

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Alfafa (*Medicago sativa*)

Klasifikasi tanaman *alfafa* menurut parman (2007) adalah Kingdom : Plantae, Subkingdom : Tracheobionta, Phylum : Tracheophyta, Subphylum : Spermatophytina, Super Divisi : Spermatophyta, Divisi : Magnoliophyta. Superklass : Angiospermae, Kelas : Gymnospermae, Subkelas : Dicotyledonae, Ordo : Fabales, Famili : *Fabaceae*, Genus : *Medicago*, Spesies : *Medicago sativa* L.

Tanaman *alfafa* adalah jenis leguminosa yang mempunyai peranan penting dalam penyediaan hijauan pakan murah dengan nilai gizi dan daya cerna yang tinggi yang telah tersebar luas di dunia. Nama *alfafa* berasal dari bahasa Arab yang artinya bapak dari segala tanaman atau disebut juga "Ratu Hijauan (*The Queen of Forage Crops*)" (Lacefield *et al.*, 2011). Tanaman tersebut merupakan tanaman hutan liar yang tertua dan tumbuh di pegunungan Mediterania di sebelah barat daya Asia. Tumbuhan ini diperkenalkan ke Eropa dari Asia oleh bangsa Persia pada perkiraan tahun 490 SM. *Alfafa* adalah tanaman asli daerah subtropis yang kemudian dikembangkan dan dibudidayakan di Amerika Serikat, Jepang, Australia, dan Korea untuk memenuhi kebutuhan hijauan pakan ternak. Sejarah tertua mengenai tanaman ini berasal dari sisa-sisa *alfafa* berusia 6000 tahun yang telah ditemukan di Iran. Tulisan tertua mengenai *alfafa* diperkirakan ada sejak tahun 1300 SM dan ditemukan di negara Turki. Sebagai pakan ternak, *alfafa*

memiliki kandungan protein, vitamin, dan mineral yang tinggi (Lacefield *et al.*, 2011).

Tanaman *alfafa* telah tersebar di berbagai belahan dunia karena memiliki nilai nutrisi hijauan dan produktivitasnya yang stabil sehingga banyak yang tertarik mengembangkannya. Berkembangnya tanaman *alfafa* di beberapa habitat yang berbeda menyebabkan perbedaan morfologi, fisiologi, dan variasi genetik. Akibat perubahan tersebut maka tanaman mengalami perubahan genetik sehingga tanaman memiliki sifat alogami (penyerbukan dengan tanaman lain yang sejenis) dan termasuk tanaman *autotetraploidy* (Radovicc *et al.*, 2009). Perkembangnya tanaman *alfafa* di beberapa negara menyebabkan perbedaan pemberian nama yaitu: *at-facfach*, *arc*, *alfafa weefil*, *buffalo herb*, *california clover*, *chileon clover*, *fevilleic de luzerne*, *phytoestrogen*, *spanish clover*, *ratt*, *kaba yonca*, *lucerne*, *medicago*, *mielga mu su*, dan *purple medic* (Radovicc *et al.*, 2009).

Tanaman *alfafa* pertama kali dibudidayakan di Indonesia pada tahun 2003 di Boyolali hingga menyebar ke BPTU-Baturraden tahun 2004 sampai 2005. Kemudian, tahun 2007 di Ciawi mulai mengembangkan sebagai koleksi tanaman pakan ternak. Penanaman *alfafa* di lokasi pengembangan menggunakan bahan tanam dari biji impor. Namun, sampai saat ini *alfafa* di Indonesia belum menghasilkan biji. Akibatnya tanaman *alfafa* tidak berkembang karena keterbatasan bibit (Nugroho, 2008 komunikasi pribadi; Marsudi, 2009 komunikasi pribadi).

Tanaman *Alfafa* termasuk tanaman leguminosa perennial yang berkembang secara luas sebagai pakan ternak. Pertumbuhan akar yang dalam

dapat mencapai 4,5 meter sehingga tanaman yang tahan menghadapi musim kering atau kekeringan yang panjang. Membentuk rhizome, membutuhkan sinar matahari dan kadar kapur yang cukup, toleran kekeringan tetapi tidak tahan kelembaban tinggi (Al-neem, 2008). Menurut Radovic *et al.* (2009), *alfafa* memerlukan drainase baik, pH 6,5 atau lebih, dengan kesuburan tanah yang baik. *Alfafa* dapat beradaptasi pada daerah kering dengan curah hujan 200 mm/tahun atau daerah basah 2500 mm/tahun. Batang tanaman tumbuh mendatar, berkayu di bagian dasar, cabang-cabang dan menanjak sampai tegak setinggi 30 – 120 cm. Daun satu tangkai (petiol) berdaun tiga (trifoliat), panjang 5 – 15 mm, berbulu pada permukaan bawah, tangkai daun berbulu, bunga berbentuk tandan yang rapat berisi 10 – 35 bunga, mahkota bunga berwarna ungu atau biru jarang yang berwarna putih (Mannetje dan Jones, 2000). Menurut Hoy *et al.* (2002), *alfafa* termasuk tanaman leguminosa yang biasa tumbuh di daerah sedang dan berumur 8 – 10 tahun tergantung kondisi iklim dan lingkungan pertumbuhan tanaman.

2.2 Peran Alfafa

Nitrogen adalah unsur terpenting dalam pertumbuhan tanaman. Kandungan gas nitrogen (N_2) di udara sebesar 79% (Prayudi, 2003), namun tidak dapat dimanfaatkan tanaman. Akan tetapi tanaman dapat memanfaatkan nitrogen dari udara bila bersimbiosis dengan bakteri tanah rhizobium dan membentuk bintil akar. Nitrogen diambil dalam bentuk N_2 dan diubah menjadi amonium (NH_4) sehingga dapat digunakan tanaman (Everes, 2004; Loynachan, 2005). *Alfafa* merupakan tanaman leguminosa yang sangat selektif terhadap rhizobium. Jenis

rhizobium yang dapat bersimbiosis dengan *alfafa* adalah *R. meliloti* yang dapat membentuk bintil akar untuk mengikat nitrogen (Rao, 1994).

