

Analisis Filogenetik Gen *nosZ* pada Bakteri *Pseudomonas* sebagai Denitrifikasi Nitrogen Berbahaya Berdasarkan Data Sekuens NCBI

Inayatul Izzati^{1*}, Maulida Karima¹, Nayla Qoni'Atun Sholehah¹, Faturrahman², Sarkono²

¹ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram, Mataram, Indonesia.

² Laboratorium Teknologi Mikrobial, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram, Mataram, Indonesia.

Article Info :

Received : November 10, 2025
Revised : December 14, 2025
Accepted : December 29, 2025
Published : January 22, 2026

Corresponding Author:

Inayatul Izzati
inayatulizzati21@gmail.com

DOI:

<https://doi.org/10.29303/cy1q1033>

Keyword:

nosZ gene; *Pseudomonas*;
phylogenetic analysis; nitrous oxide
reduction; evolutionary diversity

Abstract :

The **nosZ** gene plays a crucial role in the reduction of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen (N₂), an environmentally benign form of nitrogen. However, the evolutionary diversity of this gene within the genus *Pseudomonas* has not been comprehensively investigated. This study aimed to analyze the phylogenetic relationships of the *nosZ* gene in *Pseudomonas* and to elucidate patterns of relatedness and clade differentiation associated with N₂O reduction capability within this bacterial group. Phylogenetic analysis was conducted using the Maximum Likelihood method based on *nosZ* nucleotide sequences obtained from the NCBI database. The results showed that the closest genetic relationships were observed among isolates belonging to the same species, including *Pseudomonas lini* (sp 18 and 19), *P. brassicacearum* (sp 6 and 7), *P. grimontii* (sp 16 and 17), and *P. mandelii* (sp 11 and 12), all of which exhibited a genetic distance of 0.00. This finding indicates a high level of sequence conservation, likely influenced by strong functional selective pressure and similar geographic origins. In contrast, the most distant genetic relationships were observed between *P. mandelii* (sp 11) and *P. lini* (sp 19) with a genetic distance of 0.5, as well as between *P. brassicacearum* and several other species with distances reaching up to 0.6. These results highlight significant evolutionary variation of the *nosZ* gene among *Pseudomonas* species.

How to Cite : Izzati, I., Karima, M., Sholehah, N. Q., Faturrahman, & Sarkono. (2026). Analisis Filogenetik Gen *nosZ* pada Bakteri *Pseudomonas* sebagai Denitrifikasi Nitrogen Berbahaya Berdasarkan Data Sekuens NCBI. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Conservation*, 2(1), 33-40. <https://doi.org/10.29303/cy1q1033>

PENDAHULUAN

Dinitrogen oksida (N₂O) merupakan gas yang secara alami tidak berbau dan tidak bersifat toksik, namun memiliki dampak lingkungan yang besar karena termasuk gas rumah kaca kuat serta berkontribusi pada penurunan lapisan ozon (Agustiyani *et al.*, 2011). Meningkatnya penggunaan pupuk yang menghasilkan nitrogen reaktif menyebabkan gangguan pada berbagai komponen lingkungan, baik pada ekosistem darat maupun perairan. Perubahan ini dapat memengaruhi kondisi udara, tanah, dan air sehingga

berpotensi menimbulkan risiko bagi kesehatan manusia. Di atmosfer, bentuk nitrogen yang paling sering ditemukan berasal dari senyawa nitrogen oksida, khususnya NO_x, yang dilepaskan dari aktivitas industri dan transportasi. Selain itu, sektor pertanian turut menyumbang emisi berbasis amonia (NH₃), yang memperburuk akumulasi nitrogen reaktif di lingkungan (Wim, 2021).

