

**TUGAS MAKALAH
MATA KULIAH BIOFERTILISASI**

Fiksasi N Biologis pada Ekosistem Tropis

**DOSEN MATA KULIAH :
PROF. DR. TUALAR SIMARMATA**

**Oleh :
Intan Ratna Dewi A.
1509 2006 0001
Ilmu Tanaman/Ekofisiologi Tanaman**



**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS PADJADJARAN
BANDUNG
2007**

I. PENDAHULUAN

1.1 Penambatan Nitrogen

Nitrogen adalah unsur yang diperlukan untuk membentuk senyawa penting di dalam sel, termasuk protein, DNA dan RNA. Tanaman harus mengekstraksi kebutuhan nitrogennya dari dalam tanah. Sumber nitrogen yang terdapat dalam tanah, makin lama makin tidak mencukupi kebutuhan tanaman, sehingga perlu diberikan pupuk sintetis yang merupakan sumber nitrogen untuk mempertinggi produksi. Keinginan menaikkan produksi tanaman untuk mencukupi kebutuhan pangan, berakibat diperlukannya pupuk dalam jumlah yang banyak. Industri pupuk yang ada belum dapat memenuhi kebutuhan pupuk yang semakin meningkat. Untuk itu perlu dicari pupuk nitrogen alternatif dan rekayasa gen hijau kelihatannya dapat memberikan harapan untuk memenuhi kebutuhan pupuk di masa yang akan datang.

Udara yang menyelubungi bumi mengandung gas nitrogen sebanyak 80 %, sebahagian besar dalam bentuk N_2 yang tidak dapat dimanfaatkan. Tanaman dan kebanyakan mikroba tidak mempunyai cara untuk mengikat nitrogen menjadi senyawa dalam selnya. Tanaman dan mikroba umumnya mendapatkan nitrogen dari senyawa seperti ammonium (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-). Untuk memanfaatkan nitrogen dalam bentuk gas, pakar bioteknologi memusatkan perhatiannya pada hubungan antara tanaman dengan jenis mikroba tertentu yang dapat menambat nitrogen dari udara dan menyusun atom nitrogen kedalam molekul ammonium, nitrat, atau senyawa lain yang dapat digunakan oleh tumbuhan (Prentis, 1984).

Tanaman kacang-kacangan seperti buncis, kedelai, akarnya mempunyai bintil – bintil berisi bakteri yang mampu menambat nitrogen udara, sehingga nitrogen tanah yang telah diserap tanaman dapat diganti. Simbiosis antara tanaman dan bakteri

saling menguntungkan untuk kedua pihak. Bakteri mendapatkan zat hara yang kaya energi dari tanaman inang sedangkan tanaman inang mendapatkan senyawa nitrogen dari bakteri untuk melangsungkan kehidupannya.

Bakteri penambat nitrogen yang terdapat didalam akar kacang-kacangan adalah jenis bakteri *Rhizobium*. Bakteri ini masuk melalui rambut-rambut akar dan menetap dalam akar tersebut dan membentuk bintil pada akar yang bersifat khas pada kacang – kacang. Belum diketahui sepenuhnya bagaimana *rhizobium* masuk melalui rambut – rambut akar, terus ke dalam badan akar dan selanjutnya membentuk bintil – bintil akar.

Tabel 1. Beberapa spesies *Rhizobium* dan tanaman simbiosanya

Spesies Rhizobium	Tanaman simbiosanya
<i>R. leguminosorum</i>	Pea (<i>Pisum spp</i>), lentil (<i>Lens culinaris</i>)
<i>R. phaseoli</i>	Kacang buncis (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
<i>R. trifolii</i>	Clover (<i>Trifolium subteranum</i>)
<i>R. melioli</i>	Alfafa (<i>Medicago sativa</i>)
<i>R. lupini</i>	Lupin (<i>Lupinus, spp</i>)
<i>R. japonicum</i>	Kedelai (<i>Glycine max</i>)
<i>Rhizobium. spp</i>	Cowpea (<i>Vigna, spp</i>), kacang tanah (<i>Desmodium spp</i>)

Untuk menambat nitrogen, bakteri ini menggunakan enzim nitrogenase, dimana enzim ini akan menambat gas nitrogen di udara dan merubahnya menjadi gas amoniak dan kemudian asetilen menjadi ethylen. Gen yang mengatur proses penambatan ini adalah gen *nif* (Singkatan *nitrogen – fixation*). Gen – gen *nif* ini berbentuk suatu rantai , tidak terpecah kedalam 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 *Rhizobium* dan menyisipkannya ke dalam mikroorganisme lain (Prentis, 1984). Dengan rekayasa genetik telah berhasil ditransfer gen *nif* dari bakteri *Rhizobium* ke dalam bakteri *Escherichia coli*, sehingga *E. coli* mampu untuk menambat nitrogen.

Beberapa kelompok bakteri yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi tanaman adalah : (a) *Rhizobium* (bakteri penambat N₂ yang bersimbiosis dengan kacang – kacang), (b) *Azotobakter*, *Azospirillum* (bakteri penambat N₂ yang tidak bersimbiosis dengan tanaman), (c) *Bacillus subtilis*, *B. polymixa* (bakteri penghasil senyawa yang dapat melarutkan fosfat tanah), (d) *Clostridium* dan (e) *Pseudomonas fluorescens* dan *P. putia*.

Potensi penggunaan rizobakteria sebagai inokulan telah banyak mendapat perhatian dari pakar mikrobiologi tanah dan penyakit tanaman, karena sifat dari rizobakteria ini sangat agresif dalam mengkolonisasi akar menggantikan tempat mikroorganisme yang dapat menimbulkan penyakit pada tanaman. (Burr, 1978). Hubungan antara tanaman dan mikroorganisme terjadi di daerah rizosfer, mikroorganisme dapat hidup dari substrak yang dikeluarkan oleh tanaman melalui akar ataupun tanaman yang mati, disamping itu dapat juga merangsang pengeluaran unsur hara dari akar (Vancura, 1964), dapat menghasilkan senyawa – senyawa yang mempercepat pertumbuhan (Bowen dan Rovira, 1961).

Beberapa keuntungan dengan memanfaatkan kelompok mikroorganisme ini adalah :

1. tidak mempunyai bahaya atau efek sampingan,
2. Efisiensi penggunaan yang dapat ditingkatkan sehingga bahaya pencemaran lingkungan dapat dihindari,
3. harganya yang relatif murah, dan

4. Teknologinya yang sederhana. Pemanfaatan kelompok mikroorganisme ini telah diterapkan di negara – negara maju dan beberapa negara berkembang.

1.2 Mikrobia penambat nitrogen

Sumber utama N berasal dari gas N₂ dari atmosfer. Kadar gas nitrogen di atmosfer bumi sekitar 79% dari volumenya. Walaupun jumlahnya sangat besar tetapi belum dapat dimanfaatkan oleh tanaman tingkat tinggi, kecuali telah menjadi bentuk yang tersedia. Proses perubahan tersebut: (1). Penambatan oleh mikrobia dan jasad renik lain. Jasad renik ada yang hidup simbiotis dengan tanaman tanaman legum (kacang-kacangan) maupun tanaman non legum, (2). Penambatan oleh jasad-jasad renik yang hidup bebas di dalam tanah atau yang hidup pada permukaan organ tanaman seperti daun, dan (3). Penambatan sebagai oksida karena terjadi pelepasan muatan listrik di atmosfer.

Tabel 2. Macam dan sumber energi fiksasi N secara biologis

Macam fiksasi	Simbiosis	Asosiasi bebas	Mikrobia bebas	
Mikrobia	<i>Rhizobium</i> <i>Actionomycetes</i>	<i>Azospirillum</i> <i>Azotobacter</i> <i>paspal.</i>	<i>Azotobacter rhodospirillum</i> <i>Klebsella</i>	
Energi Kemampuan (kg/th)	sukrosa 50 - 600	tanaman inang 12 – 313	Heterotrof 0,1- 0,5	Autotrof 25

Selama berabad-abad penggunaan legum (kacang-kacangan) dalam pergiliran tanaman serta penggunaan pupuk kandang merupakan cara-cara yang penting dalam penyediaan nitrogen tambahan pada tanaman non legum.

Meskipun masih merupakan sumber nitrogen yang besar sumbangannya bagi pertumbuhan tanaman, selama beberapa dekade sekarang ini sumber nitrogen kacang-kacangan dan pupuk kandang makin hari makin menurun peranannya. Jumlah nitrogen yang ditambat oleh rhizobia sangat bervariasi tergantung *strain*, tanaman inang serta lingkungannya termasuk ketersediaan unsur hara yang diperlukan.

Selandia Baru merupakan negara yang sangat mementingkan penggunaan pupuk nitrogen berasal dari penambatan N dari atmosfer.

Banyak genus rhizobia yang hanya dapat hidup menumpang pada tanaman inang tertentu (spesifik). Sebagai contoh bakteri yang bersimbiosis dengan kedelai (Soybean) umumnya tidak dapat bersimbiosis dengan tanaman alfalfa (Medicago). Agar kemampuan menambat nitrogen tinggi maka tanaman inang harus dinokulasi dengan inokulan yang sesuai.



Gambar 1. Akar *Medicago truncatula* yang ternodulasi (www.cebitec.uni-bielefeld.de)

Fiksasi nitrogen sangat penting untuk lingkungan dan pertanian berkelanjutan (*Sustainable agriculture*). Sebagian besar tanaman mengasimilasi nitrogen hanya dari tanah melalui penambahan pupuk. Sumber alternatif lain adalah Rhizobia yang mampu menyebabkan pembentukan nodula pada akar dari tanaman legum sebagai tanaman inang. Organ tanaman khusus diserang oleh bakteri yang memfiksasi nitrogen dalam keadaan bakteroid endosimbiotik dalam sel tanaman. Proses ini melibatkan pengenalan spesifik dan diferensiasi berkembang baik bakteri dan sel tanaman inang. Rhizobia berhadapan dengan bermacam-macam kondisi lingkungan seperti bakteri yang hidup bebas dalam tanah, selama proses infeksi dan seperti diferensiasi bakteroid dalam sel tanaman.

Kapasitas rhizobia untuk beradaptasi terhadap perubahan kondisi lingkungan adalah sangat penting untuk keberadaannya dalam ekosistem dan interaksi simbiotik.

II. SIMBIOSIS RHIZOBIA DAN TANAMAN LEGUM

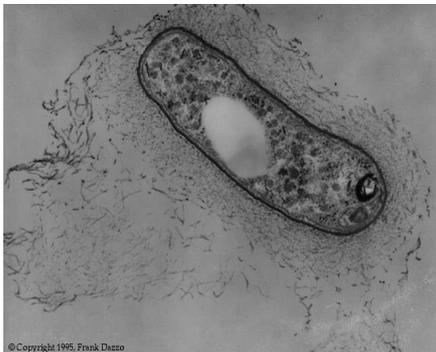
2.1 Taksonomi Rhizobia

Spesies yang terdaftar disini hampir semua valid/sah yang dipublikasikan namanya sebagai Rhizobia, yang mana berisi 62 spesies yang ditemukan dalam 12 genera. Rhizobia adalah bakteri pemfiksasi nitrogen yang membentuk nodula akar dalam tanaman legum. Hampir semua spesies bakteri ini adalah famili *Rhizobiaceae* dalam alpha-proteobacteria dan salah satunya *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* atau genera *Bradyrhizobium*. Bagaimanapun, penelitian akhir-akhir ini telah menunjukkan bahwa terdapat spesies lain dari Rhizobia ini. Dalam beberapa kasus spesies baru ini telah membangun melalui transfer gen lateral dari gen simbiotik.