Nitrogen di udara yang diikat oleh tanaman *alfafa* digunakan untuk tanaman sendiri maupun untuk tanaman sejenisnya. Chapman dan Myers (1987) dan Russle (2004), melaporkan bahwa hasil fiksasi nitrogen oleh leguminosa dapat tersedia bagi tanaman yang berada di sekitarnya selama musim pertumbuhan melalui pembusukan akar dan bintil akar merupakan hal penting dalam transfer nitrogen. Pengaruh ini berdampak positif karena dapat mengurangi polusi dengan mengeluarkan nitrogen sesuai dengan kebutuhan tanaman di sekitarnya. Menurut Freeyer (2004), lahan setelah ditanami *alfafa* selama 4 tahun kemudian ditanami jagung menjadi lebih efektif dalam penggunaan urea sampai 33%. Hal ini disebabkan *alfafa* mampu mengikat N dari udara sebesar 35 kg/ha pada tahun I dan 102 kg N/ha tahun ke II (Ball, 2008). Kemudian Matensoon dan Ljunggren (1984) dan Freeyer (2004) melaporkan N yang dihasilkan *alfafa* per m² adalah 7.85 – 10.37 g. Menurut Russle (2004), sumbangan N dalam tanah sebesar 75 N/akre atau setara 84,24 kg N/ha dan setelah 2 – 3 tahun meningkat 130 N/akre atau setara 146,01 kg N/ha. Dengan demikian akan menyuburkan tanah secara alami sehingga terpenuhi kebutuhan nitrogen.

2.3 Akar Alfafa

Pusat dari bintil yang masuk membentuk zona bakteroid yang dikelilingi oleh beberapa lapis sel korteks. Volume relatif jaringan bakteroid (16 - 50% dari berat kering bintil) jauh lebih besar pada bintil yang efektif dibanding pada bintil

yang tidak efektif. Volume jaringan bakteroid dalam bintil yang efektif memiliki hubungan langsung yang positif dengan jumlah nitrogen yang difiksasi. Bintil yang tidak efektif yang dihasilkan oleh galur-galur yang tidak efektif umumnya kecil dan mengandung jaringan bakteroid yang tidak berkembang baik yang berhubungan dengan keabnormalan strukturnya. Bintil yang efektif umumnya besar dan berwarna merah muda (karena leghemoglobin) dengan jaringan bakteroid yang berkembang dan terorganisasi dengan baik (Rao, 2004).

Nodul atau bintil adalah jaringan (pembengkakan kecil) pada sistem akar kacang-kacangan sebagai tempat hidup rhizobia. Nodul mengeluarkan sinyal dalam bentuk molekul organik, yang disebut flavonoid, dari tanaman berkomunikasi dengan rhizobia tersebut. Dalam kebanyakan kacang-kacangan, pada ujung akar yang tumbuh bintil akar dan menginfeksi akar sebesar rambut untuk memungkinkan masuknya bakteri. Jaringan tertentu memproduksi daerah meristematik baru di mana terjadi pertumbuhan yang cepat di dalam nodul dan memberikan mereka air dan nutrisi. Rhizobia, sebagai imbalan, menggunakan bagian dari nutrisi yang disediakan untuk menghasilkan amonia (NH_3) dari N_2 . Amonia kemudian diubah menjadi senyawa organik untuk transportasi dan digunakan oleh tanaman (Loynchan. 2005).

Penemuan fiksasi nitrogen yang konsisten dalam ekstrak dari *Clostridium pasteurianum* oleh Carnahan *et al.* di laboratorium Du Pont di Amerika Serikat pada tahun 1960, merupakan tonggak sejarah dalam bidang fiksasi nitrogen secara biologi. Perluasan pengetahuan yang cepat dalam genetika bakteri telah

memberikan pengaruh besar dalam studi mengenai bakteri penambat N. Genetika mikroorganisme penambat nitrogen dipelajari oleh Postgate *et al.* di Inggris dan gen yang bertanggungjawab untuk fiksasi nitrogen sudah berhasil dipindahkan dari bakteri penambat nitrogen ke bakteri yang bukan penambat nitrogen (Rao, 1994).

2.4 Bakteri Rhizobium

Allah SWT yang menciptakan segala yang ada dan Allah SWT juga menentukan kadar ciptaan-Nya dengan ketentuan kadar masing-masing inilah Allah membuat variasi atas ciptaan-Nya sehingga tercipta makhluk dengan keadaan, karakter, dan fungsi masing-masing (Kusnadi, 2007). Hal ini diterangkan dalam Surat Ali-'Imran (3): 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka.(QS. Ali-'Imran:191).

Bakteri Rhizobium sebagai bakteri pengikat nitrogen berperan penting pada tanaman polongan. Peningkatan budidaya kacang-kacangan sangat penting untuk regenerasi tanah, kekurangan gizi dan memberikan nutrisi yang dibutuhkan bagi manusia dan hewan. Allah SWT menciptakan segala sesuatu untuk dipelajari dan memelihara ciptaannya seperti halnya bakteri yang memiliki sifat yang

merugikan tetapi dalam beberapa jenis bakteri memiliki sifat yang menguntungkan.. Hal ini dijelaskan dalam al-Quran surat al-Qamar (54): 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

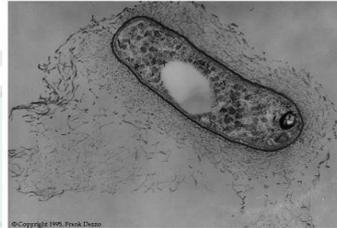
Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran. (QS. Al-Qamar:49)

Seperti pada bakteri *Rhizobium* yang bersimbiosis dengan tanaman *alfafa* yang mampu menfiksasi nitrogen sehingga menghasilkan protein yang menjadikan tanaman *alfafa* ini bermanfaat. Bakteri mempunyai ukuran yang mikroskopis tetapi memiliki tugas yang besar dalam hubungan simbiosis dengan akar tanaman *alfafa* yang membentuk nodul.

