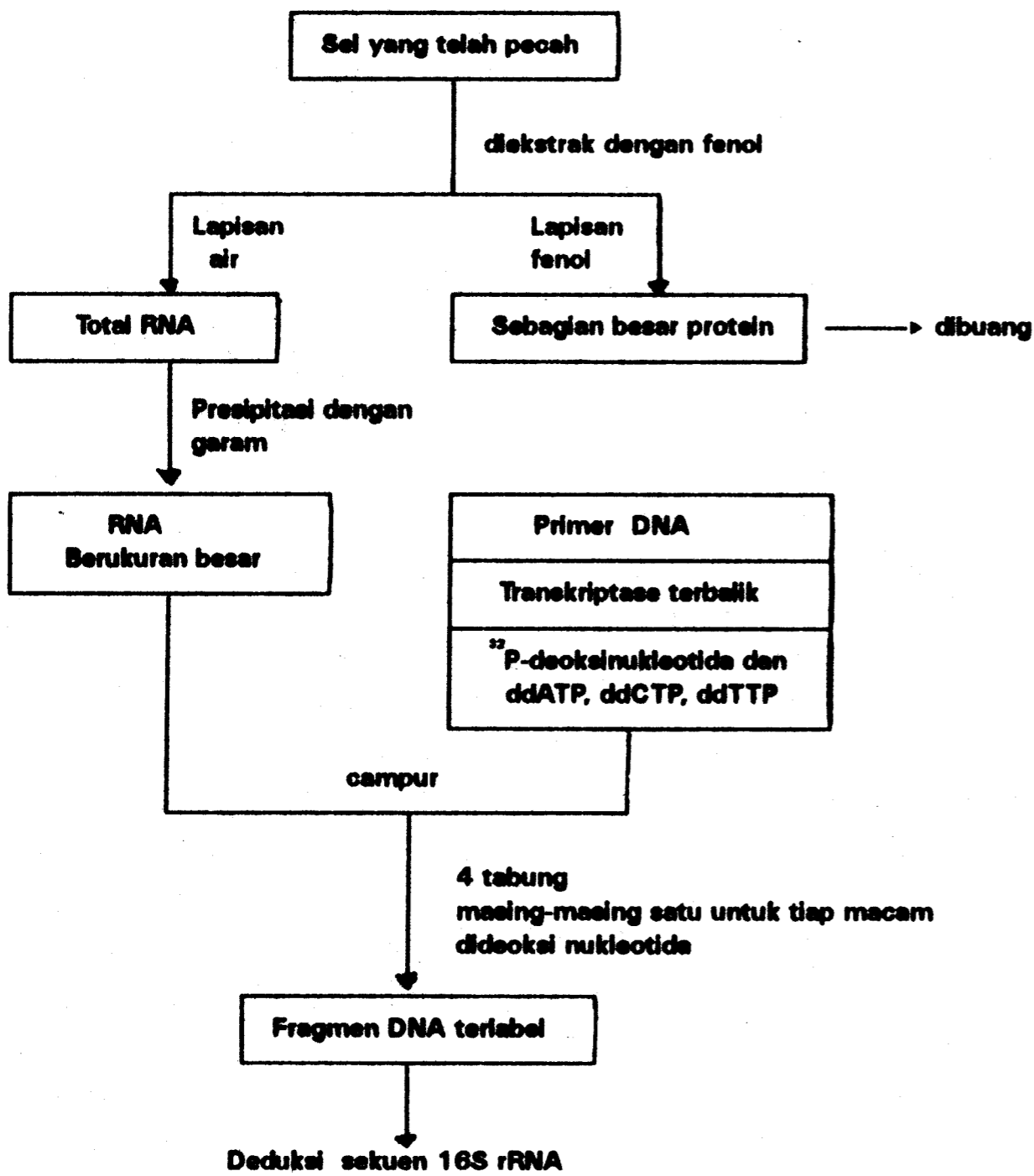
Sekuen rRNA saat ini relatif mudah untuk dianalisis karena molekul ini dapat disekuensi langsung dari ekstrak sel kasar dengan menggunakan metode transkriptase terbalik dan *dideoxy sequencing* (Gambar 3). Ekstraksi RNA biasanya menggunakan fenol, selanjutnya RNA diendapkan dengan alkohol dan kemudian ditambahi oligonukleotida primer untuk mensintesis DNA utas tunggal. Oligonukleotida yang dipakai antara 15-20 nukleotida panjangnya dengan sekuen yang komplementer pada bagian yang paling konservatif pada molekul rRNA 16S. Dalam campuran reaksi tersebut ditambahi ³²P-deoksiadenosin trifosfat serta deoksiribonukleotida lain