Genus *Rhizobium* (Frank, 1889) 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 genera baru berdasarkan analisis pilogenetik. Dan sekarang ini meliputi 16 spesies.

1. *Rhizobium*

Rhizobia adalah kelompok organisme yang sangat kecil (mikroorganisme) yang hidup di dalam tanah. Rhizobia adalah bakteri yang bersel satu/tunggal, panjangnya sekitar 1.000 mm .



Gambar 2. *Rhizobium* Micrograph.
(<http://commtechlab.msu.edu>)



Gambar 3. Bakteri *Rhizobium* dalam akar buncis (www.rdg.ac.uk)

1. <i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	New 28/3/07 (García-Fraile et. al. 2007)
2. <i>Rhizobium daejeonense</i>	corrected 17/12/06
3. <i>Rhizobium etli</i>	
4. <i>Rhizobium galegae</i>	
5. <i>Rhizobium gallicum</i>	
6. <i>Rhizobium giardinii</i>	
7. <i>Rhizobium hainanense</i>	
8. <i>Rhizobium huautlense</i>	
9. <i>Rhizobium indigoferae</i>	
10. <i>Rhizobium leguminosarum</i>	Type species
11. <i>Rhizobium loessense</i>	formerly " <i>Rhizobium huanglingense</i> "
12. <i>Rhizobium lusitanum</i>	
13. <i>Rhizobium mongolense</i>	
14. <i>Rhizobium sullae</i>	formerly " <i>Rhizobium hedysari</i> "
15. <i>Rhizobium tropici</i>	
16. <i>Rhizobium undicola</i>	formerly <i>Allorhizobium undicola</i>
17. <i>Rhizobium yanglingense</i>	

2. *Mesorhizobium*

Genus *Mesorhizobium* digambarkan oleh Jarvis *et al.* in 1997.. beberapa Spesies pindah dari *Rhizobium* ke dalam genus ini. Sekarang ini ada sekitar 11 spesies.

1. <i>Mesorhizobium albiziae</i>	Baru 11-6-07 (Wang et. al., 2007)
2. <i>Mesorhizobium amorphae</i>	
3. <i>Mesorhizobium chacoense</i>	
4. <i>Mesorhizobium ciceri</i>	dahulu <i>Rhizobium ciceri</i>
5. <i>Mesorhizobium huakuui</i>	dahulu <i>Rhizobium huakuui</i>
6. <i>Mesorhizobium loti</i>	dahulu <i>Rhizobium loti</i> , Type species
7. <i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	dahulu <i>Rhizobium mediterraneum</i>
8. <i>Mesorhizobium plurifarum</i>	
9. <i>Mesorhizobium septentrionale</i>	(ref)
10. <i>Mesorhizobium temperatum</i>	(ref)
11. <i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Dahulu <i>Rhizobium tianshanense</i>

3. *Ensifer* (dahulu *Sinorhizobium*)

Genus *Sinorhizobium* dipublikasikan oleh Chen *et al.* in 1988. bebrapa studi akhir-akhir ini menunjukkan bahwa *Sinorhizobium* dan genus *Ensifer* (Casida, 1982) berada pada takson tunggal. *Ensifer* adalah sinonim heterotipik pertama dan kemudian menjadi prioritas (young, 2003). Ini artinya bahwa semua *Sinorhizobium* spp. harus berubah nama menjadi *Ensifer* spp mengikuti kode bakteriologi. Taksonomi dari genus ini diuji tahun 2007 oleh Martens *et. al.* Genus ini sekarang berjumlah 15 spesies.

- | | |
|--|--|
| 1. <i>Ensifer abri</i> | Spesies ini berbeda dari <i>Ensifer adhaerens</i> , tetapi belum bisa dinamai <i>Ensifer</i> |
| 2. <i>Ensifer americanum</i> | |
| 3. <i>Ensifer arboris</i> | |
| 4. <i>Ensifer fredii</i> | Formerly <i>Rhizobium fredii</i> , Type species |
| 5. <i>Ensifer indiaense</i> | Spesies ini berbeda dari <i>Ensifer adhaerens</i> , tetapi belum bisa dinamai <i>Ensifer</i> |
| 6. <i>Ensifer kostiense</i> | |
| 7. <i>Ensifer kummerowiae</i> | |
| 8. <i>Ensifer medicae</i> | |
| 9. <i>Ensifer meliloti</i> | formerly <i>Rhizobium meliloti</i> |
| 10. <i>Ensifer mexicanus</i> | New 19-2-07 (Lloret <i>et. al.</i> 2007) |
| 11. ' <i>Sinorhizobium morelense</i> ' | |
| 12. <i>Ensifer adhaerens</i> | Spesies ini juga dikenal sebagai <i>Sinorhizobium sahelense</i> |
| 13. <i>Ensifer saheli</i> | Spesies ini salah diketahui sebagai <i>Sinorhizobium teranga</i> |
| 14. <i>Ensifer terangae</i> | Meskipun spesies ini telah dipublikasikan (Ogasawara, <i>et. al.</i> 2003), tetapi belum dimasukkan ke daftar sah ("Validation List") International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. |
| 15. <i>Ensifer xinjiangense</i> | |

4. *Bradyrhizobium*

Genus *Bradyrhizobium* dipublikasikan oleh Jordan tahun 1982. Sekarang ini meliputi 5 spesies.

1. <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	
2. <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	formerly <i>Rhizobium japonicum</i> , Type species
3. <i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	
4. <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	
5. <i>Bradyrhizobium canariense</i>	



Gambar 4. *Bradyrhizobium*
<http://www.rhizobium.umn.edu>)

5. *Azorhizobium*

Genus *Azorhizobium* dipublikasikan oleh Dreyfus *et al.* tahun 1988. Sekarang ini meliputi 2 spesies.

1. <i>Azorhizobium caulinodans</i>	Type species
2. <i>Azorhizobium doebereineriae</i>	formerly <i>Azorhizobium johanna</i>

6. *Methylobacterium*

Genus *Methylobacterium* sekarang ini hanya berisi spesies rhizobial.

Methylobacterium nodulans

7. *Burkholderia*

Genus *Burkholderia* sekarang ini berisi lima nama anggota rhizobial dan lainnya sebagai *Burkholderia* sp.

1. <i>Burkholderia caribensis</i>	
2. <i>Burkholderia cepacia</i>	
3. <i>Burkholderia mimosarum</i>	Baru 3/11/06
4. <i>Burkholderia phymatum</i>	
5. <i>Burkholderia tuberum</i>	

8. *Cupriavidus*

Cupriavidus dahulunya adalah *Wautersia*, formerly *Ralstonia*, yang baru-baru ini mengalami beberapa revisi taksonomi. Genus ini berisi spesies rhizobia tunggal.

Cupriavidus taiwanensis

9. *Devosia*

Genus *Devosia* hanya berisi spesies rhizobia tunggal.

Devosia neptuniae

10. *Herbaspirillum*

Genus *Herbaspirillum* sekarang ini berisi spesies rhizobia tunggal.

Herbaspirillum lusitanum

11. *Ochrobactrum*

Genus *Ochrobactrum* sekarang ini berisi dua spesies rhizobia tunggal.

1. *Ochrobactrum cytisi* baru 28/3/07 (Zurdo-Piñeiro et. al. 2007)
2. *Ochrobactrum lupini*

12. *Phyllobacterium*

Genus *Phyllobacterium* sekarang ini berisi dua spesies rhizobia tunggal.

Phyllobacterium trifolii

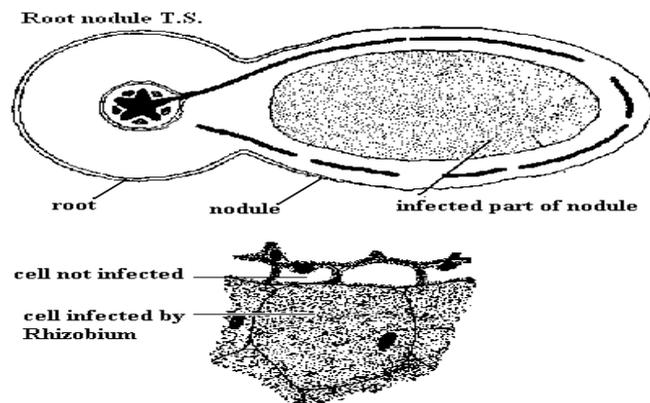
2.2. Morfologi dan Sitologi Rhizobium

Sel muda mengandung zat warna, merata kecuali strain dari *R. Leguminosarum* dan *R. trifolii* sering berisi granule metachromatic. Sel yang tua umumnya lebih lama dalam mengabsorpsi warna dan unstained area dari polihidroksi butirat (PHB) yang menandai morfologi.

Sel muda bergerak dengan flagella yang salah satunya bisa secara polar atau peritritious. Rhizobia muda, pada media kultur berbentuk batang dan menjadi bakteroid dibawah kondisi tertentu, serupa dengan bentuk rhizobia pada nodula.

2.3 Proses masuknya Rhizobium ke dalam Akar Legum

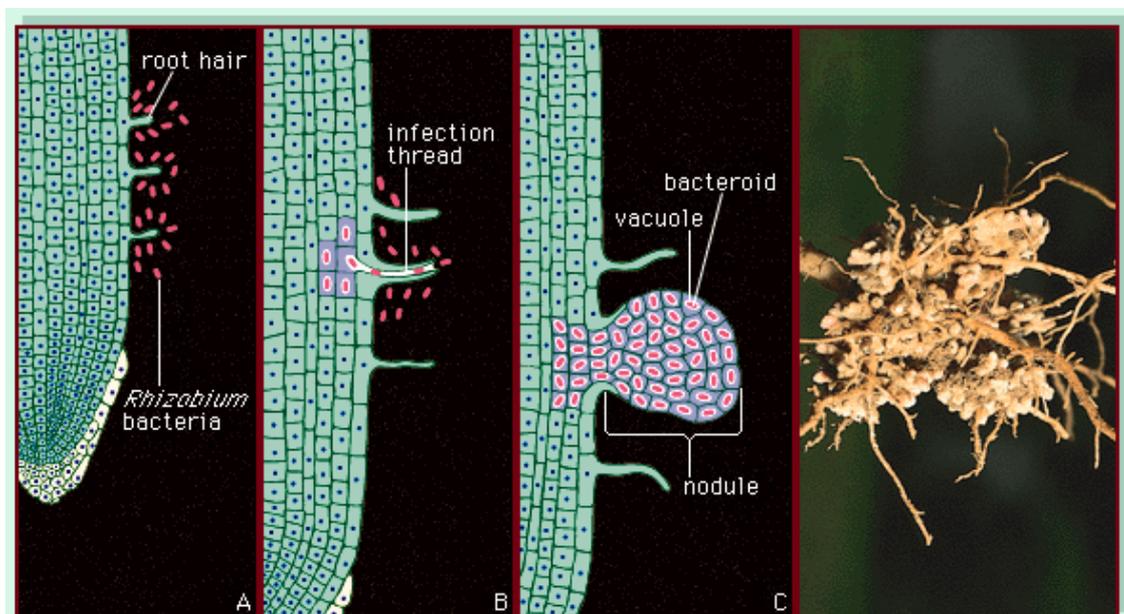
Rhizobium masuk ke dalam akar legum salah satunya melalui rambut akar atau secara langsung ke titik munculnya akar lateral. Akar yang atau pengontrol tumbuh dan cabang rambut akar adalah respons tanaman pertama yang dapat terlihat karena terinfeksi rhizobium. Meskipun demikian, nodula tanaman legum umumnya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



Gambar 5. Akar yang Terinfeksi Rhizobium

Dilaporkan bahwa strains Rhizobium mampu menginfeksi legum dengan melepaskan polisakarida spesifik yang menyebabkan lebih banyak aktivitas pektolitik oleh akar. Beberapa berpendapat bahwa robekan mekanik dengan rhizobium masuk ke dinding rambut akar yang pecah Rhizobium juga bisa terperangkap sampai membungkus rambut akar yang telah berubah bentuk.