Nitrogen diketahui melimpah di atmosfer mencapai sekitar 78% dari total komposisinya. Namun, bentuk nitrogen ini bersifat *inert* sehingga tidak dapat langsung dimanfaatkan oleh tumbuhan. Untuk itu, keberadaan bakteri penambat nitrogen

memegang peran penting karena mampu mengubah nitrogen bebas menjadi bentuk seperti amonium atau nitrat yang lebih mudah diserap tanaman (Sapalina *et al.*, 2017). Melalui proses ini, ekosistem memperoleh sumber nitrogen yang lebih alami tanpa ketergantungan penuh pada pupuk kimia. Oleh karena itu, penggunaan biofertilizer berbasis bakteri penambat nitrogen menjadi pilihan yang lebih ramah lingkungan dan mendukung upaya mewujudkan pertanian berkelanjutan. Namun dalam hal ini untuk mengubah Nitrogen menjadi Amonium atau Nitrat, N_2O yang berada di lingkungan harus diubah terlebih dahulu menjadi Nitrogen (N_2) untuk mengurangi resiko pemanasan global.

Salah satu kelompok bakteri yang dapat dimanfaatkan dalam proses denitrifikasi adalah genus *Pseudomonas*. Dalam penelitian Hu *et al.*, (2022) *Pseudomonas citronellolis* WXP-4 dilaporkan sebagai bakteri denitrifikasi yang memiliki gen *nosZ* sebagai bagian dari klaster gen *nosRZDFYL*, yang berperan dalam penyandian enzim nitrous oxide reductase (N_2OR). Enzim tersebut merupakan satu-satunya enzim biologis yang mampu mereduksi gas rumah kaca N_2O menjadi N_2 yang tidak berbahaya.

Pada penelitian tersebut, gen *nosZ* berhasil diidentifikasi, dikloning, dan diekspresikan pada *E. coli*, dan hasilnya menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan aktif dalam mereduksi N_2O secara efektif sehingga hal ini dapat menjadi solusi dalam penurunan potensi pemanasan global. *Pseudomonas* memiliki berbagai jenis spesies yang memiliki peranan beragam. Pada penelitian Jones *et al.*, (2008) diketahui jenis *Pseudomonas* yang membawa gen *nosZ* yaitu bakteri *P. stutzeri* juga. Pada penelitian lainnya dijelaskan bahwa ada banyak jenis bakteri yang mengandung gen *nosZ*, hal ini ditentukan oleh strainnya masing-masing. Evolusi gen *nosZ* dapat terjadi pada berbagai jenis bakteri dikarenakan sifatnya yang dinamis dan tidak mengikuti hubungan kekerabatan berdasarkan gen 16s rRNA (Nie *et al.*, 2016).

Evolusi gen merupakan proses perubahan susunan gen, fungsi gen dan penyebaran gen dalam populasi bakteri yang diakibatkan adanya pergerakan, pertukaran dan pengaturan ulang materi genetik. Bakteri dapat mengalami evolusi gen antar

spesiesnya atau bahkan dengan spesies bakteri lainnya karena adanya *Mobile Genetics Elements* seperti plasmid, transposon dan integrons yang mengakibatkan genom bakteri tidak stabil dan berubah-ubah, sehingga evolusi gen antar spesies dapat berubah dan memiliki sifat baru (Weisberg & Chang, 2023). Begitu pula pada kekerabatan *Pseudomonas* berdasarkan gen *nosZ* karena gen tersebut mengalami evolusi yang dinamis. Oleh karena itu studi filogenetik terhadap gen *nosZ* penting untuk dilakukan untuk memahami keragaman dan hubungan evolusi gen tersebut diantara berbagai spesies *Pseudomonas*.

Analisis filogenetik gen *nosZ* pada *Pseudomonas* memerlukan data sekuens yang akurat, terverifikasi, dan dapat dibandingkan lintas spesies, sehingga penggunaan database NCBI menjadi sangat penting. NCBI, melalui repositori GenBank, menyediakan sekuens DNA yang terstandarisasi, disertai anotasi gen, informasi taksonomi, serta metadata isolat yang memungkinkan peneliti melakukan analisis komparatif secara valid dan terpercaya (Benson *et al.*, 2013). Ketersediaan alat bioinformatika seperti BLAST dan sistem klasifikasi taksonomi di NCBI juga mendukung proses identifikasi gen *nosZ* secara tepat sebelum dianalisis secara evolusioner.