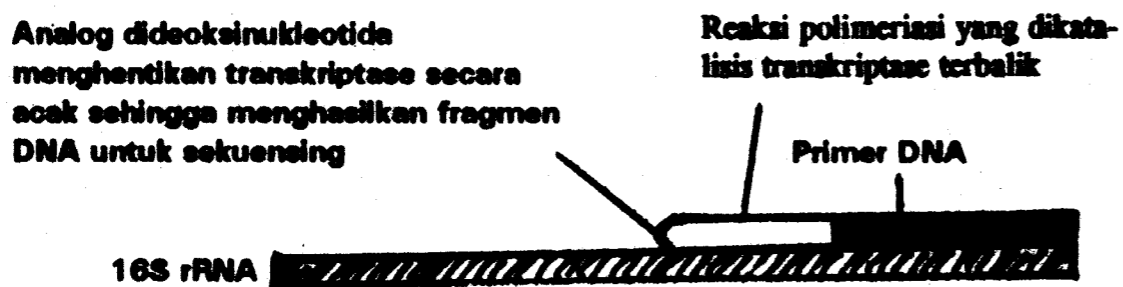
Gambar 2. Struktur Sekunder rRNA 16S Mewakili Bacteria (*Escherichia coli*), Archaea (*Methanococcus vannielii*), dan Eucarya (*Saccharomyces cerevisiae*). Titik-titik pada *E. coli* dan *M. vannielii* menunjukkan posisi atau daerah yang membedakan antara Bacteria dan Archaea (Woese, 1987)



a. Sel disentrifus (300-500 mg berat basah), kemudian dipecah dalam medium yang mengandung DNase. Semua DNA dihancurkan pada tahap ini.



b. Persiapan pelabelan fragmen cDNA untuk penentuan sekuen 16S rRNA



Gambar 3. Isolasi rDNA 16S dengan Transkriptase Terbalik dan Penentuan Sekuennya dengan Metode Sanger

yang tidak dilabel. Setelah transkriptase terbalik ditambahkan, campuran ini dibagi menjadi empat bagian yang sama. Pada setiap porsi ditambah sejumlah 2'-3' dideoksinukleotida yang berbeda (ddATP, ddCTP, ddGTP, dan ddTTP). Transkriptase terbalik akan membaca templat rRNA 16S dan mulai membuat DNA yang terinterupsi pada berbagai situs karena penyisipan dideoksinukleotida. Fragmen-fragmen DNA yang terbentuk kemudian disekuon dengan cara *dideoxy sequencing* (Metode Sanger). Dari hasil sekuen cDNA ini dapat dideduksi sekuen rRNA 16S asalnya (Pace *et al.*, 1985).