Bakteri dalam nodul kacang-kacangan saat ini diklasifikasikan menjadi 6 genus (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, dan *Allorhizobium*). Spesies rhizobia khusus untuk tanaman inang mereka sehingga produsen harus memastikan strain rhizobia sesuai untuk legum. Kurang dari 15% dari sekitar 20.000 spesies klasifikasi legum telah dievaluasi untuk nodulasi. Banyak kacang-kacangan hutan tropis belum dievaluasi tetapi mungkin memiliki potensi untuk pengembangan di masa mendatang (Loynachan, 2005).

Genus *Rhizobium* (Loynachan, 2005) awal mulanya berasal dari bahasa latin yang artinya hidup di akar dan untuk beberapa tahun ini merupakan genus untuk semua *Rhizobia*. Beberapa spesies kemudian pindah menjadi genus baru

berdasarkan analisis filogenik. Genus ini meliputi 16 spesies. Rhizobia adalah kelompok organisme yang sangat kecil (mikroorganisme) yang hidup di daerah perakaran di dalam tanah.



Gambar 1. Rhizobium Micrograph.

(<http://commtechlab.msu.edu>)

Bakteri rhizobium adalah salah satu contoh kelompok bakteri yang berkemampuan sebagai penyedia N bagi tanaman. Bila bersimbiosis dengan tanaman legum, kelompok bakteri akan menginfeksi akar tanaman dan membentuk bintil akar di dalamnya. Rhizobium hanya dapat memfiksasi nitrogen bebas atau diudara bila berada di dalam bintil akar dari legumnya. Peranan Rhizobium terhadap pertumbuhan tanaman khususnya berkaitan dengan masalah ketersediaan hara bagi tanaman inangnya (Loynachan, 2005).

Rhizobium yang berasosiasi dengan tanaman legum mampu memfiksasi 100-300 kg N/ha dalam satu musim tanam dan meninggalkan sejumlah N untuk tanaman berikutnya. Permasalahan yang perlu diperhatikan adalah efisiensi inokulan rhizobium untuk jenis tanaman tertentu. Rhizobium mampu mencukupi 80% kebutuhan nitrogen tanaman legum dan meningkatkan produksi antara 10% - 25%. Respon tanaman sangat bervariasi tergantung pada kondisi tanah dan efektivitas populasi asli (Sutanto, 2002).

Bakteri – bakteri yang termasuk dalam genus rhizobium hidup bebas dalam tanah dan di daerah perakaran tumbuh-tumbuhan legume maupun bukan legume. Walaupun demikian, bakteri rhizobium dapat bersimbiosis hanya dengan tumbuh-tumbuhan legum dengan menginfeksi akarnya dan membentuk bintil akar di dalamnya; pengecualian satu-satunya adalah bintil akar pada parasponia oleh *Rhizobium* sp. Bakteri bintil akar telah dibedakan berdasarkan pertumbuhannya pada substrat tertentu, sebagian cepat tumbuh dan lambat tumbuh (Sutanto, 2002).

Karakteristik bakteri *Rhizobium* secara makroskopis adalah warna koloni putih susu, tidak transparan, bentuk koloni sirkuler, konveks, semitranslusen, kebanyakan bagian tengah berwarna kuning karena perubahan pH, diameter 2-4 mm dan dalam waktu 3-5 hari pada akar khamir-manitol-garam mineral (Simanungkit. et, al. 2009). Secara mikroskopis sel bakteri *Rhizobium* berbentuk batang, aerobik, gram negatif dengan ukuran 0,5-0,9x1,2-3 μm , bersifat motil pada media cair. Untuk pertumbuhan optimum dibutuhkan temperatur 25-30° C, pH 6-7 (kecuali galur-galur dari tanah masam). Bakteri *Rhizobium* bersifat kemoorganotropik, yaitu dapat menggunakan berbagai karbohidrat dan garam-garam asam organik sebagai sumber karbonnya (Holl,1975).

Rhizobium dengan Leguminose dapat bersimbiosis dengan dicirikan oleh struktur bintil akar pada tanaman inang (leguminosae). Pembentukan bintil akar dimulai dengan sekresi produk metabolisme tanaman ke daerah perakaran yang menstimulasi pertumbuhan bakteri. Proses pembentukan bintil akar diawali dengan kolonisasi bakteri bintil akar di rhizosfer tanaman kacang-kacangan.

Kolonisasi *Bradyrhizobium japonicum* 5 hari setelah inokulasi pada tanaman kedelai terdapat pada ujung akar dan permukaan akar dekat ujung akar. Koinokulasi antara *Azotobacter lipoferum* T1371 dan *Rhizobium leguminosarum*, menunjukkan terjadinya kolonisasi bakteri pada pangkal akar dan akar sekunder pada rambut akar (Rahmawati, 2005)

Sebuah bakteroid yang berkembang baik tidak memiliki ekor dan dikelilingi oleh 3 unit membran. Terdapat suatu sistem membran intrasitoplasmik di dalam jaringan bakteroid bintil akar semanggi bawah tanah. Daerah inti bakteri tampak terbagi-bagi dan berhubungan dengan sitoplasma granuler. Bakteroid-bakteroid dapat dihasilkan secara in vitro pada suatu medium yang mengandung ekstrak khamir 3,5 %. Kafein beberapa alkaloid lain juga merangsang dihasilkannya bakteroid pada medium buatan. Tergantung dari legumnya, setiap bakteroid atau kelompok bakteroid dikelilingi oleh selubung membran yang identitasnya diinterpretasikan macam-macam, mungkin karena digunakannya teknik yang berbeda-beda dalam mempelajari struktur halus ini (Rao, 2004).

2.5 Peran Bakteri Rhizobium

Rhizobium merupakan kelompok bakteri yang mampu menyediakan hara bagi tanaman kedelai. Bila bersimbiosis dengan tanaman legum, kelompok bakteri ini mampu menginfeksi akar tanaman dan membentuk bintil akar. Bintil akar berfungsi mengambil nitrogen di atmosfer dan menyalurkannya sebagai unsur hara yang diperlukan tanaman inang. *Rhizobium* mampu menyumbangkan N dalam bentuk asam amino (Novariani, 2011).

Tak hanya meningkatkan nitrogen pada tanaman, *Rhizobium* mampu menghasilkan hormon pertumbuhan berupa IAA dan *giberlin* yang dapat memacu pertumbuhan rambut akar, percabangan akar yang memperluas jangkauan akar. Akhirnya, tanaman berpeluang besar menyerap hara lebih banyak yang dapat meningkatkan produktivitas tanaman (Novariani, 2011).