Bagaimana sebenarnya nodula dibentuk ? Infeksi benang masuk dan berpenetrasi ke dalam akar dari sel ke sel. Sel ini terbagi membentuk jaringan nodula dimana bakteri ini terbagi dan menggandakan diri. Batas pemisah berkembang, lokasi pusat dimana bakteri berada, jaringannya dinamakan zona bakteri yang ditandai dengan nodula dari bakteri yang menyerangnya- jaringan bebas dinamakan korteks nodula. Jaringan nodula tumbuh dalam berbagai ukuran, mendorong dirinya melalui akar dan kemudian muncul sebagai tambahan dalam sistem perakaran. Ukuran dan bentuknya bergantung pada spesies dan tanaman legumnya.

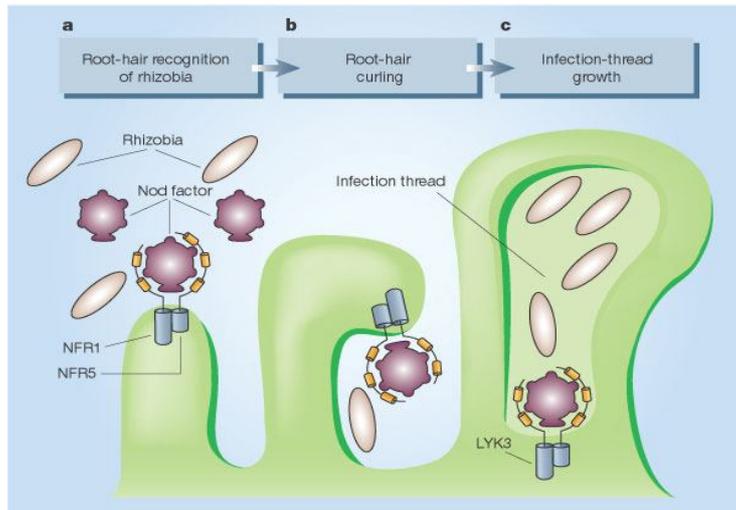


©1996 Encyclopaedia Britannica, Inc.

Gambar 6. (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. (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

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. Berbeda dengan strain inefektif

dari Rhizobium bentuk nodula inefektif umumnya kecil dan berisi sedikit jaringan bakteroid yang berkembang, menunjukkan akumulasi tepung dalam sel tanaman inang yang tidak berisi Rhizobium. Bakteroid dalam nodula inefektif berisi glikogen.



Gambar 7. Proses pembukaan rambut akar (www.nature.com)

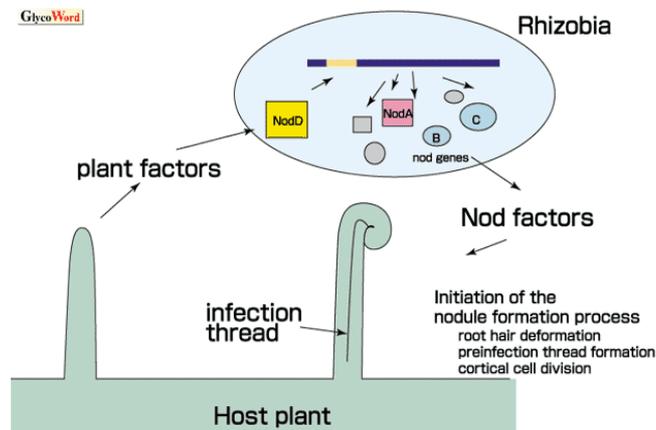
Keterangan gambar :

a, b , dua reseptor yang memungkinkan tanaman merasakan faktor Nod dihasilkan oleh simbiotik rhizobia, dan kemudian membiarkan rambut tanaman untuk dimasuki rhizobia. Percobaan yang dilakukan pada *lotus japonicus* menunjukkan bahwa NFR1 dan NFR 5, berperan dalam tahap pertama^{2,3}, **c**, *Medicago truncatula* varian dri NFR1 dan LYK3, nampaknya diperlukan untuk memelihara infeksi-pertumbuhan benang.; pola ekspresi ³ versi NFR5, SYM10 tanaman buncis menduga bahwa protein ini mungkin juga diperlukan pada tahap ini. Tetapi sisa dapat terlihat jika NFR1, NFR5 dan/atau LYK3 berinteraksi sebagai pertimbangan disini. Semuanya itu terlihat jika ada keberlanjutan keperluan untuk NFR1 dan NFR5 atau rekannya dalam spesies legum, melalui rambut akan dan bentuk benang yang terinfeksi.

2.4. Proses pembentukan Nodula pada Tanaman Legum oleh Rhizobium

Tanaman legum dalam kondisi ternodulasi oleh bakteri pemfiksasi N bersimbiosis dengan bakteri tanah dari genus *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*,

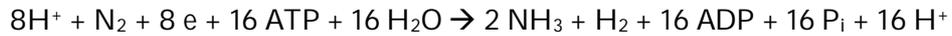
Azorhizobium, *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium*. Interaksi antara bakteri rhizobium dengan tanaman legum dikendalikan oleh tanaman inang tertentu. Misalnya *S. meliloti* membentuk nodule pada alfafa dan *B. japonicum* membentuk nodula pada kedelai. Tanaman inang nya tertentu, ditentukan dengan paling sedikit dua tahap perubahan sinyal yang saling bergantian antara tanaman adan mikrosimbiotik (Gambar 8). Pertama, gen bakteri nodulasi (*nod*) aktif dalam merespons sinyal molekul yang dikeluarkan tanaman seperti flavonoids, dihasilkan dari biosintesis dan sekresi *lipochitooligosaccharides* (LCOs) oleh bakteri rhizobium. Tahap kedua, LCOs mendatangkan bentuk nodul pada akar tanaman inang dan memicu proses infeksi. LCOs yang menyebabkan bentuk akar bernodula pada tanaman inang dinamakan faktor Nod.



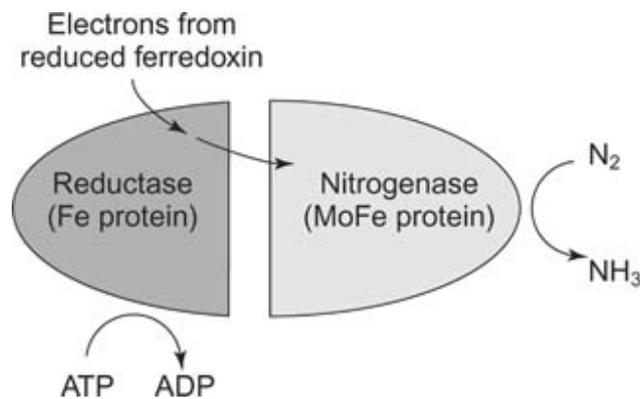
Gambar 8. Interaksi antara Rhizobium dan tanaman inang (www.glicoforum.gr.jp)

2.5. Peran Nitrogenase dalam Proses Fiksasi Nitrogen

Fiksasi Nitrogen dilakukan oleh bakteri. Bakteri ini menyelenggarakan fiksasi nitrogen yang terjadi baik oleh bakteri yang hidup bebas atau hidup bersimbiosis dalam akar tanaman legum seperti kedelai, clover, dan buncis. Fiksasi Nitrogen ini melibatkan penggunaan ATP dan proses reduksi ekuivalen berasal dari metabolisme primer. Semua reaksi yang terjadi dikatalisis oleh *nitrogenase*.



Nitrogenase adalah dua protein kompleks. Satu komponen, dinamakan *nitrogenase reduktase* (NR) adalah besi (Fe) berisi protein yang menerima elektron dari ferredoxin, reduktat kuat, dan kemudian mengirimkannya ke komponen lainnya dinamakan *nitrogenase* atau MOFe protein (*Iron-Molybdenum Protein*).



Nitrogenase pertama kali menerima elektron dari NR dan proton dari larutan. Nitrogenase mengikat molekul dari molekul nitrogen (melepaskan H₂ pada waktu yang sama) , dan kemudian menerima elektron dan proton dari NR, menambahkannya ke dalam molekul N₂, akhirnya melepaskan dua molekul amoniak NH₃. Melepaskan molekul hidrogen, H₂, rupanya adalah bagian yang hakiki dari fiksasi nitrogen. Cukup banyak sistem fiksasi nitrogen berisi enzim, hydrogenase, yang memanen elektron dari molekul hidrogen dan mentransfernya kembali ke dalam ferredoxin, kemudian menyimpan beberapa energi metabolik yang hilang selama reduksi nitrogen.

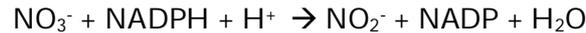
Bagian utama dari energi fotosintesis dalam tanaman yang bernodula digunakan untuk fiksasi N₂. Paling tidak enam belas molekul ATP dihidrolisis selama reduksi oleh molekul nitrogen tunggal. Pengeluaran energi dari fotosintesis sama sekali membatasi pertumbuhan tanaman yang memfiksasi nitrogen. Contohnya, hasil penggunaan energi

(protein, karbohidrat, dan minyak) dari lahan jagung lebih banyak daripada dari lahan kedelai.

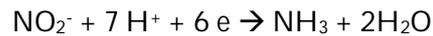
Nitrogen sangat sensitif terhadap oksigen. Akar bernodula dari tanaman pemfiksasi nitrogen berisi oksigen- mengikat protein, leghemoglobin, yang melindungi nitrogenase melalui pengikatan molekul oksigen.

Mekanisme serupa dilakukan dalam nitrat reduktase dan nitrit reduktase. Kedua substansi ini dihasilkan dari ammonia melalui proses oksidasi. Bakteri tanaman dan tanah dapat mereduksi senyawa ini untuk menyediakan ammonia untuk metabolisme. Pupuk yang umum digunakan seperti ammonium nitrat, NH_4NO_3 , menyediakan reduksi nitrogen untuk pertumbuhan tanaman secara langsung, dan menyediakan substrat untuk reduksi nitrat. NADH atau NADPH adalah donor elektron untuk nitrat reduktase, bergantung pada organismenya.

Langkah pertama adalah reduksi nitrat menjadi nitrit



Langkah kedua melibatkan nitrat reduktase yang mereduksi nitrit menjadi ammonia



NO^- (nitrit) dan NH_2OH (hydroxylamine) lanjutan dalam reaksi tetapi tidak berdisosiasi dengan nitrit reduktase.