KONSTRUKSI POHON FILOGENETIK

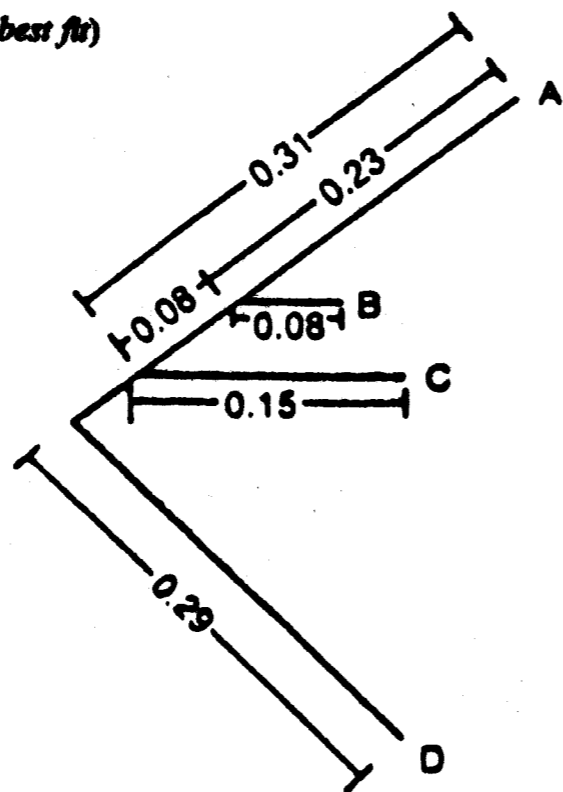
Metode yang disukai untuk menghasilkan pohon-pohon filogenetik dari sekuen rRNA yang lengkap adalah metode matriks jarak. Dua sekuen molekul rRNA dipadankan, lalu jarak evolusi (*evolutionary distance*, E_D) dihitung dari perbedaan antara kedua sekuen pada posisi yang sama. Suatu faktor koreksi statistik dipakai untuk memperhitungkan kemungkinan bahwa berbagai perubahan telah terjadi selama evolusi tapi menghasilkan sekuen yang sama. Matriks jarak evolusi yang diperoleh dari perbandingan sekuen tersebut kemudian dimasukkan ke dalam program komputer yang akan mendisain pohon filogenetik dari hasil pengukuran-pengukuran nilai E_D . Disain komputer ini pada prinsipnya mencari pohon filogenetik yang secara optimal sesuai dengan data yang diperoleh. Jarak evolusi yang memisahkan dua organisme setara dengan total panjang cabang-cabang pohon yang memisahkan keduanya. Prinsip konstruksi pohon filogenetik berdasarkan nilai E_D ini diperlihatkan pada Gambar 4 (Brock dan Madigan, 1991). Dengan makin banyaknya data sekuen, maka analisis pohon matriks jarak akan menjadi terlalu kompleks sehingga hampir semua pohon filogenetik dihasilkan dengan bantuan komputer. Bahkan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik pada Gambar 4 itu saja diperlukan bantuan komputer.

Analisis sekuen rRNA juga dapat mengungkapkan sekuen tanda tangan (*signature sequences*), yaitu urutan basa pada oligonukleotida yang unik pada setiap kelompok organisme. Sekuen tanda tangan untuk tiap kelompok utama makhluk hidup telah diketahui. Sekuen-sekuen tersebut terdapat pada daerah tertentu pada molekul rRNA 16S (Gambar 2). Sekuen tanda tangan yang unik ini sangat berguna untuk menempatkan organisme yang tidak dikenal ke dalam kelompok utama filogeni (Woese, 1987; Stahl, 1993; Gutell *et al.*, 1994).

Organisme	Sekuen
A	C G U A G A C C U G A C
B	C C U A G A G C U G G C
C	C C A A G A C G U G G C
D	G C U A G A U G U G C C

Jarak evolusi	Jarak evolusi dengan faktor koreksi
E_0 A \rightarrow B	0.25
E_0 A \rightarrow C	0.33
E_0 A \rightarrow D	0.42
E_0 B \rightarrow C	0.25
E_0 B \rightarrow D	0.33
E_0 C \rightarrow D	0.44

Pohon filogenik (Computer generated best fit)



Gambar 4. Konstruksi Pohon Filogenetik Berdasarkan Metode Matriks Jarak dari Sekuen Lengkap rRNA 16S (Brock dan Madigan, 1991)

FILOGENI MIKROBE

Sebelum tahun 1970-an, semua bakteri diklasifikasikan dalam satu kelompok besar, *prokariot*, yang dianggap sangat berbeda dari eukariot. Kesalahan paling berat dan fatal yang diakibatkan oleh dikotomi prokariot-eukariot terjadi karena pada mulanya prokariot (berdasarkan sitologi) didefinisikan secara negatif terhadap eukariot (Olsen dan Woese, 1994). Dengan kata lain prokariot adalah organisme yang tidak memiliki ciri sel eukariot. Berdasarkan definisi negatif tersebut, tetesan minyak dalam air pun dapat digolongkan sebagai organisme prokariot. Pakar-pakar mikrobiologi hanya menyatakan: "jika itu bukan eukariot, maka pastilah prokariot". Sedangkan untuk memahami prokariot, cukup dengan menentukan perbedaan-perbedaan antara *Escherichia coli* dan eukariot. Pandangan ini telah memendam pikiran kreatif untuk melihat dasar-dasar biologi secara universal. Dikotomi prokariot-eukariot ini telah menjadi penghalang yang memisahkan mikrobiologi prokariot dari mikrobiologi eukariot.