Selain itu rhizobium mampu meningkatkan penyerapan fosfat. Fosfat merupakan hara utama dalam perkembangan akar dan pembentukan polong kedelai. Penelitian Natakorn Boonkerd dari Suranaree University Thailand, menunjukkan fosfat meningkat 89% pada tanah yang diberi rhizobium dan tanpa pupuk. Apalagi jika diimbangi dengan pemberian pupuk buatan fosfat dan kalium, hasil kedelai melonjak 35% atau 2,25 ton/ha. Sebaliknya jika ditambahkan pupuk N, produktivitas justru menurun. Penyebabnya, *rhizobium* tak dapat bekerja maksimal dalam tanah dengan konsentrasi nitrogen yang tinggi (Novariani, 2011).

Dari beberapa penelitian yang ada dapat diperoleh keuntungan penggunaan bakteri *rhizobium* adalah: 1) mampu meningkatkan ketersediaan unsur hara, tidak mempunyai bahaya atau efek samping; 2) efisiensi penggunaan yang dapat ditingkatkan sehingga bahaya pencemaran lingkungan dapat dihindari; 3) harganya relatif murah; 4) teknologinya atau penerapannya relatif mudah dan sederhana (Novariani, 2011).

Menurut Winarso (2005), pemanfaatan mikroorganisme penambat N_2 ini akan mengurangi biaya produksi. Penambatan N_2 di atmosfer oleh mikroorganisme dapat membantu ketersediaan unsur N bagi tanaman dan dapat mengefisienkan penggunaan N yang berasal dari pupuk buatan. Apabila

keunggulan bakteri ini dapat dimanfaatkan dengan efisien, sehingga mampu mengurangi penggunaan pupuk N, dari hasil simbiosis bakteri *rhizobium* mampu mencukupi 75% kebutuhan N pada tanaman.`

2.6 Proses pembentukan Nodula pada Tanaman Legum oleh Rhizobium

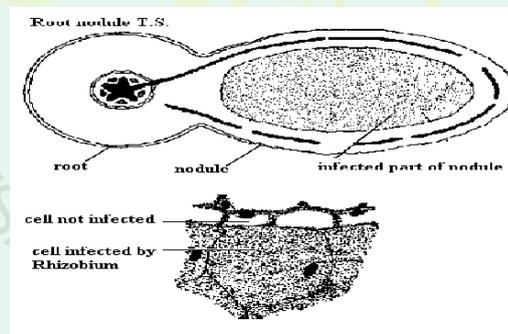
Rhizobium masuk ke dalam akar legum salah satunya melalui rambut akar atau secara langsung ke titik munculnya akar lateral. Akar yang atau pengontrol tumbuh dan cabang rambut akar adalah respons tanaman pertama yang dapat terlihat karena terinfeksi rhizobium. Meskipun demikian, nodula tanaman legum umumnya nampaknya mengandung hanya satu strain dari Rhizobium menjadikan akar tanaman dapat membentuk nodula dengan lebih dari satu strain (Gardner, *et al.* 1991).

Tanaman legum dalam kondisi ternodulasi oleh bakteri pemfiksasi N bersimbiosis dengan bakteri tanah dari genus *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium*. Interaksi antara bakteri rhizobium dengan tanaman legum dikendalikan oleh tanaman inang tertentu. Misalnya *S. meliloti* membentuk nodule pada *alfafa* dan *B. japonicum* membentuk nodula pada kedelai (Russle, 2005).

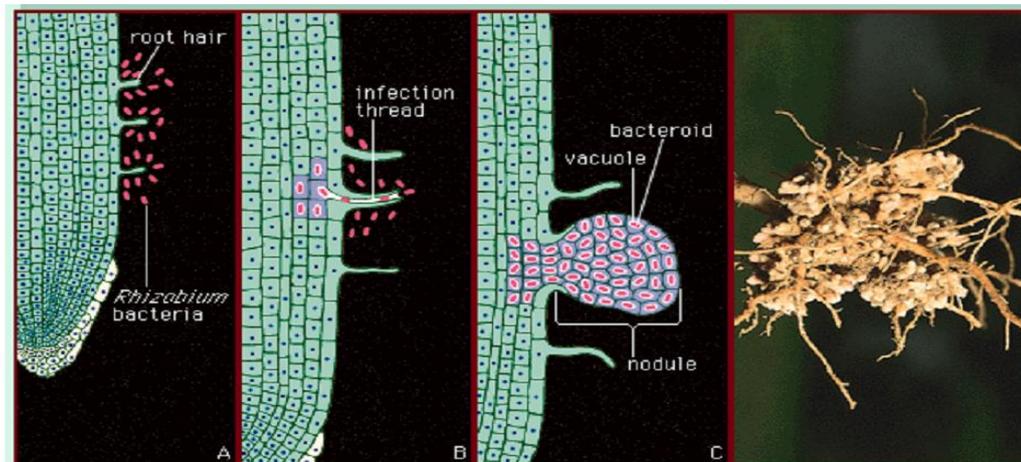
Rhizobium merupakan bakteri yang mampu mengadakan simbiosis dengan tanaman leguminosa. Akar tanaman akan mengeluarkan suatu zat yang merangsang aktivitas bakteri Rhizobium. Apabila bakteri sudah bersinggungan dengan rambut akar, rambut akar akan mengeriting. Setelah memasuki akar, bakteri berkembang biak yang terlihat dari pembengkakan akar. Pembengkakan akar akan semakin besar dan akhirnya terbentuklah bintil akar. Nitrogen yang

ditambat dipindahkan dari bintil akar ke berbagai bagian tanaman inang, sedang bakteri akan mendapatkan makanan dan mineral dari tanaman inang (Hidayat, 2006).