2.6 Teknik Kultur Rhizobium

Bahwa sedikit sekali jenis prokariotik yang dapat memfiksasi nitrogen, termasuk beberapa Cyanobacteria (Ganggang Hijau Biru), sejumlah bentuk yang hidup bebas non-phototrofik dan beberapa bentuk simbiotik (seperti Rhizobium). Tetapi bagaimana kita dapat mengisolasi mikroba penambat nitrogen? Untuk melakukan ini, kita akan menggunakan suatu teknik yang dikembangkan oleh ahli mikrobiologi untuk mengisolasi mikroba dengan kemampuan biokimia khusus. Teknik itu dinamakan

Elective atau Enrichment culture technique. Hal ini didasari oleh oleh prinsip umum, yaitu jika kita ingin mengisolat mikroba yang memiliki karakteristik biokimia yang unik, kita harus menyediakan medium tertentu sehingga hanya mikroba dengan karakteristik tertentu dapat tumbuh. Langkah-langkah memproduksi inokulan diantaranya sebagai berikut :

2.6.1 ISOLASI STRAINS RHIZOBIUM

1. Mengumpulkan dan menyiapkan nodula akar di lapangan

Botol untuk sampel akar berisi silika gel untuk menghindari dari proses pembusukan dan mencegah dari serangan mikroorganisme tanah yang dapat mempengaruhi prosedur isolasi berikutnya. Kemudian akar yang bernodula dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam botol yang ebrisi silika gel. Jika warna gel berubah menjadi merah muda/pink, desikan harus diganti oleh desikan biru secepat mungkin. Lalu berikan label yang berisi identifikasi sampel akar.



Gambar 9 . Sampel akar yang bernodula

Hal yang perlu diperhatikan sebelum pengambilan sampling adalah :

a. Identifikasi lokasi

Negara, garis lintang dan garis bujur menggunakan GPS, kota terdekat pada saat pengambilan sampling

b. Identifikasi tanaman inang

Hal ini dianjurkan untuk dilakukan. Sampel tanaman legum diidentifikasi genus, spesies atau kultivarnya. Akan lebih baik bila kita mendokumentasikan tanaman legumnya. Jika ada kasus tanaman leguminosaseperti kedelai dan mung bean tumbuh di ladang petani, tanyakan varietas dari leguminosa tersebut dan konfirmasi sejarah lahan/ladang tersebut berkaitan dengan inokulasi rhizobia.

c. Identifikasi tanah

Mengumpulkan tanah dalam kantung plastil tertutup (*ziplocs bag*), dan identifikasi tipe tanahnya, tekstur dan pH.

Mengumpulkan dan menyiapkan nodul akar

- Menggali seluruh tanaman untuk mengambil bagian akar yang bernodula
- Bersihkan tanah secara hati-hati disekitar akar yang bernodula
- Lindungi Akar Yang Bernodula Dan Dikumpulkan Dengan menggunakan gunting.
- Semua nodula yang berasal dari tanaman inang tunggal mewakili satu unit bahan yang dikumpulkan dan disimpan dalam botol yang sama. Akar bernodula yang berasal dari tanaman berbeda tetapi masih dalam satu spesie seharusnya tidak disatukan karena bisa saja berasal dari lingkungan tanah yang berbeda walaupun hanya beberapa meter saja jaraknya.
- Botol yang berisi akar bernodula yang kering disimpan di lemari es pada suhu 5°C

2. Isolasi dari nodula segar

Akar legum segar yang dikumpulkan dari lapangan dibersihkan dengan air untuk membuang semua tanah dan partikel organik. Dengan menggunakan gunting tang, akar yang terinfeksi nodula dipotong hingga 2-3 mm setiap bagian dari nodula, utuh dan tidak rusak. Lalu mencelupkannya selama 10 detik ke dalam etanol 95% atau isopropanol dipindahkan ke larutan sodium hypoklorit 2.5 – 3% (v/v) atau clorox 1 : 1 (v/v) dan rendam selama 4-5 menit.

Nodula dihancurkan dalam pipa steril dengan tangkai gelas steril dan air yang steril. *Slurry* ditambahkan air dan kemudian piring berisi lapisan pada permukaan YMA (Yeast Manitol Agar) berisi *congo red*. Cawan petri yang berisi inokulan diinkubasi pada suhu 25-28°C selama 3 sampai 10 hari, bergantung pada strain dan penampakan koloni yang spesifik. Koloni rhizobia adalah *mucoïd*, bundar/bulat dan menunjukkan sedikit atau tidak ada absorpsi *congo red*. Isolat dari koloni rhizobia tunggal kemudian dimurnikan dan disebut sebagai *Rhizobium* melalui demonstrasi kemampuan bentuk nodula pada percobaan legum tanaman inangh dibawah kondisi bakteriologis yang terkontrol.

Metode lain adalah isolasi menggunakan jarum. Metode jarum ini terutama berguna apabila nodula segar dipanen berukuran 2 mm atau berdiameter besar. Nodula pertama kali dicuci menggunakan air, kemudian masukkan ke dalam alkohol dan dipegang menggunakan gunting tang dan lewatkan ke dalam api. Permukaan akan steril, nodule diletakkan ke dalam kertas saring steril (2x2 cm) dalam cawan petridis. Setiap kertas saring berlaku untuk satu jarum.

2.6.2. Produksi Inokulan Rhizobium

1. Persiapan Media tumbuh "Air Kaldu"

Rhizobia relatif mudah untuk ditumbuhkan dalam medium liquid. Sejak rhizobia tidak berkompetisi dengan mikroorganisme lain, sangat penting untuk mensterilkan semua bejana tumbuh dan medium sebaik mungkin untuk meyakinkan inokulasi dengan starter rhizobia dibawa lingkungan yang steril. Hal ini dapat dipengaruhi oleh medium kultur, strains rhizobia, temperatur dan aerasi.

Rhizobia merupakan bakteri aerobik dan memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi inokulan rhizobia memerlukan aerasi 5 -10 liter air untuk 1 liter medium dalam 1 jam. Temperatur optimum untuk pertumbuhan rhizobia sekitar 28 – 30°C.

Medium mensuplai energi, nitrogen, mineral garam tertentu dan faktor tumbuh. Medium Yeast Manitol (YM) yang umum digunakan dalam kultur air kaldu rhizobia. Komposisinya adalah sebagai berikut :

Bahan-bahan	g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.1
NaCl	0.2
Manitol	10.0
Yeast Extract	0.5
Air destilasi	1.000 l

CHEMICAL	PURPOSE/NUTRIENT	AMT/LITER
d-mannitol	Carbon source, Energy	10 gms
K ₂ HPO ₄	Phosphate, Potassium	0.5 gms
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnesium, Sulfur	0.1 gms
NaCl	Sodium, Chlorine	0.2 gms
FeCl ₃ .6H ₂ O	Iron	0.02 gms
Molybdic Acid	Molybdenum	0.002 gms
CaCO ₃	Calcium	10 gms

Ditambah dengan air hingga satu liter

Ada juga yang menambahkan ekstrak ragi digunakan untuk supplement pertumbuhan bagi rhizobia. Alternatif lain adalah tepung segar dapat digunakan. International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA) menyarankan beberapa komposisi umum media.

Bahan-bahan	Komposisi menurut : (g l ⁻¹)		
	Waksman 1928	Van Schreven 1963	Date 1976
Manitol	10.0	-	10.0
Sukrosa	-	15.0	-
K ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5
K ₃ PO ₄	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2	0.2	0.2
NaCl	0.1	-	0.2
CaCO ₃	3.0	2.0	-
Ca SO ₄ .2H ₂ O	-	-	-
FeCl.6H ₂ O	-	-	0.1
Air Ragi(Yeast Water)	100.0	100.0	100.0
Ekstrak ragi (Yeast Extract)	-	-	-
Minyak Parafin	-	0.5	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	-	-
Air	900	900	900

Untuk memproduksi "kultur air kaldu", tempat atau bejana dalam berbagai ukuran sering digunakan. Hal ini penting bahwa semua peralatan dalam keadaan steril dan "inlet air " juga steril. Bejana diisi dengan media 1/3 sampai 2/3 dan disterilisasi pada autoclave . Kultur starter liquid diinokulasikan pada bejana dengan rasio 1-3 % (v/v) dari media. Waktu yang diperlukan untuk tumbuh rhizobia berada pada kisaran 3-7 hari, bergantung pada daya tumbuh strains rhizobia tersebut. Selama pertumbuhan rhizobia dalam starter dan kultur air kaldu sangat penting untuk melihat kontaminan dan mengontrol kepadatan rhizobia.

2. Produksi Carrier Steril- Dasar Inokulan

- Produksi memerlukan carrier/pembawa steril yang lengkap dalam paket steril. Cara sederhana adalah mencampurkan carrier steril dengan kultur bakteri liquid. Sterilisasi pendahuluan pada kantung pembawa/carrier adalah dengan menyuntikkan zat aseptik pada kultur dengan jarum steril. Untuk produksi dalam skala besar, "auto syringe" (automatic dispensing machine) bisa digunakan. Area tusukan harus didesinfeksi dengan etanol. Lubang bekas suntikan kemudian segera ditutup dengan label perekat. Kelembaban akhir dari inokulan seharusnya sekitar 45-50%. Setelah injeksi kantung yang berisi carrier seharusnya 45-50%. Setelah penyuntikan, paket yang berisi carrier harus ditempatkan pada temperatur dan area yang dikontrol tepat untuk membiarkan sel bakteri tumbuh mencapai populasi maksimum. Inokulan siap digunakan setelah 2 minggu. Ciri koloni bakteri *Rhizobium*: Putih bening, mengkilat, menonjol, tepian rata. Kontaminan (*Agrobacterium*): warna merah

2.7 Teknik Inokulasi *Rhizobium*

Inokulum berisi bakteri yang harus senantiasa dijaga tetap hidup. Setiap paket yang berisi inokulum pada umumnya memiliki tanggal kadaluarsa. Setelah tanggal ini, bakteri tidak hidup dan inokulum seharusnya tidak digunakan lagi. Periode panas yang pendek dapat menurunkan jumlah *Rhizobia* yang hidup, paket yang berisi inokulum seharusnya disimpan di tempat dingin dan terhindar sinar matahari langsung. Penyimpanan yang lebih disukai oleh inokulum adalah dalam lemari es (tetapi bukan dalam freezer).

Bakteri hidup bisa ditambahkan pada tanah ((direct-soil application)) atau diaplikasikan ke benih (seed-applied inoculant).

Syarat-syarat inokulan rhizobium :

- Pembawa/carrier : gambut yang dinetralkan dg CaCO₃ lolos saringan 200 mesh.
- Dikemas dalam plastik polietilen 0,05 mm
- Disterilisasi dengan sinar gama dosis 5,0 x 10⁶ rads.
- Rhizobium dikulturkan dlm kaldu yeast manitol dg kepadatan 500 x 10⁶ rhizobium hidup/ml.
- Kelembaban carrier 45 – 60 %.
- Diinkubasi 26oC selama 2 minggu.
- Disimpan dlm ruang suhu 4°C
- Standar Rhizobium pd inokulan 10⁸ -10⁹ sel hidup/g media

2.6.1. Aplikasi ke tanah (*Direct-soil application*)

Bentuk granular dari inokulum dapat ditempatkan dalam barisan benih melalui kotak insektisida atau melalui pupuk atau kotak benih (bersihkan kotak/box sebelum inokulum ditempatkan di dalamnya). Granul akan mengalir secara bebas melalui peralatan penanaman dan pengaliran inokulum ini sebaiknya dikalibrasi dan diukur.

Konsentrasi liquid kultur inokulum yang dibekukan mungkin ditambah air agar mencair, kemudian tambahkan air ke dalam tangki untuk aplikasi penyemprotan ke dalam barisan benih.