Penelitian sebelumnya telah banyak membahas gen *nosZ* sebagai penentu reduksi N_2O pada bakteri denitrifikasi secara umum, diantaranya yaitu penelitian yang menyoroti keanekaragaman *nosZ* di lingkungan tanah secara umum (Sanford *et al.*, 2012) atau peran fungsionalnya sebagai penentu kapasitas bakteri dalam menyerap N_2O (Jones *et al.*, 2013), namun belum memberikan perhatian mendalam terhadap variasi sekuens *nosZ* antar spesies *Pseudomonas*.

Padahal, gen ini diketahui mengalami evolusi dinamis melalui mutasi, rekombinasi, serta horizontal gene transfer yang dapat menghasilkan pola kekerabatan berbeda dari filogeni berbasis 16S rRNA. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis filogenetik *nosZ* pada *Pseudomonas* dan memahami kekerabatan dan perbedaan clade berdasarkan gen *nosZ* yang membentuk kemampuan reduksi N_2O di dalam kelompok bakteri tersebut.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif dengan pendekatan eksplorasi. Populasi dalam penelitian ini mencakup 20 sekuens gen *nosZ* dari bakteri genus *Pseudomonas* dengan 7 jenis spesies yang terdapat dalam database *National Center for Biotechnology Information* atau NCBI. Sampel yang digunakan adalah sekuens gen *nosZ* dari beberapa spesies *Pseudomonas* yang memenuhi kriteria inklusi tertentu. Data yang digunakan merupakan data sekunder yang diperoleh dengan cara mengunduh sekuens nukleotida gen *nosZ* secara langsung dari database NCBI.

Tabel 1. Bahan Sequens DNA

Kode Accession	Nama Spesies
HE814032 (sp 1)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
FJ597627 (sp 2)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
KP868698 (sp 3)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
HE814035 (sp 4)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
KP868690 (sp 5)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
DQ377777 (sp 6)	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
DQ377776 (sp 7)	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
KP868700 (sp 8)	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>
KP868699 (sp 9)	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>
KP868696 (sp 10)	<i>Pseudomonas mendocina</i>
MW286255 (sp 11)	<i>Pseudomonas mandelii</i>
DQ518190 (sp 12)	<i>Pseudomonas mandelii</i>
KT291773 (sp 13)	<i>Pseudomonas migulae</i>
DQ377789 (sp 14)	<i>Pseudomonas migulae</i>
DQ377773 (sp 15)	<i>Pseudomonas migulae</i>
DQ377781 (sp 16)	<i>Pseudomonas grimontii</i>
DQ377782 (sp 17)	<i>Pseudomonas grimontii</i>
DQ377800 (sp 18)	<i>Pseudomonas lini</i>
DQ377783 (sp 19)	<i>Pseudomonas lini</i>
DQ377803 (sp 20)	<i>Pseudomonas kilonensis</i>

Penelitian ini diawali dengan proses kurasi dan seleksi data. Pemilihan sekuens gen *nosZ* dilakukan berdasarkan kriteria yang telah ditetapkan yaitu memiliki nomor aksesori yang valid dan nama spesies yang terverifikasi serta panjang sekuens gen yang memadai untuk dianalisis. Seluruh sekuens terpilih kemudian disimpan dalam sebuah file berformat FASTA untuk dianalisis lebih lanjut menggunakan perangkat lunak MEGA12

(Tamura *et al.*, 2021). Analisis data meliputi beberapa tahapan. Tahap pertama adalah penjajaran sekuens lebih dari satu menggunakan panyejajaran atau *Multiple Sequence Alignment by Clustal W* pada aplikasi MEGA12 untuk mengetahui daerah yang homolog. Hasil penjajaran ini kemudian dianalisis untuk melihat variasi genetik yang ada. Selanjutnya rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode *Maximum Likelihood Methode*. Prosedur analisis mencakup 10 urutan nukleotida pengkode menggunakan posisi ke-1, ke-2, ke-3, dan non-pengkode dengan 600 posisi dalam dataset akhir. Analisis evolusioner dilakukan di MEGA12 dengan memanfaatkan hingga 3 utas komputasi paralel (Aprilyanto & Sembiring, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil seleksi dari database NCBI, diperoleh sekuens gen *nosZ* dari sembilan spesies *Pseudomonas* yaitu *P. stutzeri*, *P. brassicacearum*, *P. Jinjuensis*, *P. Mendocina*, *P. mandelii*, *P. migulae*, dan *P. grimontii* yang panjang basanya serta negara asal isolatnya dirangkum dalam Tabel 2.