Bakteri-bakteri Rhizobium di dalam bintil akar terdapat dalam sel-sel jaringan bakteroid. Sel-sel jaringan bakteroid selain mengandung Rhizobium juga mengandung enzim nitrogenase dan leghaemoglobin yang berwarna merah. Pembentukan bintil akar merupakan sistem yang sangat kompleks dan sangat tergantung pada ketersediaan N, P, K, Ca serta unsur mikro (Mo, Co), kelembaban, suhu dan pH tanah. Enzim nitrogenase berperan dalam penambatan N_2 udara menjadi NH_3 (amonia) dalam jaringan bintil akar (Hidayat, 2006).



Gambar 2. Akar yang terinfeksi rhizobium



Gambar 3. (Kanan) Akar dari *Pisum sativum* dengan nodula yang dibentuk oleh bakteri fiksasi nitrogen (*Rhizobium*). (Kiri) Nodula Akar berkembang sebagai hasil dari simbiosis antara bakteri *Rhizobium* dengan rambut akar pada tanaman.

Keterangan:

- (A) Bakteri mengenal rambut akar dan mulai membelah.
- (B) Masuknya rhizobia ke akar melalui infeksi sehingga bakteri masuk ke dalam sel akar.
- (C) membelah/membagi menjadi bentuk nodula (Ensiklopedi Britania, 1996).

Pembentukan nodul yang melibatkan beberapa fitohormones melalui dua proses infeksi dan nodul-organogenesis terjadi secara bersamaan selama pembentukan bintil akar. Selama proses infeksi, rhizobia yang melekat pada rambut akar dan melepaskan faktor Nod yang menginduksi akar untuk melengkung dari sel-sel akar rambut (Gambar 4 A dan B). Rhizobia menutup bagian lain agar rambut akar mengeriting. Dinding sel rambut akar terdegradasi di wilayah ini dalam menanggapi Nod faktor, yang memungkinkan akses kelur dan masuknya sel-sel bakteri langsung ke permukaan luar membran plasma tanaman (Lazarowitz dan Bisseling 1997).

Langkah selanjutnya adalah pembentukan benang infeksi (Gambar 4 C), perpanjangan internal yang tubular dari membran plasma yang dihasilkan oleh fusi Golgi diturunkan vesikel membran di tempat infeksi. Benang tumbuh di ujungnya oleh fusi dari vesikel sekretorik pada ujung tabung. Lebih dalam dari korteks akar dan di dekat xilem, sel-sel kortikal dedifferentiate dan mulai membagi, membentuk area yang berbeda dalam korteks, yang disebut primordial nodul, nodul yang akan berkembang. Nodul bentuk primordia berlawanan kutub protoxylem dari bundel akar vaskular (Timmers et al. 1999).

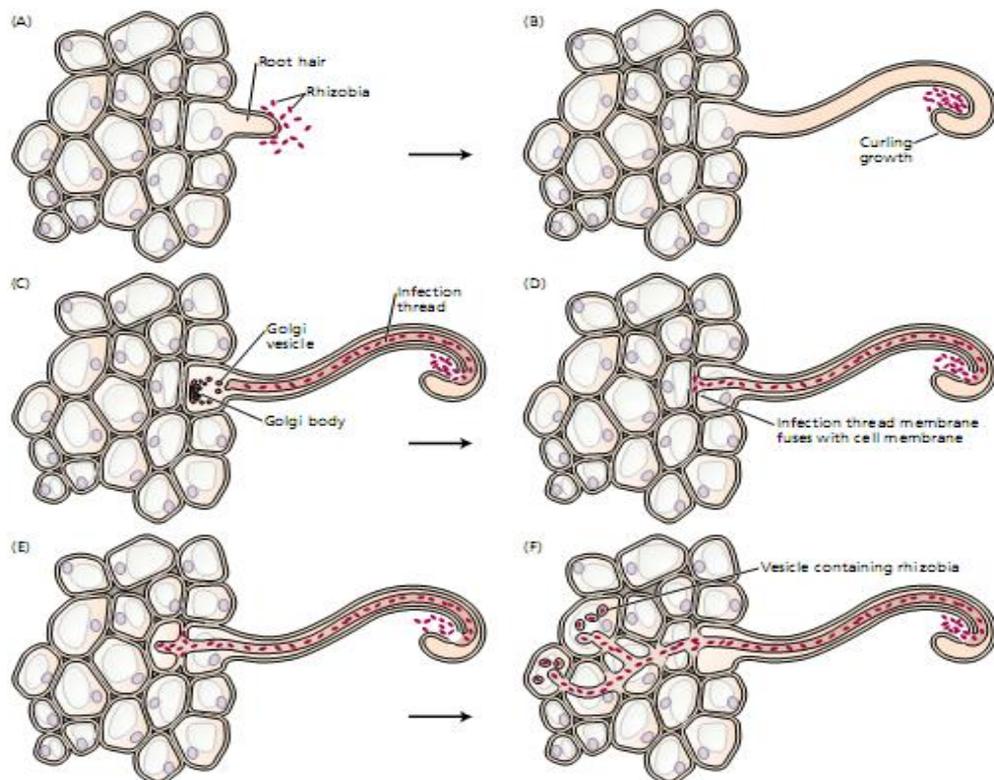
Senyawa sinyal yang berbeda memberikan sinyal positif atau negatif, mengontrol posisi primordia nodul. Uridin nukleosida ini berdifusi dari prasasti ke korteks di zona protoxylem akar dan merangsang pembelahan sel (Lazarowitz dan Bisseling 1997). Ethylene disintesis di daerah dekat Pericycle tersebut, kemudian berdifusi ke korteks, dan pembelahan sel blok berlawanan kutub floem akar.

Benang infeksi diisi oleh koloni rhizobia yang memanjang melalui akar rambut dan lapisan sel kortikal, ke arah primordial nodul. Ketika benang infeksi mencapai sel-sel khusus dalam nodul, ujungnya menggulung, dengan membran plasma sel inang, kemudian melepaskan sel-sel bakteri yang dikemas dalam membran berasal dari membran sel inang plasma (lihat Gambar 4 D). Percabangan benang infeksi di dalam nodul memungkinkan bakteri untuk menginfeksi banyak sel (Gambar 4 E dan F) (Mylona et al. 1995).