Inokulan sebaiknya tidak dicampur dengan pestisida atau pupuk jika diaplikasikan ke dalam barisan benih. Ketika benih tumbuh menjadi legum, dapat direkomendasikan bahwa pupuk dapat diaplikasikan sebagian.

Aplikasi inokulan langsung ke dalam tanah sangat efektif. Bagaimanapun, permukaan terbesar menjadi tertutup oleh inokulan memerlukan material yang lebih banyak. Hal ini terutama pada kasus ketika barisan kedelai ditanam terbatas. Akhirnya metode ini lebih mahal dibandingkan dengan inokulasi pada benih.

2.7.2 Aplikasi ke Benih (*Seed-applied inoculant*)

Inokulum yang akan dicampurkan ke dalam benih sebelum ditanam tersedia dalam bermacam-macam carier/pembawa ; carier/pembawa yang umum adalah "peat". (sejenis bahan organik). "Peat" menyediakan carier lebih baik dibandingkan carier lainnya melindungi kehidupan bakteri dibawah kondisi lingkungan yang tidak baik (tempertaur tinggi, keterlambatan penanaman).

Inokulasi benih. Ketika benih diinokulasi, dua kondisi yang harus dijaga untuk memperoleh nodulasi yang baik : (1) akar harus kontak dengan bakteri Rhizobia dan (2) Rhizobia harus dalam kondisi hidup dan dapat menginfeksi akar tanaman.

Agar bakteri dapat kontak dengan akar tanaman, inokulum harus menutupi masing-masing benih. Untuk mencapai distribusi terbaik, inokulum seharusnya dicampurkan dengan benih dalam jumlah besar dibandingkan dismpn dalam kotak benih –menutupi lantai - dalam bak.

Gunakan bahan perekat ("sticker") yang dapat membantu inokulan agar melekat pada masing-masing benih. Hal ini penting terutama pada benih legum yang sangat kecil, yang memerlukan lebih banyak inokulan per unit benih-area permukaan.

Tabel 2. Pengaruh Inokulan dan Penggunaan Perekat pada Nodulasi Akar Kedelai

Treatment	Nodules per plant
Source: University of Kentucky.	
No inoculant	0
Inoculant, no sticker	0.8
Inoculant, plus commercial sticker	2.7
Inoculant, plus sugar sticker	2.7

Tabel 2 menunjukkan keuntungan dalam jumlah nodula yang dibentuk dengan menggunakan perekat selama proses inokulasi. Baik komersial dan perekat yang dibuat

sendiri adalah cukup efektif. Perekat buatan sendiri dapat disediakan dengan pengenceran 1 -10 sirup atau molases, pengenceran cola atau susu dapat juga digunakan.

Mencampurkan benih dan perekat secukupnya hanya untuk melembabkan semua benih. Terlalu cair dapat mengakibatkan perkecambahan yang prematur pada benih. Untuk melembabkan benih tambahkan inokulan pada lapisan benih. Pengeringan udara dengan menghamparkan benih pada kondisi teduh. Pengeringan bisa dipercepat dengan menambahkan tambahan "peat" beralaskan inokulan atau batu kapur halus. Benih harus kering pada saat ditanam. Benih seharusnya sesegera mungkin ditanam setelah inokulasi sebab bakteri mulai mati pada proses pengeringan. Jika tidak ditanam dalam waktu 24 jam, inokulasi kembali.

Pre-inokulasi benih. Salah satu metode preinokulasi yang umum digunakan (1) meresapi (*impregnation*) *Rhizobia* dengan proses vakum atau (2) dibuat pil dengan batu kapur halus. Tipe pil dari preinokulasi benih adalah umumnya lebih disukai pada penelitian dasar dan menunjukkan bahwa bakteri hidup lebih lama pada benih pil dan tipe preinokulasi benih menghasilkan formasi jumlah nodula yang lebih banyak

Preinokulasi benih seharusnya ditangani dengan cara yang sama seperti halnya paket inokulum. Beberapa tindakan pencegahan dapat menjamin hasil yang lebih baik. Mengecek kembali tanggal kadaluarsa pada kantong benih, penyimpanan dan tsimpan benih jangan dibawah sinar matahari langsung dan hindari panas dan tanam sesegera mungkin . Jika bakteri dipastikan dalm kondisi mati, inokulasi kembali benih. Jika airatau larutan perekat menyebabkan kandungan asam pada benih pil menjadi gum up, gunakan mineral oil (0.5 to 1.0 of oil per lb. of seed) untuk melekatkan inokulum baru pada benih.Tanam sesegera mungkin.

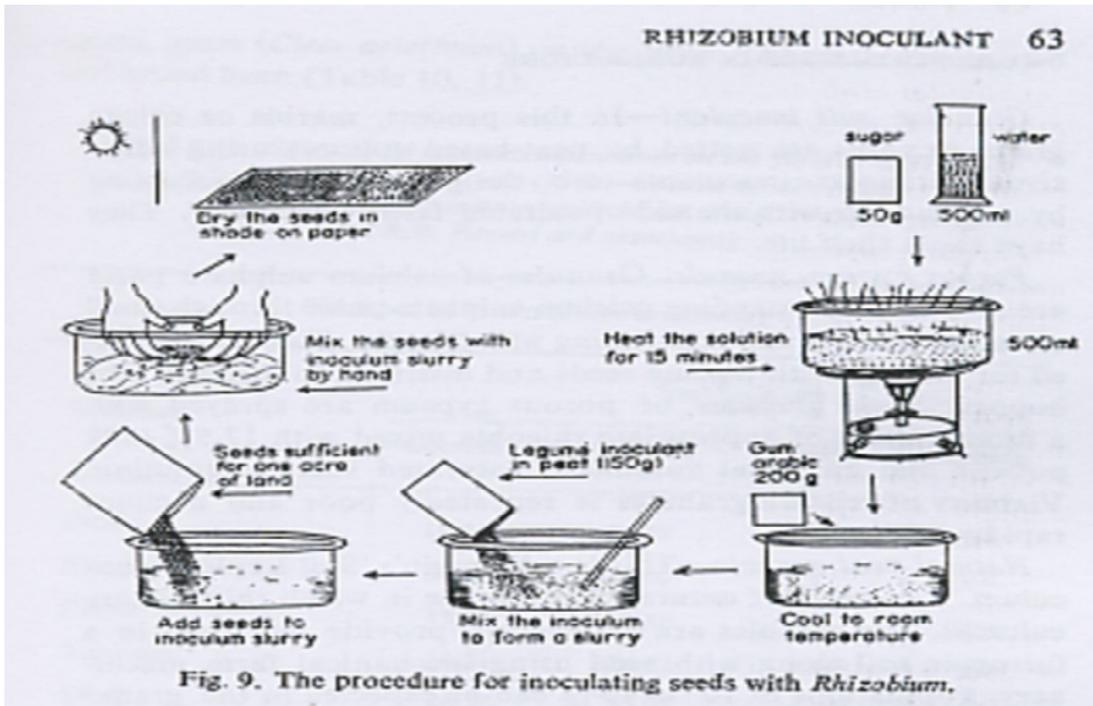


Fig. 9. The procedure for inoculating seeds with *Rhizobium*.

Gambar 10. Prosedur Inokulasi Benih dengan Rhizobium

III. ALGA BIRU HIJAU (*BLUE_GREEN ALGAE*)

3.1 PENDAHULUAN

Ganggang biru hijau hidup pada berbagai keadaan lingkungan, bahkan pada permukaan batu di lahan gurun pasir yang gersang. Dia bersifat autotrof sempurna dan hanya memerlukan sinar matahari, air, nitrogen bebas, karbon dioksida dan garam-garam yang mengandung hara mineral penting. Karena ganggang memerlukan sinar matahari maka diduga hanya sedikit pengaruhnya terhadap penambahan unsur N dalam tanah pertanian yang diusahakan di dataran tinggi. Manfaat lain yang diperoleh dari ganggang hijau-biru ini ialah terjadinya pelapukan secara biologis sehingga menjadi lebih terbukanya kehidupan lain pada permulaan *geneses tanah*.

Dipandang dari segi pertanian penambatan nitrogen oleh bakteri yang hidup bebas di dalam tanah mempunyai peranan lebih penting dibandingkan ganggang hijau-biru. Jasad-jasad ini, kecuali *Rhodospirillum*, menghendaki adanya sumber tenaga berupa sisa tanaman atau hewan. Sebagian tenaga hasil oksidasi ini digunakan untuk menambat nitrogen dari udara bebas. Kemampuan maksimum penambatan nitrogen oleh jasad ini berkisar 20 sampai 40 kg per hektar N per tahun.

Disamping bakteri penambat yang bersimboise ada mikrobia yang hidup bebas mikrobia dan ganggang biru (*blue green algae*) yang mampu menambat N udara.

Tabel. Jenis bakteri bebas penambat N dan sifatnya.

Nama	Sifat umum
Azotobakter	Aerobik, hidup di dalam tanah, air dan permukaan daun
Azospitillum	Mikro-aerobik, hidup bebas atau asosiasi dengan akar tanaman
Actinimycetes	Menambat N dan simbiosis dengan non legum misalnya Casuarina, Myrica
Blue green algae	Hidup di air atau daratan, mengandung khlorofil

Anabaena adalah genus cyanobakteria filamentous atau ganggang hijau-biru, ditemukan sebagai plankton. *Anabaena* diketahui berperan dalam menfiksasi nitrogen, dan *Anabaena* membentuk hubungan simbiosis dengan tanaman tertentu seperti paku-pakuan. Terdapat satu dari 4 genera dari cyanobakteria yang menghasilkan neurotoxin, yang membahayakan margasatwa lokal seperti halnya hewan ternak dan hewan peliharaan.

Spesies tertentu dari *Anabaena* telah digunakan dalam pertanaman padi sawah, sebagai penyedia pupuk alami yang efektif.

3.2 Taksonomi *Anabaena*

Kingdom	: Eubacteria
Phylum	:Cyanobacteria
Order	: Nostocales
British distribution	: Evidently widespread.
World distribution	: Widespread.

Anabaena memiliki **heterocysts** dan juga berkembang **akinetes** (dinding sel tebal yang istirahat (dorman) yang dapat bertahan dalam endapan/sedimen selama beberapa tahun. Kadang-kadang trichoma berkumpul dalam getah (*musilage*), tetapi trichoma tidak secara jelas menegaskan koloni mucilainous terlihat relatif dekat, *Nostoc*.