Tabel 2. Data Jumlah Basa dan Asal Negara Isolasi

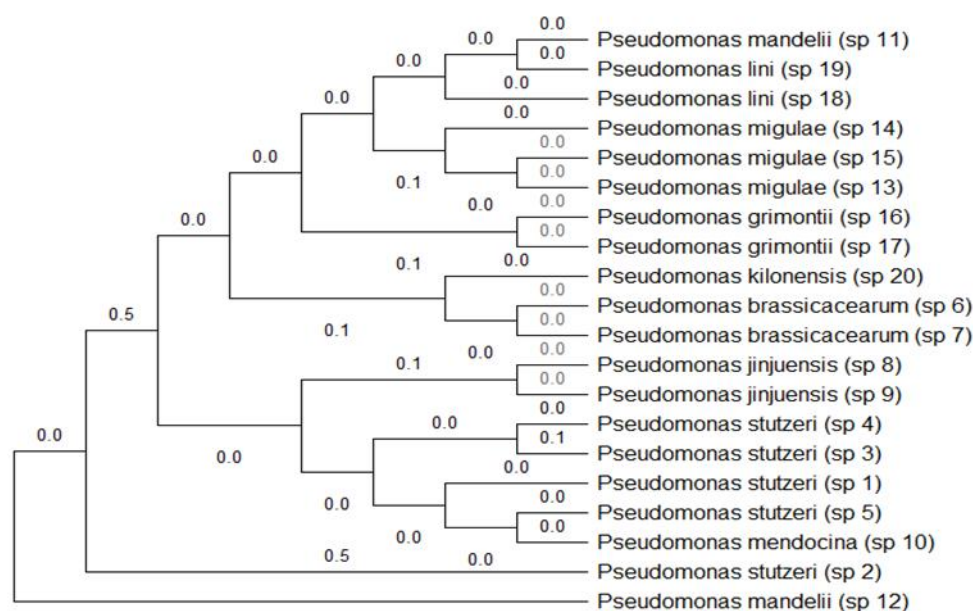
Nama Spesies	Jumlah Basa	Origin
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	661	Greece
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	677	Italy
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	656	Mexico
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	661	Greece
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	694	Mexico
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	628	Canada
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	628	Canada
<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	671	Mexico
<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	648	Mexico
<i>Pseudomonas mendocina</i>	609	Mexico
<i>Pseudomonas mandelii</i>	634	Poland
<i>Pseudomonas mandelii</i>	673	Canada
<i>Pseudomonas migulae</i>	691	India
<i>Pseudomonas migulae</i>	638	Canada
<i>Pseudomonas migulae</i>	641	Canada
<i>Pseudomonas grimontii</i>	633	Canada
<i>Pseudomonas grimontii</i>	641	Canada
<i>Pseudomonas lini</i>	636	Canada
<i>Pseudomonas lini</i>	636	Canada
<i>Pseudomonas kilonensis</i>	624	Canada

Tabel 2. merangkum 20 sekuens gen *nosZ* dari tujuh spesies *Pseudomonas* yang menjadi sampel penelitian. Ketujuh spesies tersebut yaitu *P. stutzeri*, *P. brassicacearum*, *P. jinjuensis*, *P. mendocina*, *P. mandelii*, *P. migulae*, *P. lini*, *P. kilonensis*, dan *P. grimontii*, secara umum dikenal sebagai bakteri saprofitik rizosfer yang berperan dalam siklus nutrisi tanah, dan tidak diklasifikasikan sebagai patogen primer manusia (Bergsveinson *et al.*, 2021; Höppener-Ogawa *et al.*, 2024). Peran fungsional gen *nosZ* yang dikodekannya sangat krusial secara ekologis, yaitu sebagai pengeksresi enzim nitrous oxide reductase untuk mereduksi gas dinitrogen oksida (N₂O) berbahaya menjadi gas nitrogen (N₂) yang inert, sehingga mendukung proses denitrifikasi yang aman (Kuypers *et al.*, 2018; Hallin *et al.*, 2018).