Pada awalnya bakteri terus membelah, dan peningkatan membran sekitarnya di daerah permukaan untuk mengakomodasi pertumbuhan ini dengan

menggabungkan dengan vesikel kecil. Tak lama kemudian, setelah sinyal ditentukan dari tanaman, bakteri berhenti membelah dan mulai membesar dan berdiferensiasi menjadi organel endosymbiotic nitrogen disebut bakteroid. Membran yang mengelilingi bakteroid disebut membran peribakteroid.

Nodul secara keseluruhan mengembangkan fitur seperti sistem vaskular (yang memfasilitasi pertukaran tetap nitrogen yang dihasilkan oleh bakteroid nutrisi disumbangkan oleh tanaman) dan lapisan sel untuk menyaring O_2 dari interior bintil akar. Dalam beberapa kacang-kacangan beriklim (misalnya, kacang polong), nodul yang memanjang dan silindris karena adanya meristem nodul. Nodul dari kacang-kacangan tropis, seperti kedelai dan kacang tanah, tidak memiliki meristem gigih dan bulat (Rolfe dan Gresshoff 1988).



Gambar 4: Proses infeksi selama bintil organogenesis. (A) mengikat rhizobia ke akar rambut yang muncul sebagai respon terhadap atraktan kimia yang dikirim oleh tanaman. (B) Dalam menanggapi faktor-faktor yang dihasilkan oleh bakteri, akar rambut menunjukkan pertumbuhan melengkung normal, dan sel-sel rhizobia berkembang biak di dalam gulungan. (C) Degradasi terlokalisasi dinding akar rambut menyebabkan infeksi dan pembentukan benang infeksi dari Golgi vesikel sekretori sel akar. (D) Benang infeksi mencapai akhir dari sel, dan membran sekering dengan membran plasma sel akar rambut. (E) rhizobia dilepaskan ke apoplast dan menembus lamella tengah senyawa pada membran sel subepidermal plasma, yang mengarah ke awal dari sebuah benang infeksi baru, yang membentuk saluran terbuka dengan yang pertama. (F) Benang infeksi meluas dan cabang hingga mencapai sel target, di mana vesikula terdiri dari membran tanaman yang mengapit sel-sel bakteri dilepaskan ke sitosol (taiz dan zeiger, 2002).

Faktor nod diproduksi oleh bakteri bertindak sebagai sinyal untuk simbiosis dimulai dari gen nod diaktifkan oleh kode NodD untuk protein nodulasi, sebagian besar yang terlibat dalam biosintesis faktor Nod. Nod faktor lipochitin adalah molekul sinyal oligosakarida, yang semuanya memiliki kitin β -1 \rightarrow 4-

linked backbone Nacetyl-D-glukosamin (bervariasi panjangnya dari tiga sampai enam unit gula) dan rantai asil lemak pada C-2 posisi gula nonreducing.

Tiga gen nod (Noda, nodB, dan nodC) mengkodekan enzim (Noda, NodB, dan NodC, masing-masing) yang diperlukan untuk sintesis struktur ini dasar (Stokkermans et al 1995.):

1. Noda adalah N-acyltransferase yang mengkatalisis penambahan rantai asil lemak.
2. NodB adalah deacetylase chitin-oligosakarida yang menghilangkan gugus asetil dari gula nonreducing terminal.
3. NodC adalah synthase chitin-oligosakarida yang menghubungkan N-asetil-D-glukosamin monomer.

Gen nod-host tertentu yang bervariasi antara spesies rhizobial terlibat dalam modifikasi rantai asil lemak atau penambahan kelompok penting dalam menentukan spesifisitas host (Carlson et al 1995.):

- Node dan NodF menentukan panjang dan derajat kejenuhan dari rantai asil lemak; orang-orang dari *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* dan *R. meliloti* mengakibatkan sintesis dari 18:04 dan 16:02 gugus asil lemak masing-masing.
- enzim lain, seperti NodL, mempengaruhi spesifisitas sejumlah faktor Nod melalui penambahan substitusi tertentu pada mengurangi atau nonreducing sebagian gula dari backbone chitin.

Khususnya untuk tanaman legum merespon faktor Nod tertentu. Reseptor legum untuk faktor Nod tampaknya lektin khusus (protein gula-binding) diproduksi di rambut akar (van Rhijn et al 1998;. Etzler et al, 1999). Faktor Nod mengaktifkan lektin ini, meningkatkan hidrolisis mereka obligasi phosphoanhydride dari nukleosida di-dan trifosfat. Aktivasi lektin ini mengarahkan rhizobia khusus untuk host yang tepat dan memfasilitasi lampiran rhizobia ke dinding sel rambut akar.

Pembentukan bintil akar yang efektif bersimbiosis melibatkan signal antara tanaman (*macrosymbiont*) dan bakteri. Flavonoids atau isoflavonoid dilepaskan dari akar tanaman leguminosa membuat transkrip dari gene rhizobia bintil akar yang sesuai, kemudian membentuk molekul *lipochito oligosaccharide*, yang memberi tanda pada tanaman leguminosa untuk mulai membentuk bintil akar (Long, 1996).

Bakteri *Rhizobium* yang masuk ke dalam sel akar melalui epidermis akar dan membentuk formasi bintilakar melalui pengaturan ulang perkembangan sel luar akar. Keberhasilan interaksi ini memerlukan koordinasi dari kedua proses tersebut. Secara umum, proses infeksi dimulai dengan pengeritingan rambut akar, yang diduga disebabkan oleh reorientasi gradual dan konstan ke arah pertumbuhan bulu akar. Bakteria tertangkap dalam gulungan bulu akar, kemudian dinding sel tanaman di tempat tertentu terdegradasi, sel membran membentuk liang dan material baru disimpan oleh tanaman dan bakteri (Limpens dan Bisseling, 2003).

Enzim dari bakteri merombak bagian dinding sel sehingga bakteri dapat masuk ke dalam sel bulu akar. Kemudian, bulu akar membentuk struktur lir-benang yang disebut benang infeksi, yang terdiri dari membran plasma lurus dan memanjang dari sel yang terserang, Bersamaan dengan pembentukan selulosa baru disebelah dalam membran ini. Tiap bakteri yang membesar dan tak bergerak disebut bakteroid. Sel bintil akar lazimnya mengandung beberapa ribu bakteroid (Armiadi, 2009).