Beberapa Species yang diketahui adalah sebagai berikut :

No	Spesies	No	Spesies
1.	<i>Anabaena aequalis</i>	20.	<i>Anabaena lemmermannii</i>
2.	<i>Anabaena affinis</i>	21.	<i>Anabaena levanderi</i>
3.	<i>Anabaena angustumalis</i> - <i>Anabaena angustumalis</i> - <i>Anabaena angustumalis marchica</i>	22.	<i>Anabaena limnetica</i>
4.	<i>Anabaena aphanizomendoides</i>	23.	<i>Anabaena macrospora</i> o <i>Anabaena macrospora</i> o <i>Anabaena macrospora robusta</i>
5.	<i>Anabaena azollae</i>	24.	<i>Anabaena monticulosa</i>
6.	<i>Anabaena bornetiana</i>	25.	<i>Anabaena oscillarioides</i>
7.	<i>Anabaena catenula</i>	26.	<i>Anabaena planctonica</i>
8.	<u>Anabaena circinalis</u>	27.	<i>Anabaena raciborskii</i>
9.	<i>Anabaena confervoides</i>	28.	<i>Anabaena scheremetievi</i>
10.	<i>Anabaena constricta</i>	29.	<i>Anabaena sphaerica</i>
11.	<i>Anabaena cycadeae</i>	30.	<i>Anabaena spiroides</i> o <i>Anabaena spiroides crassa</i> o <i>Anabaena spiroides spiroides</i>
12.	<i>Anabaena cylindrica</i>	31.	<i>Anabaena subcylindrica</i>
13.	<i>Anabaena echinispora</i>	32.	<i>Anabaena torulosa</i>
14.	<i>Anabaena felisii</i>	33.	<i>Anabaena unispora</i>
15.	<i>Anabaena flosaquae</i> o <i>Anabaena flosaquae flosaquae</i> o <i>Anabaena flosaquae minor</i> o <i>Anabaena flosaquae treleasei</i>	34.	<i>Anabaena variabilis</i>
16.	<i>Anabaena helicoidea</i>	35.	<i>Anabaena verrucosa</i>
17.	<i>Anabaena inaequalis</i>	36.	<i>Anabaena viguieri</i>
18.	<i>Anabaena lapponica</i>	37.	<i>Anabaena wisconsinense</i>
19.	<i>Anabaena laxa</i>	38.	<i>Anabaena zierlingii</i>

3.3 Ekologi *Anabaena*

Anabaena memiliki kemampuan untuk memfiksasi nitrogen dan dapat kita tersebar luas di dalam air dan juga tanah yang lembab/basah. Spesies tertentu bersimbiosis dengan tanaman tingkat tinggi, seperti *Anabaena azollae* dalam spesies *Azolla* (paku air). Beberapa spesies telah berhasil digunakan dalam menyediakan oksigen pada pertanaman padi sawah, penambahannya sekitar 40 kg nitrogen per hektar per tahun.

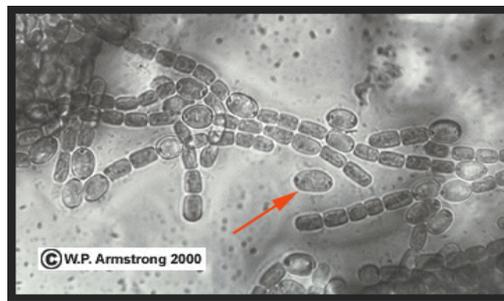
Penggunaan *Azolla* memberikan level tertinggi dari fiksasi nitrogen, dilaporkan sekitar 120 – 310 kg per hektar per tahun (Fay, 1983 dikutip oleh van den Hoek *et al.*, 1995). Seperti halnya cyanobacteria tertentu lainnya, *Anabaena* juga dapat mengakibatkan kumpulan toksik/racun dalam air. Strains *A. flos-aquae* menghasilkan racun *neuromuscular*, **anatoxins**, dan merupakan hal yang serius, kadang-kadang fatal, berbahaya terhadap peternakan/hewan piaraan meminum air yang terinfeksi.

3. 4 Fiksasi Nitrogen oleh Alga Hijau-Biru

Interaksi antara simbiosis *Anabaena-Azolla* berbeda antara berbeda dengan interaksi antara bakteri pembentuk nodula dari tanaman leguminosa. Sangat sedikit yang diketahui cara bagaimana *Anabaena* dan *Azolla* mengenal satu sama lain. *Anabaena* masuk ke dalam jaringan pakis/paku-pakuan melalui ujung titik tumbuh. Fiksasi nitrogen berlangsung dalam sel khusus, yaitu [heterocysts](#). Sel penetrasi *Anabaena* sangat kecil, heterocysts tidak berkembang sebelum *Anabaena* telah berkolonisasi dalam jaringan paku-pakuan dan diam dalam cistern intraseluler (H. D. HILL, 1977). *Azolla* pada umumnya banyak ditemukan di sawah Asia Tenggara dimana sejumlah besar nitrogen diikat oleh jenis alga ini yang sangat bermanfaat bagi tanaman padi.

Simbiosis dan spesies *Anabaena* yang hidup bebas - seperti alga hijau-biru, juga berhadapan dengan masalah melindungi dirinya melawa oksigen. Proses metabolisme merupakan proses pengambilan surplus oksigen yang ada, dengan kata lain, heterocysts dikelilingi bakteria. Berbeda dengan sel vegetatif, heterocysts aktif tertutup oleh lapisan polisakarida yang nampaknya menyediakan nutrisi bagi bakteria. Aktivitas metabolisme bakteria mengkonsumsi oksigen lagi, hingga taraf terendah oksigen disekitar heterocysts.

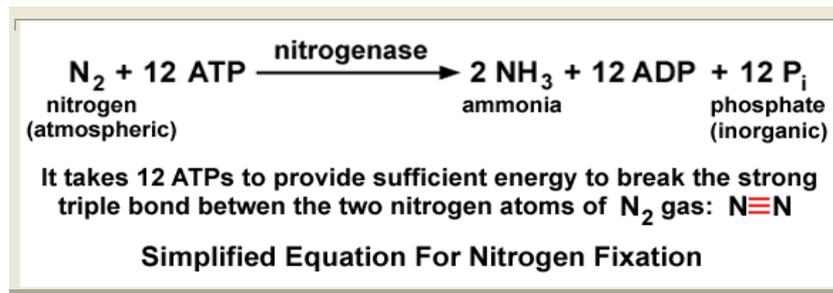
Di bawah kondisi yang terbatas, sel vegetatif berdiferensiasi menjadi heterocysts. heterocysts merupakan sel yang berada di bagian ujung (terminal) yang dikhususkan dalam proses fiksasi nitrogen. Interior dari sel ini berupa mikrooxic sebagai akibat dari peningkatan respirasi, tidak aktifnya pembentukan O_2 dalam fotosistem II, bentuk/formasi dari penebalan diluar dinding sel. Nitrogenase mengubah dinitrogen menjadi ammonium pada pengeluaran ATP dan keduanya merupakan reduktan yang dihasilkan melalui metabolisme karbohidrat, sebuah proses tambahan, dalam cahaya melalui aktivitas fotosistem (PS) I. Sebagai imbalannya, nitrogen difiksasi dalam heterocysts bergerak ke dalam sel vegetatif, bagian akhir dalam pembentukan asam amino.



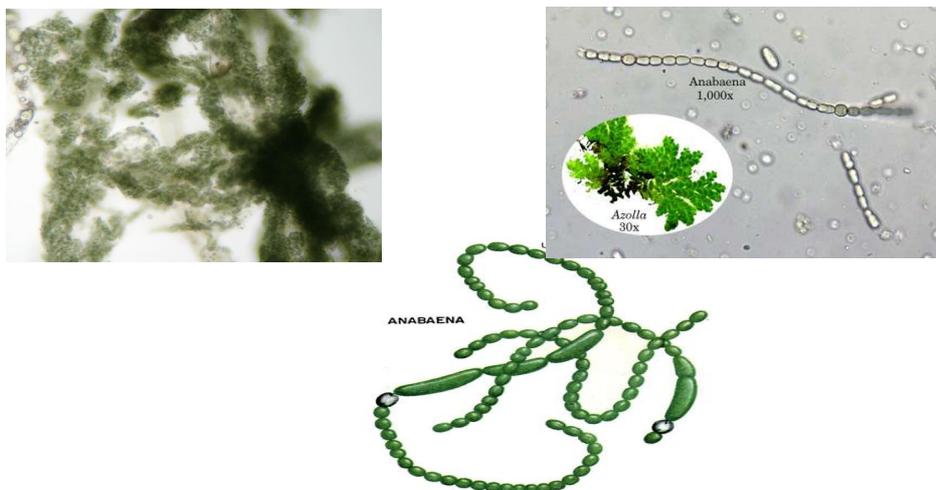
Keterangan Gambar 11.

Filamentous cyanobacteria (*Anabaena azollae*) dari rongga dalam daun paku air ubiquitous (*Azolla filiculoides*). Yang besar, sel berbentuk oval adalah *heterocysts* (panah merah), tempat/lokasi fiksasi nitrogen dimana nitrogen atmosfer (N_2) dikonversi ke dalam ammonia (NH_3). Nodula yang berhubungan dengan kutub (nodula polar) dapat dilihat dalam beberapa heterocysts. Paku air bermanfaat bagi bakterial sebagai patner/inang melalui suplai nitrogen yang dapat digunakan. . Struktire selular dari bakterial ini telah berubah sangat kecil pada seribu juta tahun yang lalu. (<http://www.bioimages.org.uk>)

Fiksasi nitrogen keahlian dari prokariotik yang luar biasa dimana gas nitrogen atmosfer merupakan (N_2) dikombinasikan dengan kedalam bentuk ammonia (NH_3). Proses vital ini mendekati proses nitrifikasi (pembentukan amonia dari pemecahan protein) menjadikan nitrogen tersedia untuk tanaman autotrofik dan untuk semua anggota ekosistem. Meskipun *Azolla* dapat menyerap nitrat dari air, *azolla* juga dapat menyerap ammonia yang dikeluarkan *anabaena* dalam lubang/rongga daun.



Studi baru-baru ini menunjukkan tempat sebenarnya terjadi fiksasi nitrogen dalam dinding tebal heterocysts. Sebagai heterocysts dewasa, membran fotosintetik (membran thylakoid) menjadi berubah bentuk atau *reticulate* bandingkan dengan sel fotosintetik dari Anabaena, dan sel menjadi non fotosintetik (dan tidak memproduksi oksigen). Kenyataan ini penting terutama fiksasi nitrogen memerlukan enzim esensial nitrogenase, dan aktivitas nitrogenase menghambat kehadiran oksigen.



Gambar 12. Azolla dan Anabaena
www.botany.hawaii.edu

3.5 Hubungan Antara Azolla Dan Cyanobakteria

Terdapat banyak contoh tumbuhan, bakteri dan alga yang memiliki bentuk hubungan /asosiasi yang sangat dekat satu sama lainnya. Hubungan simbiosis yang menarik melibatkan paku air (Azolla) dan filamentous mikroskopik alga hijau – biru

atau cyanobacterium (*Anabaena azollae*). Keduanya tumbuh bersama pada permukaan air dengan aliran yang tenang, dan kolam pada daerah tropis dan temperate.

Beras adalah salah satu sumber makanan penting bagi manusia dan Azolla memegang peranan penting dalam produksi beras. Selama berabad tahun yang lalu Azolla dan partner pemfiksasi nitrogennya, *Anabaena* telah digunakan sebagai "green manure" (pupuk hijau) di China dan negara Asia lainnya untuk memupuk padi dan meningkatkan produksi. Beberapa ahli percaya penggunaan Azolla memungkinkan Vietnam untuk bertahan dari pengaruh blokade Amerika ketika impor pupuk tidak tercapai Vietnam selama perang berlangsung.

Di kawasan Asia bagian Timur, Selatan dan Tenggara termasuk Indonesia di mana banyak diusahakan padi sawah, salah satu masalah yang dihadapi adalah kesuburan lahan yang berkelanjutan. Hal ini sangat penting karena saat sekarang yang dipacu adalah produksi yang semakin tinggi dari satu jenis tanaman yaitu padi sawah, dengan target kenaikan produksi untuk setiap tahun. Justru pada lahan sawah di kawasan tersebut, bahan organik tanah dan tingkat nitrogen acapkali terbatas. Untuk mengatasi hal ini dibutuhkan sumber nitrogen alternatif sebagai suplemen pupuk kimia. Sumber nitrogen alternatif ini adalah pupuk hijau. Salah satu sumber N alternatif yang cocok untuk padi sawah adalah Azolla.