Variasi panjang sekuens yang tercatat, yakni antara 609 bp (*P. mendocina*) hingga 694 bp (*P. stutzeri*), mengindikasikan adanya keragaman struktur genetik awal pada gen target. Variasi ini dapat merefleksikan keberagaman alami akibat insertion/deletion (indels) (Jones *et al.*, 2019) atau merupakan artefak dari panjang fragmen sekuens parsial yang tersedia di database (Beng & Corlett,

2020). Dari aspek distribusi geografis, isolat berasal dari setidaknya enam negara yang tersebar di berbagai benua, dengan Kanada mendominasi sebagai negara asal bagi tujuh dari sembilan spesies. Dominasi ini kemungkinan mencerminkan bias ketersediaan data sekuens di NCBI daripada distribusi ekologis sebenarnya.

Analisis awal menunjukkan pola yang menarik, spesies dengan isolat dari beragam lokasi geografis (seperti *P. stutzeri* dan *P. mandelii*) cenderung menunjukkan variasi panjang basa yang lebih besar. Sebaliknya, spesies yang seluruh isolatnya berasal dari satu negara (seperti pada *P. brassicacearum* dan *P. lini* yang sama-sama dari Kanada) menunjukkan panjang sekuens yang identik atau hampir identik. Hal ini mengisyaratkan bahwa keragaman geografis mungkin berkorelasi dengan diversifikasi sekuens gen *nosZ*, sebuah hipotesis yang dapat diuji lebih lanjut melalui analisis filogenetik (Yin *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2023). Hipotesis ini dapat diuji lebih lanjut melalui analisis filogenetik untuk menentukan apakah pengelompokan genetik lebih dipengaruhi oleh batasan taksonomi (spesies) atau faktor geografis (Sanford *et al.*, 2021).



Gambar 1. Pohon Filogenik Beberapa Spesies *Pseudomonas* dengan *Maximum Likelihood Methode*)

Pohon filogenetik yang direkonstruksi menggunakan metode *Maximum Likelihood* (ML) berdasarkan sekuens gen *nosZ* (Gambar 1.1)

berhasil mengungkap hubungan kekerabatan evolusioner di antara 20 isolat dari tujuh spesies *Pseudomonas*. Secara keseluruhan, topologi pohon

menunjukkan pengelompokan (*clustering*) yang kuat sesuai dengan garis keturunan spesies, didukung oleh nilai bootstrap yang umumnya tinggi pada node-node utama (>70%). Hal ini mengindikasikan bahwa sekuens gen *nosZ* dapat berfungsi sebagai penanda filogenetik yang informatif untuk membedakan sekaligus mengelompokkan spesies-spesies dalam genus ini (Jones *et al.*, 2019).

Pohon tersebut memisahkan isolat-isolat ke dalam beberapa klaster utama. Klaster terbesar dan paling terdiferensiasi didominasi oleh isolat-isolat *Pseudomonas stutzeri* (5 isolat). Variasi cabang yang substansial di dalam klaster ini mencerminkan keragaman genetik intra-spesies yang tinggi, sebuah temuan yang konsisten dengan karakter biologis *P. stutzeri* yang dikenal sebagai spesies kompleks dengan habitat sangat luas dan plastisitas genomik yang besar (Briški & Vuković Domanovac, 2017). Klaster lain menunjukkan pola pengelompokan yang erat sesuai spesies, seperti pada *P. lini*, *P. brassicacearum*, dan *P. grimontii*, di mana isolat-isolat dari spesies yang sama membentuk sub-klaster dengan jarak genetik sangat pendek. Homogenitas ini menegaskan tingkat konservasi sekuens *nosZ* yang tinggi pada spesies-spesies tersebut, yang mungkin terkait dengan stabilitas ekologis atau tekanan seleksi fungsional yang serupa (Stein, 2020).