Namun pandangan mengenai sistematik mikroba berubah secara drastis pada akhir tahun 1970-an. Sekuen rRNA

terbukti menjadi kunci untuk membuka filogeni mikro-organisme. Sekuensing molekuler telah mengungkapkan penemuan yang sangat berbeda: bahwa kehidupan di planet bumi ini tidak dapat dikategorikan dalam kelompok prokariot dan eukariot saja. Sedikitnya ada tiga macam alur keturunan, dua diantaranya tipe bakteri (prokariot) dan lainnya adalah tipe eukariot. Studi komparatif sekuen molekuler menunjukkan bahwa kedua kelompok prokariot tidaklah lebih sekerabat bila dibandingkan dengan antara kelompok tersebut dengan eukariot, meskipun keduanya "terlihat seperti bakteri". Oleh karena itu telah diusulkan tiga *Domain* baru, yaitu **Bacteria**, **Archaea**, dan **Eucarya** (Gambar 5) (Wheelis *et al.*, 1992). *Domain* merupakan tingkat taksonomi tertinggi yang berada setingkat di atas Kingdom. Penambahan takson baru ini dimaksudkan untuk menekankan pembagian *tripartite* dari dunia kehidupan, dan juga untuk menunjukkan perbedaan evolusi yang nyata antara Bacteria dan Archaea.

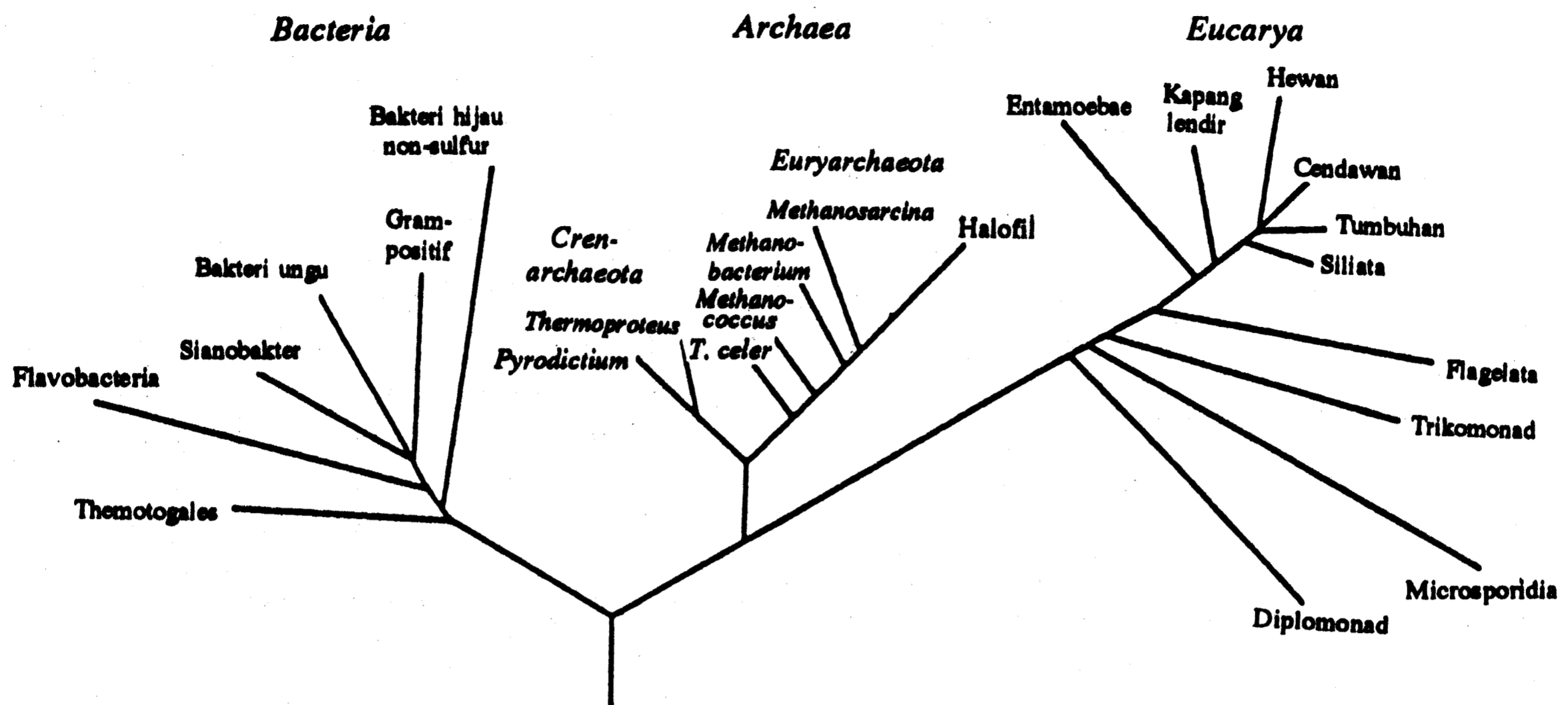
Kesimpulan utama lain yang dapat ditarik dari studi sekuensing molekuler ialah bahwa eukariot bukanlah kelompok "modern" sebagaimana pendapat yang banyak dikemukakan selama ini. Meskipun sel eukariot modern yang kita kenal (yang membawa mitokondria atau mitokondria dan kloroplas) terbentuk jauh setelah diversifikasi Archaea dan Bacteria, nenek moyang nukleus (inti sel eukariot) nampaknya sudah ada pada waktu yang sama dengan nenek moyang Archaea dan Bacteria. Jadi, nenek moyang sel yang akhirnya membentuk eukariot modern bisa jadi berasal dari nenek moyang umum (*universal ancestor/progenote*) yang juga membentuk kedua kelompok prokariot (Archaea dan Bacteria) (Woese, 1987).