Azolla termasuk ke dalam famili Salvinia (Salviniaceae), meskipun beberapa ahli kini menempatkannya dalam famili monotypic, yakni Azollaceae. Enam spesies tersebar, diantaranya tiga di Amerika yakni spesies *A. filiculoides*, *A. mexicana* and *A. caroliniana*.

Azolla adalah paku air mini yang bersimbiosis dengan Cyanobacteria pemfiksasi N_2 . Simbiosis ini menyebabkan azolla mempunyai kualitas nutrisi yang baik. Azolla sudah berabad-abad digunakan di Cina dan Vietnam sebagai sumber N bagi padi sawah. Azolla tumbuh secara alami di Asia, Amerika, dan Eropa.

Azolla merupakan tumbuhan kecil, memiliki panjang 1,5 – 2,5 cm, dengan lebih atau sedikit aksis utama lurus dengan daun muda tersusun pada cabang sampingnya, makin panjang terhadap bagian dasar, hingga membentuk ukuran triangular, cabang dasarnya menjadi daun muda yang tersusun pada tangkainya dan akhirnya mengalami fragmentasi diantaranya aksis utama memisahkan diri membentuk tanaman baru. Akar dengan akar lateral runcing/tajam memiliki penampakan seperti bulu di atas air. Daun kecil, memiliki panjang 1 – 2mm, overlapping dalam dua tingkat, diatas hijau, coklat atau kemerah-merahan, bagian bawah coklat transparan; kecil pendek, rambut uniseluler cylindrical sering tampak pada lobe bagian atas. Ketika masa subur (*fertil*) sporokarps sekitarnya sepanjang 1 – 1.5 mm melebar dapat dilihat dibawah dasar cabang sisi. Daun sering menampakkan warna merah marun dan air tampak tertutup olehnya. Ketika tumbuh di bawah sinar matahari penuh, terutama di akhir musim panas dan musim semi, Azolla dapat memproduksi antosianin kemerah-merahan di dalam daunnya.



Gambar 13. *Azolla pinnata*

Hal umum yang terjadi pada *Anabaena azollae* di dalam daun *Azolla* reproduksi dari paku air ini terjadi secara vegetatif, ini terlihat dengan ditunjukkannya bahwa cyanobakterium dan paku air ini berkembang secara sinkron. Filamen pendek dari *Anabaena* dinamakan *hormogonia*, sering mempertahankan diri dibawah *indusium cap*, pada bagian atas megaspora yang berkecambah. Hormogonia mungkin ditangkap oleh embrio tanaman *Azolla* selama proses diferensiasi *shoot apex* dan *dorsal lobe primordia*

dari daun pertama. Ini menarik untuk memperkirakan bagaimana dan kapan dua organisme membentuk suatu hubungan yang sangat dekat.



Gambar 14. *Anabaena Azollae*

Azolla mempunyai beberapa spesies, antara lain *Azolla caroliniana*, *Azolla filiculoides*, *Azolla mexicana*, *Azolla microphylla*, *Azolla nilotica*, *Azolla pinnata* var. *pinnata*, *Azolla pinnata* var. *imbricata*, *Azolla rubra*.

Azolla pinnata telah digunakan selama beberapa abad di kawasan Asia Tenggara sebagai pupuk dalam produksi padi. Padi memperoleh keuntungan dari hubungan simbiosis dengan cyanobacteria *Anabaena azollae* yang memfiksasi nitrogen dan tumbuh dalam rongga udara dari daun paku-pakuan. *A.pinnata* mati menjelang musim panas dan tanaman yang busuk melepaskan nitrogen ke dalam tanah. *A.pinnata* juga merupakan gulma. *A.pinnata* dapat berkembang secara cepat menutupi area permukaan air. *A.pinnata* dapat membentuk seperti karpet tebal yang menghalangi aliran air dan navigasi, dan menumbat pompa irigasi. Lapisan tebal itu akan menurunkan jumlah oksigen dan cahaya yang tersedia pada organisme akuatik lainnya. Reproduksi vegetatif melalui dispersal dari cabang basal yang kemudian membentuk tangkai cabang (*pinnate branches*) dan memutuskan/memotong cabang utama.

Di bawah ini merupakan *A.pinnata* R. Brown yang bisa kita temukan di lapangan, diantaranya :



Gambar 15 : *Azolla pinnata*
(<http://www.lucidcentral.org>)

Spesies serupa yang dapat kita temukan di lapangan diantaranya :



Gambar 16 : *Azolla caroliniana*



Gambar 17 : *Azolla filiculoides*
(<http://www.lucidcentral.org>)

Kandungan unsur hara dalam Azolla

Unsur	Jumlah
N	1.96-5.30 (%)
P	0.16-1.59 (%)
K	0.31-5.97 (%)
Ca	0.45-1.70 (%)
Mg	0.22-0.66 (%)
S	0.22-0.73 (%)
Si	0.16-3.35 (%)
Na	0.16-1.31 (%)
Cl	0.62-0.90 (%)
Al	0.04-0.59 (%)
Fe	0.04-0.59 (%)
Mn	66 - 2944 (ppm)
Co	0.264 (ppm)
Zn	26 - 989 (ppm)

Sumber : www.batan.co.id

Kegunaan :

- Sumber N dapat mengganti pupuk urea sampai 100 kg
- Pakan ternak/hijauan, pakan ikan, terutama ayam dan itik
- Menekan pertumbuhan gulma
- Tanaman hias
- Kontrol terhadap perkembangan nyamuk

3.6 Cara perbanyak Azolla

1. Buatlah stok Azolla dekat rumah dengan bak plastik atau di kolam yang tidak ada ikannya.
2. Semprot stok setiap 3 bulan sekali dengan pupuk P (1 sendok makan SP-36 per l air). Sebaiknya Sp-36 digerus halus agar mudah larut dalam air. Stok ini digunakan untuk bibit yang akan ditanam di lapang.
3. Di lapang petak sawah dibatasi dengan bambu seluas 1m² seperti ditunjukkan pada gambar di bawah ini :

I	II	III	IV
5 hari	10 hari	15 hari	20 hari

Dengan mengaplikasikan Azolla 200 g/m² :

- I. Sampai dengan hari ke-5, Azolla akan berkembang, sehingga permukaan lahan tertutup penuh (batas garis merah)
- II. Hari ke-10, menjadi 2 kali lipat (batas garis biru)
- III. Hari ke-15, menjadi 4 kali lipat (batas garis coklat)
- IV. Hari ke-20, menjadi 8 kali lipat , dst.

3.7 Cara Menggunakan Azolla

1. Tebar Azolla bersamaan atau 1 minggu sebelum padi di bibit
2. Setelah lapangan penuh dengan Azolla, lahan dibajak agar Azolla terbenam
3. Selanjutnya dilakukan penanaman padi dan Azolla yang tidak terbenam dibiarkan tumbuh. Azolla yang tumbuh di permukaan ini dapat :
 - mengambil N yang hanyut dan menguap
 - menahan pertumbuhan gulma

IV. BAKTERIA PEMFIKSASI NITROGEN YANG HIDUP BEBAS

4.1 Pendahuluan

Penambahan nitrogen dalam tanah dilakukan juga oleh jasad renik yang hidup bebas, artinya tidak bersimbiosis dengan tanaman inang. Jasad tersebut antara lain adalah ganggang hijau-biru (Chyanophyceae) dan bakteri yang hidup bebas. Bakteri yang hidup bebas ialah *Rhodospirillum sp.* yang fotosintetis, *Clostridium* yang merupakan jasad bersifat anaerob serta *Azotobacter* dan *Beijerinckia* yang aerob.

Inflasi yang berkembang di seluruh dunia , yang dimulai dengan kenaikan harga minyak dengan demikian menggambarkan hal itu berpengaruh pada harga pupuk kimia nitrogen, dimana harga pupuk ini hampir naik dua kali lipat selama 3-4 tahun terakhir ini. Hal ini dirasakan perlu untuk mencari sumber nitrogen yang lebih murah untuk memenuhi kebutuhan tanaman. Hal ini merupakan peremajaan dalam ilmu mikrobiologi tanah terutama dalam fiksasi N biologis.

Mikroorganisme tertentu yang ditemukan disekitar rhizosfer diketahui dapat memperbaiki kesuburan tanah dan akibatnya tanaman dapat tumbuh dengan optimal. Mikroorganisme ini mensuplai nutrisi tanaman melalui pemecahan bahan organik, mengubah nitogen udara /atmosfer ke dalam bentuk tersedia, melindungi tanaman dari penyakit dan menstimulasi pertumbuhan tanaman secara langsung melalui produksi senyawa stimulator tumbuhan (*phytostimulating*). Pertanian Eropa modern telah menyadari pemakaian intensif dari senyawa kimia pertanian, seperti pupuk, fungisida dan pestisida untuk meningkatkan hasil tanaman. Meskipun hal tersebut membantu dalam hasil tanaman, perlu ada perhatian khusus pada lingkungan yang berkenaan dengan penggunaan dan aplikasinya. Penggunaan mikroorganisme kini terlihat sebagai

alternatif terhadap perakuan kimia dan akan berkontribusi besar terhadap tujuan utama yakni pertanian berkelanjutan.



Gambar 18. Root nodules formed on the root system of a soybean plant. Nitrogen-fixing root nodule bacteria (*Bradyrhizobium*) present inside the nodule provide valuable organic nitrogen to the host plant, which promotes plant growth

Pemanfaatan mikroorganisme tanah dalam siklus N dan P sangat penting dalam penyediaan hara bagi pertumbuhan tanaman. Mikroorganisme seperti *Azospirillum* sp. dapat membentuk koloni dan berasosiasi dengan tanaman jagung sehingga dapat menambat nitrogen udara pada kondisi mikroaerofil. Inokulasi tanaman dengan *Azospirillum* sp. dapat meningkatkan kemampuan tanaman menyerap air dan hara lebih baik. Hasil pengujian menunjukkan bahwa *Azospirillum* sp pada tanah jenis Regosol (Bone) yang bereaksi agak netral menunjukkan efektivitas yang tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan meningkatnya bobot kering tanaman dan bobot kering akar yang diduga disebabkan oleh perubahan morfologi akar akibat adanya asosiasi bakteri di perakaran sehingga akar lateral meningkat dan adanya kemampuan *Azospirillum* itu sendiri untuk mengoreksi hormon Indole Acetic Acid (IAA) bebas di daerah perakaran.

Secara umum, rizosfir ekosistem tanah yang sehat akan dihuni oleh organisme yang menguntungkan yang memanfaatkan substrat organik dari bahan organik atau eksudat tanaman sebagai sumber energi dan nutrisinya. Sejumlah mikroba memegang peran penting pada tanah yang normal dan sehat, dan merupakan indikator dalam menentukan kualitas tanah. Mikroba tanah berperan dalam proses penguraian bahan organik, melepaskan nutrisi ke dalam bentuk yang tersedia bagi tanaman, dan mendegradasi residu toksik (Sparling 1998). Selain itu, mikroba juga berperan sebagai agen peningkat pertumbuhan tanaman (*plant growth promoting agents*) yang

menghasilkan berbagai hormon tumbuh, vitamin dan berbagai asam-asam organik yang berperan penting dalam merangsang pertumbuhan bulu-bulu akar.