Hubungan filogenetik yang menarik teramati pada posisi *Pseudomonas mendocina* (sp10), yang secara taksonomi merupakan spesies berbeda namun ternyata bersarang (*nested*) di dalam klaster besar *P. stutzeri*. Fenomena di mana satu spesies menunjukkan kekerabatan genetik yang lebih dekat dengan spesies lain daripada dengan anggota lain dari spesiesnya sendiri dapat dijelaskan oleh beberapa skenario evolusioner. Pertama, Evolusi gen *nosZ* dapat terjadi pada berbagai jenis bakteri dikarenakan sifatnya yang dinamis dan tidak mengikuti hubungan kekerabatan berdasarkan gen 16s rRNA (Nie *et al.*, 2016). Kedua, kemungkinan terjadinya transfer gen horizontal (*Horizontal Gene Transfer* / HGT) gen *nosZ* antara leluhur *P. mendocina* dan *P. stutzeri* di niche lingkungan yang sama (Kuypers *et al.*, 2018). Ketiga, adanya evolusi konvergen akibat tekanan seleksi lingkungan yang identik, yang mendorong kemiripan sekuens pada

gen yang mengkode fungsi kritis seperti denitrifikasi. Keempat, ketidaklengkapan penyortiran garis keturunan dalam divergensi garis keturunan (*incomplete lineage sorting*) dari varian gen *nosZ* purba (Cazalis, 2022). Temuan ini menyoroti kompleksitas evolusi gen *nosZ* dan menegaskan bahwa hubungan filogenetik berdasarkan satu gen tidak selalu sepenuhnya mencerminkan sejarah evolusi genomik keseluruhan organisme.

Analisis memperlihatkan adanya kelompok besar yang terdiri dari *P. mandelii*, *P. lini*, dan *P. migulae*. Kedekatan evolusioner antar ketiga spesies yang berbeda ini mengindikasikan bahwa mereka mungkin berasal dari leluhur bersama yang relatif baru dan/atau berbagi strategi adaptasi fungsional yang serupa dalam proses denitrifikasi. Pola ini diperkuat oleh fakta bahwa isolat *P. migulae* dari India (sp13) membentuk cabang yang lebih terpisah dibandingkan dua isolat *P. migulae* dari Kanada, mengisyaratkan pengaruh isolasi geografis terhadap diversifikasi genetik dalam satu spesies (Wei *et al.*, 2023).

Analisis kuantitatif jarak genetik yang disajikan dalam Tabel 2. memberikan dasar numerik yang kokoh untuk mengonfirmasi dan memperdalam pola-pola hubungan filogenetik yang telah diidentifikasi. Perhitungan jarak genetik berdasarkan model substitusi nukleotida (misalnya Kimura 2-Parameter) ini mengukur secara langsung tingkat divergensi sekuens antar isolat (Nei & Kumar, 2000).

Hasil yang paling mencolok adalah dominannya nilai jarak genetik 0.0 untuk sebagian besar pasangan isolat, khususnya yang berasal dari spesies yang sama. Nilai nol ini teramati antara isolat *Pseudomonas lini* (sp 18 vs sp 19), *P. brassicacearum* (sp 6 vs sp 7), *P. grimontii* (sp 16 vs sp 17), dan *P. mandelii* (sp 11 vs sp 12). Temuan ini secara kuantitatif membuktikan tingkat konservasi yang hampir sempurna pada region gen *nosZ* yang dianalisis untuk spesies-spesies tersebut. Konservasi ekstrem ini sangat mungkin disebabkan oleh tekanan seleksi fungsional yang tinggi pada enzim *NosZ*, yang menjalankan reaksi reduksi N₂O yang kritis dan memerlukan struktur katalitik yang terpelihara dengan baik (Hallin *et al.*, 2018; Stein, 2020). Selain itu, homogenitas ini konsisten dengan

asal geografis yang sama untuk pasangan isolat geografis dapat mempertahankan keseragaman tersebut, mendukung hipotesis bahwa isolasi sekuens.