SEKILAS MENGENAI FILOGENI MIKROBE

Kesimpulan utama dari analisis sekuen rRNA sudah jelas yaitu kehidupan di bumi terdiri dari tiga kelompok garis keturunan yang berasal dari nenek moyang umum dari semua organisme hidup (Wheelis *et al.*, 1992).

Jarak evolusi pada setiap cabang pohon filogenetik universal dapat memperkirakan tingkat divergensi dari nenek moyang umum. Akar pohon filogenetik tersebut dengan jelas memisahkan Bacteria dari Archaea. Dari pohon tersebut terlihat bahwa kerabat dekat Archaea bukanlah Bacteria, tetapi Eukariot! Namun, karena cabang Archaea yang paling dekat ke akar pohon, hal ini memberikan petunjuk bahwa Archaea adalah yang paling primitif (kurang mengalami perubahan) di antara ketiga *domain* kehidupan. Eukariot modern merupakan kelompok yang paling baru dari rangkaian sejarah evolusi kehidupan. Lambatnya evolusi pada Archaea juga didukung oleh kenyataan bahwa banyak archaeobacteria yang menghuni lingkungan ekstrem, seperti temperatur tinggi, pH rendah, kadar garam tinggi, dan lingkungan yang mutlak anaerob. Lingkungan ekstrem tersebut, khususnya temperatur tinggi dan anaerobiosis (Stetter *et al.*, 1993), mencerminkan kondisi bumi yang masih muda tempat kehidupan dimulai (lihat bagian pendahuluan). Oleh karena itu, Archaea dapat menjadi pelapor yang lebih andal mengenai bentuk awal kehidupan di bumi ini (Woese, 1994).

Gambaran filogenetik tersebut juga memperlihatkan kejadian evolusi yang lain. Sebagai contoh, mitokondria telah lama diperkirakan sebagai endosimbion yang berasal dari kelompok *Proteobacteria*, termasuk di dalamnya *Agrobac-*



Gambar 5. Pohon Filogenetik yang Menampilkan Tiga Domain Kehidupan: *Bacteria*, *Archaea*, dan *Eucarya* (Wheelis *et al.*, 1992)

terium, *Rhizobium*, *Rhodobacter* dan Riketsia. Sekuen molekuler menunjukkan bahwa mitokondria sangat dekat hubungannya dengan kelompok bakteri-bakteri tersebut (Woese, 1987). Hal yang juga menarik adalah kenyataan bahwa *Agrobacterium*, *Rhizobium* dan Riketsia dapat hidup secara intraseluler. Beberapa jenis moluska dan cacing tabung (*Riftia* sp.) tidak dapat hidup tanpa bakteri simbiotnya, yang bersifat intraselular obligat.