Menurut Gardner, *et al* (1991), proses terbentuknya nodul terjadi setelah kolonisasi pada akar oleh galur rhizobium yang cocok, proses infeksi dan nodulasi terjadi sebagai berikut:

1. Deformasi (perubahan bentuk) bulu akar (yaitu membelok atau bercabang), mungkin sebagai respon terhadap etilen, yang dirangsang oleh IAA.
2. Pembentukan benang infeksi untuk mentransfer sel-sel bakteri ke dalam korteks akar
3. Pelepasan bakteri ke dalam sel-sel korteks
4. Pembentukan meristem bintil dan perluasan bintil dengan pembelahan sel-sel korteks.
5. Pembesaran sel-sel korteks yang terinfeksi di bagian dalam bintil
6. Dalam bintil yang lebih tua, hilangnya selubung bakteroid (bakteri bintil) dan aktifitas nitrogenase dengan dimulainya proses tumbuhan tersebut menua.

Ada dua tipe nodula, yaitu efektif dan inefektif. Nodula efektif dibentuk oleh strains efektif dari Rhizobium. Nodula ini berkembang dengan baik, berwarna merah muda akibat adanya pigmen leghaemoglobin. Jaringan bakteroid berkembang baik dan terorganisasi dengan baik dengan banyak bakteroid. Ada

dua tipe nodula yaitu efektif dan inefektif. Nodula efektif dibentuk oleh strains efektif dari *Rhizobium*. Nodula ini berkembang dengan baik, berwarna merah muda akibat adanya pigmen leghemoglobin. Jaringan bakteroid berkembang baik dan terorganisasi dengan baik dengan banyak bakteroid, berbeda dengan strain inefektif (Chapman. 1987).

Tanaman legum dalam kondisi ternodulasi oleh bakteri pemfiksasi N bersimbiosis dengan bakteri tanah dari genus *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium*. Interaksi antara bakteri rhizobium dengan tanaman legum dikendalikan oleh tanaman inang tertentu. Misalnya *S. meliloti* membentuk nodule pada *alfafa* dan *B. japonicum* membentuk nodula pada kedelai (Martensson. 1984).

2.7 Fiksasi Nitrogen Oleh Bakteri Rhizobium

Bakteri tanah tertentu, yang disebut rhizobia, dapat menginfeksi akar kacang-kacangan, seperti *alfafa*. Berbeda dengan respon terhadap bakteri patogen, kacang-kacangan menghasilkan struktur akar khusus yang disebut nodul, di mana rhizobia tumbuh. Di sana mereka diberi makan dan dilindungi oleh tanaman, mereka berkembang biak, dan mereka menangkap gas N_2 dari udara dan mengubahnya menjadi asam amino yang digunakan tanaman untuk pertumbuhan. Meskipun jutaan nodul *alfafa* dalam akar mempunyai berat hanya beberapa kilogram, mereka masing-masing dapat berisi beberapa miliar rhizobia yang dapat memproduksi ratusan kilogram N_2 per hektar setiap tahun. Kami baru-baru ini memperkirakan bahwa fiksasi N_2 oleh *alfafa* rentang dari sekitar 40 sampai 420 N

/ m setiap tahun di Mississippi River Basin (Russle dan Birr, 2004), mirip dengan rentang laju fiksasi N₂ (Russle, 2005).

Fiksasi nitrogen terjadi dalam bakteroid. Antara bakteri dan selubung membran yang mengelilingi bintil akar terdapat suatu pigmen merah mirip dengan hemoglobin darah. Karena berada di dalam bintil akar legum maka dinamakan *leg-homoglobin* ada beberapa fungsi dari pigmen ini, yaitu (Hidayat, 2006):

1. Sebagai tempat arbsorpsi dan reduksi nitrogen.
2. Sebagai pembawa elektron khusus dalam fiksasi nitriген.
3. Sebagai pengatur tingkat keberadaan oksigen (O₂), dan
4. Sebagai pembawa O₂ nitrogen yang difiksasi oleh legum.

Mekanisme penambatan nitrogen secara biologis dapat digambarkan melalui persamaan berikut ini. Dua molekul amonia dihasilkan dari satu molekul gas nitrogen dengan menggunakan 16 molekul ATP dan pasokan elektron dan proton (ion hidrogen).



Reaksi ini hanya dilakukan oleh bakteri prokariot menggunakan suatu kompleks enzim nitrogenase. Enzim ini mengandung 2 molekul nutrien yaitu molekul protein besi dan 1 molekul protein molibden besi. Reaksi ini berlangsung ketika molekul N₂ terikat pada kompleks enzim nitrogenase. Protein Fe mula-mula direduksi oleh elektron yang diberikan oleh ferredoksin. Kemudian Fe reduksi mengikat ATP dan mereduksi protein molibden besi yang memberikan

elektron pada N_2 sehingga menghasilkan $NH=NH$. Pada dua daur berikutnya prosesi ini (masing-masing membutuhkan elektron yang disumbangkan oleh ferredoksin) $NH=NH$ direduksi menjadi H_2N-NH_2 dan selanjutnya direduksi menjadi NH_3 tergantung pada jenis mikroianya, ferredoksin reduksi yang memasok elektron untuk proses ini diperoleh melalui fotosintesis, respirasi atau fermentasi (Simanungkalit, et al. 2009).

Rumus pemanfaatan nitrogen bagi tanaman sendiri dapat dilihat sbb :



Simbiosis mutualisme yang terjadi. Bakteri mendapatkan zat hara yang kaya energi dari tanaman inang sedangkan tanaman inang mendapatkan senyawa nitrogen dari bakteri untuk melangsungkan kehidupannya. Untuk menambat nitrogen, bakteri ini menggunakan enzim nitrogenase, dimana enzim ini akan menghambat gas nitrogen di udara dan merubahnya menjadi gas amoniak. Gen yang mengatur proses penambatan ini adalah gen nif, (singkatan nitrogen-fixation). Gen-gen nif ini berbentuk suatu rantai, tidak terpencah ke dalam sejumlah DNA yang sangat besar yang menyusun kromosom bakteri, tetapi semuanya terkelompok dalam suatu daerah. Hal ini memudahkan untuk memotong bagian untaian DNA yang sesuai dari kromosom ribozobium yang menyisipkannya ke dalam mikroorganisme lain (Simanungkalit, et al. 2009).