Tabel 2. Analisis kuantitatif jarak genetik

Spesies Ke-	sp 11	sp 19	sp 18	sp 14	sp 15	sp 13	sp 16	sp 17	sp 20	sp 6	sp 7	sp 8	sp 9	sp 4	sp 3	sp 1	sp 5	sp 10	sp 2	sp 12
sp 11	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 19	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 14	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
sp 10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
sp 2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
sp 12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Namun, analisis juga mengungkapkan gradasi keragaman melalui nilai-nilai jarak yang lebih besar. Nilai 0.1 (mengindikasikan ~10% perbedaan nukleotida) muncul pada beberapa pasangan, baik intra-spesies (seperti antara isolat *P. jinjuensis* sp 8 dan sp 9) maupun antar spesies yang berkerabat dekat (antara beberapa anggota klaster *mandelii-lini-migulae*). Variasi intra-spesies ini, meskipun kecil, memberikan dukungan numerik terhadap karakterisasi *P. stutzeri* dan *P. jinjuensis* sebagai spesies dengan keragaman genetik sedang, yang terkait dengan kedinamisan dan bahkan juga adaptasi ke niche mikro-habitat yang berbeda (Jones *et al.*, 2019).

Kemunculan nilai jarak genetik tertinggi (0.5 hingga 0.6) merupakan hal yang paling signifikan secara evolusioner. Nilai-nilai besar ini, yang mengindikasikan divergensi sekuens 50-60%, secara tegas mengidentifikasi pasangan spesies dengan hubungan kekerabatan paling jauh. Dimana jarak 0.5 antara *P. mandelii* (sp11) dan *P. lini* (sp19) mengungkap bahwa meskipun keduanya dikelompokkan dalam satu klaster besar, mereka telah terpisah secara evolusioner cukup lama untuk mengakumulasi perbedaan substansial. Sementara itu, jarak 0.6 antara *P. brassicacearum* dan beberapa spesies lain mencerminkan pemisahan garis keturunan yang sangat awal.

Secara keseluruhan, matriks jarak genetik berfungsi sebagai validasi kuantitatif yang kuat bagi rekonstruksi pohon filogenetik. Polanya sangat konsisten yaitu isolat yang membentuk klaster yang sama memiliki jarak kecil (0.0-0.1), sementara isolat yang berada pada cabang yang jauh terpisah memiliki jarak besar (0.5-0.6). Analisis ini tidak hanya mengukuhkan keandalan pohon yang dibangun, tetapi juga menegaskan bahwa gen *nosZ* mengandung sinyal filogenetik yang cukup untuk membedakan tingkat kekerabatan, dari variasi intra-spesies yang halus hingga divergensi antar-spesies yang mendalam dalam genus *Pseudomonas*.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis filogenetik gen *nosZ* pada bakteri *Pseudomonas*, hubungan kekerabatan terdekat secara genetik ditunjukkan oleh isolat-isolat dari spesies yang sama seperti *Pseudomonas lini* (sp 18 dan 19), *P. brassicacearum* (sp 6 dan 7), *P. grimontii* (sp 16 dan 17), dan *P. mandelii* (sp 11 dan 12) dengan jarak genetik 0,00, yang mengindikasikan konservasi sekuens yang tinggi akibat tekanan seleksi fungsional dan asal geografis yang sama. Sebaliknya, hubungan kekerabatan terjauh ditunjukkan oleh pasangan spesies *P. mandelii* (sp11) dengan *P. lini* (sp19) (jarak 0,5)

serta *P. brassicacearum* dengan beberapa spesies lain (jarak hingga 0,6), yang mencerminkan divergensi evolusioner yang mendalam dan pemisahan garis keturunan yang awal, kemungkinan terbesar disebabkan oleh dinamika evolusi gen *nosZ* yang dinamis, termasuk transfer gen horizontal atau tekanan lingkungan yang berbeda. Variasi sekuens ini berimplikasi potensial terhadap efisiensi enzim nitrous oxide reductase (N_2OR) dalam mereduksi N_2O .

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada semua pihak yang telah memberikan kontribusi berharga dalam penyusunan artikel ini, sehingga dapat diselesaikan dan diterbitkan dengan lancar.