Pengamatan yang lebih jauh menunjukkan bahwa jarak evolusi antara organisme-organisme yang mirip secara fenotipe ternyata sangat jauh; sebaliknya jarak evolusi antara organisme yang secara fenotipe sangat berbeda ternyata sangat dekat. Sebagai contoh, jarak evolusi antara bakteri ungu dan bakteri non-sulfur hijau (sama-sama bakteri gram negatif) sangat jauh, bahkan lebih jauh dibandingkan jarak evolusi antara tumbuhan dengan hewan (Gambar 5). Baru-baru ini studi evolusi molekuler juga menunjukkan bahwa secara keseluruhan cendawan (*Fungi*) merupakan kelompok filogenetik yang lebih erat hubungannya dengan kingdom *animalia* dibandingkan dengan kingdom *plantae* (Baldauf dan Palmer, 1993; Lewis, 1994). Oleh karena itu perlu diperhatikan bahwa menggambarkan pohon filogenetik berdasarkan penampilan fenotipe sering kali menimbulkan kesalahan (Woese, 1994).

BAKTERI YANG TERBESAR: SUATU CONTOH

Pada tahun 1985 sekelompok peneliti menemukan organisme uniseluler berbentuk cerutu yang sangat besar dengan ukuran $60 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$. Ukuran sel ini sekitar sejuta kali lebih besar dari ukuran sel *Escherichia coli* dan (2-5) kali lebih besar dari paramoecium. Segera saja para peneliti tersebut mengelompokkan organisme ini sebagai protista, golongan protozoa, yang nama ilmiahnya *Epulopiscium fishelsoni*. Organisme ini hidup sebagai simbion di dalam usus suatu jenis ikan yang ditemukan di Laut Merah dan Great Barrier Reef.

Pengamatan sitologi *E. fishelsoni* dengan menggunakan mikroskop elektron menyajikan hasil yang luar biasa. Sel "protista" tersebut diselubungi oleh struktur semacam rambut

yang mirip silium pada eukariot, namun pengamatan yang lebih rinci menunjukkan bahwa organisme tersebut prokariot, jadi bukan kelompok protista. Selain itu *E. fishelsoni* juga tidak mempunyai penataan mikrotubul 9+2 yang khas pada silium eukariot. Struktur "silium"nya lebih mirip penataan flagelum bakteri.

Untuk memecahkan masalah klasifikasi *E. fishelsoni*, Norman Pace dan kelompoknya di *Indiana University* berusaha untuk menganalisis sekuen rRNA mikroorganisme tersebut. Repotnya organisme ini tidak dapat diisolasi bebas dari inangnya. Oleh karena itu isolasi RNA total juga mengikut sertakan RNA dari ikan inangnya. Untuk mengatasi hal tersebut mereka menggunakan teknik PCR dengan primer universal yang konservatif pada semua domain kehidupan. Hasil penelitian ini dipublikasikan di majalah *Nature* Vol. 362 tahun 1993. Hasilnya menunjukkan bahwa *E. fishelsoni* termasuk domain *Bacteria* yang sekerabat dengan *Clostridium* (Angert *et al.*, 1993). Data penelitian tersebut juga memperkuat kesimpulan studi mikroskop elektron bahwa *E. fishelsoni* adalah suatu prokariot.

Adanya bakteri berukuran raksasa seperti *E. fishelsoni* dan eukariot mikroskopi (diameter $1 \mu\text{m}$) seperti *Nanochlorum eukaryotum* menunjukkan bahwa ukuran sel tidak dapat digunakan untuk klasifikasi filogeni. Kita tidak dapat lagi mengatakan bahwa semua organisme yang besar itu eukariot (Ahern, 1993).