Tanaman *alfafa* pada beberapa tanah, jumlah dan aktivitas nodul mungkin terlalu rendah untuk memasok N_2 yang dibutuhkan untuk hasil maksimum dari

pemanenan pertama. Setelah itu, pasokan N₂ dari tanah, cadangan disimpan, dan simbiosis N₂ fiksasi mungkin tetap tidak memadai, dan tanggapan hasil rendahnya tingkat pupuk N₂ dapat dilihat (Bélanger dan Richards, 2000). Seperti tanaman keras lainnya, *alfafa* mengandalkan disimpan N₂ untuk pertumbuhan tunas setelah panen. Satu-sepertiga sampai setengah dari N₂ disimpan dalam akar dan mahkota digunakan (Russle et al., 2004), karena kedua simbiosis fiksasi N₂ dan serapan N₂ anorganik (Kim et al., 1993) terbatas selama satu sampai dua minggu setelah panen.

Respon hasil terhadap pupuk N₂ jarang terlihat, meskipun konsentrasi N₂ dan disimpan kadar N₂ dalam akar (Barber et al., 1996) dapat meningkat. Namun, penambah N₂ dapat meningkatkan *alfafa* hasil ketika pasokan tanah N sangat rendah dan ketika N penurunan fiksasi di musim gugur. Kurangnya umum respon hasil telah menyebabkan persepsi bahwa tanaman tidak menggunakan N. diterapkan Hal ini tidak benar, karena tanaman hanya pengganti N₂ anorganik untuk fiksasi N₂, dan ini adalah cara utama *alfafa* membantu mencegah pencemaran lingkungan (Raun et al., 1999).

Kacang-kacangan menghasilkan struktur akar khusus yang disebut nodul, di mana rhizobia tumbuh. Di sana mereka diberi makan dan dilindungi oleh tanaman, mereka berkembang biak, dan mereka menangkap gas N dari udara dan mengubahnya menjadi asam amino yang menggunakan tanaman untuk pertumbuhan. Asam amino utama dalam bentuk nitrogen dan dominan pada tumbuhan *alfafa* adalah asparagin; selain asparagin asam amino yang mula mula

terbentuk dalam sintesis ini adalah ureida dan sitrullin. Dengan naiknya serapan unsur ini maka akan menambah pula metabolisme protein di dalam tumbuhan ini, sehingga kadar protein tanaman akan meningkat (Raun et al., 1999).

Alfafa merupakan tanaman polong yang dapat membentuk bintil akar. Pemberian biorisa-02 berkadar 2 tablet/tanaman pada *alfafa* diduga akan mempercepat pembentukan bintil akar tanaman ini. Bintil akar yang terbentuk pada tanaman *Medicago* sp ini lazimnya mengandung beberapa ribu bakteroid. Bakteroid biasanya berkelompok di dalam sitoplasma yang dikelilingi oleh suatu sekat yang disebut membran peribakteroid. Diluar ruang peribakteroid ini terdapat leghemoglobin yang berwarna merah dan menempel sebagai gugus prostetik akan membentuk senyawa nitrogen utama yaitu asparagin dan ureida yang nantinya akan dirombak menjadi asam amino, amida dan protein. dengan meningkatnya pemberian biorisa-02 ini akan memacu sintesis asparagin dan ureida yang akan menyebabkan naiknya protein yang disintesis tanaman *alfafa* (Parman,2007).

Menurut Suciatmih (1996) akar mikorisa atau hifa jamur ini dapat menyerap unsur P dari larutan tanah, pada konsentrasi dimana akar tidak bermikorisa tidak dapat menjangkaunya, meskipun dengan rambut akar yang berlimpah. Diameter hifa jamur yang relatif kecil yaitu 2 – 5 um akan mudah menembus pori pori-pori tanah yang tidak bisa dimasuki rambut akar yang diameternya relatif besar.

Hipotesis yang ke dua yaitu dengan naiknya dosis biorisa-02 yang diberikan pada tanaman, adalah dengan pemberian pupuk biorisa-02 akan terjadi

peningkatan pembentukan bintil akar. Tanaman *Medicago sativa* merupakan tanaman polongan yang mampu membentuk bintil akar memacu penyerapan N dari tanah baik dalam bentuk nitrat, amonia atau amonium, nitrogen organik dan molekul nitrogen. (Suciatmih, 1996). Nitrat atau amonium. Dalam bentuk ion NO_3 dari tanah akan diangkut dari akar ke bagian atas tumbuhan melalui sillem dan mula mula akan direduksi terlebih dahulu menjadi amonium atau amonia, baru diubah menjadi senyawa N organik. Adapun mekanisme reduksi nitrat menjadi amonium atau amonia dan senyawa organik menurut (Salisbury & Ross, 1992) adalah sebagai berikut: (1) Perubahan nitrat (NO_3) menjadi nitrit (NO_2) oleh enzim nitrat reduktase (2). Perubahan nitrit menjadi hiponitrit oleh enzim nitrit reduktase (3) Perubahan hiponitrit menjadi hidroksilamin dan (4) Perubahan hidroksilamin menjadi amonia oleh enzim hidroksilamin reduktase; dalam bentuk amonia ini karena merupakan senyawa yang toksik maka akan segera mengalami sintesis lebih lanjut menjadi senyawa- senyawa organik baik yang berupa asam amino, amida maupun senyawa karbamil fosfat, dengan kenaikan sintesis senyawa ini akan menambah protein sebagai hasil sintesis

Peningkatan protein *Medicago* akibat pemupukan biorisa-02 disebabkan karena adanya peningkatan metabolisme menjadi ureida dan sitrullin. Merupakan asam amino utama dalam bentuk nitrogen dan dominan pada tumbuhan *alfafa* adalah asparagin. Bahwa selain asparagin asam amino yang mula mula terbentuk dalam sintesis ini adalah ureida dan sitrullin. Dengan naiknya serapan unsur ini maka akan menambah pula metabolisme protein di dalam tumbuhan ini, sehingga kadar protein tanaman akan meningkat (Parman, 2009).