KONTRIBUSI PENULIS

Semua penulis berkolaborasi dalam melaksanakan setiap tahap penelitian dan penulisan naskah.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak ada intervensi kepentingan dalam kegiatan penelitian ini.

REFERENSI

- Agustiyani, D., Laili, N., Imamuddin, H., & Sulistinah, N. (2011). Populasi Dan Aktivitas Denitrifikasi Serta Emisi Gas N_2O Pada Lahan Pertanian Organik, Pertanian Intensif, Dan Hutan. *Berkala Penelitian Hayati*, 17(1): 15-19.
- Aprilyanto, V., & Sembiring, L. (2016). *Filogenetik molekuler*. Yogyakarta: Innosain.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., dan Sayers, E. W., (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 36–42.
- Briški, F., & Vuković Domanovac, M. (2017). Environmental microbiology. *Physical Sciences Reviews*, 2(11), 20160118.
- Beng, K. C., & Corlett, R. T. (2020). Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and conservation*, 29(7), 2089-2121.
- Cazalis, V., Di Marco, M., Butchart, S. H., Akçakaya, H. R., González-Suárez, M., Meyer, C., ... & Santini, L. (2022). Bridging the research-implementation gap in IUCN Red List assessments. *Trends in Ecology & Evolution*, 37(4), 359-370.
- Hu, L., Wang, X., Chen, C., Chen, J., Wang, Z., Chen, J., dan Savitskaya, T. (2022). *NosZ* gene cloning, reduction performance and structure of *Pseudomonas citronellolis* WXP-4 nitrous oxide reductase. *RSC advances*, 12(5), 2549-2557.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R. A., & Jones, C. M. (2018). Genomics and ecology of novel N_2O -reducing microorganisms. *Trends in Microbiology*, 26(1), 43–55.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R. A., & Jones, C. M. (2018). Genomics and ecology of novel N_2O -reducing microorganisms. *Trends in Microbiology*, 26(1), 43-55.
- IPCC. (2021). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., & Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular biology and evolution*, 25(9), 1955-1966.
- Jones, C. M., Graf, D. R., Bru, D., Philippot, L., & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *The ISME Journal*, 7(2), 417–426.
- Jones, C. M., Spor, A., Brennan, F. P., Breuil, M. C., Bru, D., Lemanceau, P., & Philippot, L., 2013, Recently identified microbial guild mediates soil N_2O sink capacity. *Nature Climate Change*, 4(1), 801–805.
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263-276.
- Nie, Y., Li, L., Isoda, R., Wang, M., Hatano, R., & Hashidoko, Y. (2016). Physiological and genotypic characteristics of nitrous oxide (N_2O)-emitting *Pseudomonas* species isolated from dent corn Andisol farmland in Hokkaido, Japan. *Microbes and environments*, 31(2), 93-103.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Moreau, D., Bardgett, R. D., Finlay, R. D., Jones, D. L., & Philippot, L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional Ecology*, 33(4), 540-552.

- Sapalina, F., Ginting, E. N., dan Hidayat, F. (2022). Bakteri penambat nitrogen sebagai agen biofertilizer. *War. Pus. Penelit. Kelapa Sawit*, 27(1), 41-50.
- Stewart, L. J. (2015). A comparative and phylogenetic analysis of the genome of *Pseudomonas aeruginosa*.
- Sanford, R. A., Wagner, D. D., Wu, Q., Chee-Sanford, J. C., Thomas, S. H., Cruz-Garcia, C., & Löffler, F. E. (2012). Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *PNAS*, 109(48), 19709–19714.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652-680.
- Stein, L. Y. (2020). The long-term relationship between microbial metabolism and greenhouse gases. *Trends in microbiology*, 28(6), 500-511.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Wim, D.V., (2021). Impacts of nitrogen emissions on ecosystems and human health: A mini review. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 21(1), 1-6.
- Weisberg, A. J., dan Chang, J. H. (2023). Mobile genetic element flexibility as an underlying principle to bacterial evolution, *Annual Review of Microbiology* 77(1), 603-624.