Pada umumnya orang sependapat bahwa ukuran sel prokariot ditentukan oleh perbandingan luas permukaan dengan volume sel karena perpindahan metabolit di dalam sel berlangsung melalui difusi. Adanya ukuran sel bakteri yang luar biasa ini memberikan tantangan baru mengenai batas ukuran sel maksimum pada suatu sel prokariot.

Hasil penelitian Norman Pace dan kelompoknya juga menunjukkan keragaman yang luar biasa pada berbagai mikroorganisme. Perkembangan biologi molekuler telah memungkinkan orang untuk melakukan pendataan populasi mikroba (Barry *et al.*, 1990; Steffan dan Atlas, 1991; Stahl, 1993) sebagaimana telah lama dilakukan untuk hewan dan tumbuhan. Dengan menggunakan teknik-teknik tersebut kita

dapat mengklasifikasikan organisme yang ada dan hidup di lingkungannya tetapi tidak dapat dikulturkan di laboratorium (Angert *et al.*, 1993). Informasi ini sangat penting, tidak saja untuk keperluan studi ekologi mikroba tetapi juga untuk studi evolusi mikroba (Stahl, 1993). Karena mikroba merupakan pemain utama di panggung sejarah evolusi kehidupan di planet bumi ini, maka pengetahuan yang rinci mengenai sistematikanya akan memberikan masukan yang sangat penting dalam memahami asal usul kehidupan (Woese, 1994).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahern, H. 1993. A Big Bacterium-Oxymoron of the Microbial World. *ASM News* 59:519-521.
- Angert, E.R., E.D. Clements, and N.R. Pace. 1993. The Largest Bacterium. *Nature* (London) 362:239-241.
- Baldauf, S. L. and J. D. Palmer. 1993. Animals and Fungi are Each Other's Closest Relatives: Congruent Evidence from Multiple Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:11558-11562.
- Barry, T., R. Powell, and F. Gannon. 1990. A General Method to Generate DNA Probes for Microorganisms. *Bio/Technol.* 8:233-236.
- Brock, T.D. and M.T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*. 6th ed. New Jersey: Prentice Hall.
- Corliss, J.B., J.A. Baross, and S.E. Haffman. 1981. An Hypothesis Concerning the Relationship between Submarine Hot Springs and the Origin of Life on Earth. p. 59-69. In *Oceanol. Acta. Proceedings 26th International Geological Congress*, Paris.
- Gutell, R.R., N. Larsen, and C.R. Woese. 1994. Lessons from an Evolving rRNA: 16S and 23S rRNA Structures from a Comparative Perspective. *Microbiol. Rev.* 58:10-26.
- Lewis, R. 1994. A New Place for Fungi? *Biosci.* 44:389-391.
- Olsen, G.J. and C.R. Woese. 1994. The Winds of (Evolutionary) Change: Breathing New Life into Microbiology. *J. Bacteriol.* 176:1-6.
- Pace, N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane, and G.J. Olsen. 1985. Analyzing Natural Microbial Populations by rRNA Sequences. *ASM News*. 51:4-12.
- Stahl, D.A. 1993. The Natural History of Microorganisms: New Approaches are Needed to Appreciate How Microorganisms Fit in the Biosphere. *ASM News*. 59:609-613.
- Steffan, R.J. and R.M. Atlas. 1991. Polymerase Chain Reaction: Application in Environmental Microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:137-161.
- Stetter, K.O., R. Huber, E. Blochl, M. Kurr, R.D. Eden, M. Fielder, H. Cash, and I. Vance. 1993. Hyperthermophilic Archaea are Thriving in Deep North Sea and Alaskan Oil Reservoirs. *Nature* (London) 365:743-745.
- Wheelis, M.L., O. Kandler, and C.R. Woese. 1992. On the Nature of Global Classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:2930-2934.
- Woese, C.R. 1979. A Proposal Concerning the Origin of Life on the Planet Earth. *J. Mol. Evol.* 13:95-101.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
- Woese, C.R. 1994. There Must be a Prokaryote Somewhere: Microbiology's Search for Itself. *Microbiol. Rev.* 58:1-9.
- Woese, C.R., O. Kandler, and M.L. Wheelis. 1990. Toward a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:4576-4579.