Salah satu kelompok organisme yang penting dalam ekosistem tanah dan berperan sebagai agen peningkat pertumbuhan tanaman adalah rizobakteri yaitu bakteri yang hidup di rizosfir tanaman dan mengalami interaksi yang intensif dengan akar tanaman maupun tanah. Kesehatan biologis suatu tanah akan banyak ditentukan oleh dominasi rizobakteri ini atas mikroorganisme patogen sehingga tanaman mendapatkan manfaat yang optimal dari keberadaan rizobakteri non patogen. *Azotobacter* adalah spesies rizobakteri yang telah dikenal sebagai agen biologis pemfiksasi dinitrogen, diazotrof, yang mengkonversi dinitrogen ke amonium melalui reduksi elektron dan protonasi gas dinitrogen. Unsur hara yang membatasi produktivitas tanaman adalah nitrogen sehingga pupuk nitrogen selalu ditambahkan sebagai input dalam produksi tanaman. Untuk menghindari penurunan kesehatan tanaman akibat adanya input bahan kimia, diperlukan input biologis berupa rizobakteri.

Penambahan atau inokulasi *Azotobacter* dengan tujuan untuk meningkatkan ketersediaan nitrogen tanah telah sering dilakukan namun dengan hasil yang bervariasi, bahkan kadang-kadang tidak meningkatkan hasil tanaman. Kondisi tersebut sangatlah logis mengingat kontribusi rizobakteri hidup bebas terhadap nitrogen tanah hanya sekitar 15 kg N/ha/tahun yang jauh lebih rendah daripada kontribusi bakteri pemfiksasi nitrogen simbiosis yang mencapai 24-584 kg N/ha/t (Shantharam & Mattoo 1997).

Namun demikian, upaya mempertahankan kesehatan tanah dan sekaligus produktivitas tanaman dengan inokulasi *Azotobacter* perlu dilakukan karena rizobakteri ini berperan sebagai agen peningkat pertumbuhan tanaman melalui produksi fitohormon yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman. Selain itu, input rizobakteri dalam suatu sistem pertanian sejalan dengan konsep Mekanisme Pembangunan Bersih (*Clean*

Development Mechanism, CDM) yang penting diupayakan untuk mengurangi emisi gas rumah kaca dan meningkatkan serapan karbon (*carbon sequestration*) sehingga karbon berada dalam bentuk yang lebih stabil (Murdiyarto 2003).

4.2 AZOTOBACTER

4.2.1 Deskripsi Azotobakter

Higher order taxa dari Azotobakter adalah Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Azotobacter group. Beberapa spesies yang umum dikenal adalah *Azotobacter chroococcum* dan *Azotobacter vinelandii*. Azotobacter spp adalah genus bakteri diazotrophic yang hidup bebas yang memiliki fase/tahap istirahat dalam cyst nya. Azotobacter terutama dapat kita temukan pada jenis tanah netral sampai dengan tanah alkalin/basa, lingkungan akuatik, dan pada beberapa tanaman. Azotobacter memiliki beberapa kemampuan metabolik, termasuk mengikat nitrogen bebas melalui konversi menjadi ammonia. Sistem yang unik dari Azotobacter ini adanya tiga enzim nitrogenase yang berbeda yang membuat para peneliti tertarik pada bakteri ini. Azotobacter spp telah meningkatkan kecepatan metabolik pada beberapa organisme .

Bakteri ini hidup bebas yang tumbuh dengan baik pada media bebas nitrogen. Bakteri ini menggunakan nitrogen bebas untuk sintesis sel protein. Sel protein ini kemudian mengalami proses mineralisasi dalam tanah setelah Azotobacter mengalami kematian, dengan demikian berkontribusi terhadap ketersediaan nitrogen bagi tanaman budidaya.

4.2.2 Karakteristik dan struktur Genom Azotobacter

Azotobacter adalah bakteria gram negatif, polimorfik, yaitu bakteri ini berbeda ukuran dan bentuk. Ukuran bakteri ini berkisar dari 2-10x1-2.5 m, sel muda memiliki

flagella peritrichous dan digunakan sebagai organ lokomotif. Populasi dari bakteri ini meliputi bentuk *encapsulated* dan mempertinggi resistensi terhadap panas, desikasi dan kondisi yang merugikan. Cyst berkecambah dibawah kondisi baik untuk membentuk vsel vegetatif. Cyst ini juga memproduksi polisakarida. *Azotobacter* spp., cukup sensitif terhadap pH asam, kadar garam yang tinggi dan temperatur diatas 35°C.

Terdapat 4 spesies penting dari *Azotobacter* ini diantaranya *A.Chroococcum*, *A.agilis*, *A.paspali* dan *A.vinelandii* yang mana *A.chroococcum* ini sebagian besar kita temukan di dalam tanah.

Azotobacter berisi DNA lebih banyak dibandingkan dengan jenis bakteri lain, tetapi ukuran genomnya sangat khas dari hampir prokariotik yang ada. Sel *Azotobacter* lebih besar dibandingkan dengan bakteri lainnya. DNA dari *Azotobacter* spp memperlihatkan persamaan, berhubungan dengan tipe gen dan faktor pengenalan, pada DNA dari *Escherichia coli*. Informasi genetik dapat ditransfer dari *Azotobacter* atau ke bakteri lain melalui cari konjugasi atau transformasi.

4.2.3 Fungsi *Azotobacter*.

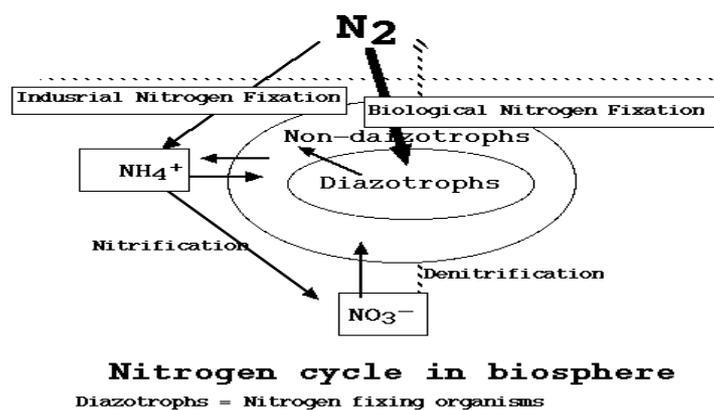
Azotobacter secara alamiah memfiksasi nitrogen bebas di dalam rizospher. Terdapat perbedaan pada masing-masing strain *Azotobacter* yang bervariasi dalam kimia, biologi dan karakter lainnya. Beberapa strains memiliki kemampuan memfiksasi nitrogen lebih tinggi dibandingkan dengan strains lainnya.

Azotobacter menggunakan karbon untuk proses metabolismenya dari substansi sederhana atau substansi senyawa dari karbon yang ada di alam. Persamaannya, medium yang digunakan untuk pertumbuhan *Azotobacter* memerlukan keberadaan nitorgen organik, mikro nutrisi dan garam untuk meningkatkan kemampuan fiksasi nitrogen oleh *Azotobacter*. Di samping memfiksasi nitrogen, *Azotobacter* juga menghasilkan Thiomin, Riboflavin, Nicotin, indol acitic acid and giberalin. Ketika

Azotobacter diaplikasikan ke dalam benih, perkecambahan benih diperbaiki ke tingkat yang lebih baik, juga *Azotobacter* berperan dalam mengontrol penyakit tanaman melalui substansi yang dihasilkan oleh *Azotobacter*.

4.2.4 Struktur Sel Dan Metabolisme *Azotobacter*

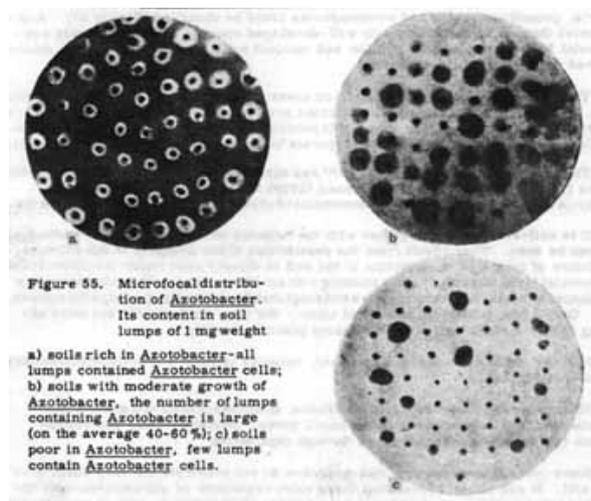
Azotobacter memiliki menghasilkan perlakuan yang baik dari ketertarikan komunitas peneliti disebabkan keunikan dari model metabolismenya, dimana mikroorganisme ini dapat mengikat nitrogen secara aerob. Secara khas, selnya memiliki laju respirasi yang cukup tinggi membolehkan oksigen secara normal - nitrogenase sensitif dalam mengalami pembongkaran oksigen terbatas. *Azotobacter* juga mampu memproduksi protein yang dapat melindungi nitrogenase dari oksigen yang tiba-tiba – membangkitkan kondisi stress. Ciri/sifat lain dari *Azotobacter* ini adalah kemampuan dalam mensintesis tidak hanya satu macam, tetapi tiga nitrogenase. Spesifik ge digunakan untuk mensintesis masing-masing nitrogenase. Sel *Azotobacter* bertangkai besar, sedikitnya berdiameter 2 mikron. Mereka dapat hidup tunggal, berikatan, atau berumpun dan bisa atau tidak bergerak dengan flagella. Tahap istirahat dihabiskan seperti dinding cyst yang tebal, yang melindungi organisme ini dari iklim yang tidak menguntungkan.



Gambar 19. Siklus Nitrogen di Biosfer
<http://microwebiki.kenyon.edu>

4.2.5 Ekologi Azotobacter

Organisme Diazotrophic seperti *Azotobacter* berperan penting dalam setiap ekosistem, bekerja untuk membuat nitrogen menjadi tersedia bagi semua organisme. *Azotobacter* dan bakteri serupa lainnya mengubah nitrogen menjadi ammonia melalui proses fiksasi nitrogen, setelah itu ammonia diubah menjadi protein. Fiksasi nitrogen digunakan dalam pertanian dalam hubungannya dengan rotasi tanaman dan pemupukan ; Tanah – sebagai tempat tinggal diazotrop seperti *Azotobacter* terutama sangat berguna dalam menaksir kesehatan dan kekuatan dari dasar. *Azotobacter* ditemumukan hampir diseluruh dunia, pada kisaran iklim yang ekstrem Siberia utara sampai ke Mesir dan India.



Gambar 20 . [N.A. Krasil'nikov](http://microwebiki.kenyon.edu)
<http://microwebiki.kenyon.edu>

Gambar di atas adalah sampel tanah berisi perbedaan jumlah *Azotobacter*. Sampel kiri bagian atas memperlihatkan jumlah *Azotobacter* yang sehat, yang menurun ke level cukup pada bagian kanan atas dan level rendah dari *Azotobacter* berada di bagian bawah.

4.2.6 Fiksasi Nitrogen oleh *Azotobakter*

Spesies *Azotobakter* diketahui mengikat kira-kira 10 mg N/g gula dalam kultur murni dalam medium bebas nitrogen. Jumlah maksimumnya sebesar 30 mg. N yang diikat per gram gula yang telah dilaporkan oleh *Lopatina*. Bagaimanapun *Azotobakter* merupakan saingan lemah untuk nutrisi di dalam tanah. Sebagian besar strains dari *Azotobakter* untuk oksidasi memerlukan sekitar 1000 kg bahan organik untuk mengikat 30 kg N/ha. Ini kedengarannya tidak realistis untuk tanah kita yang status karbon aktifnya sangat rendah. Di samping itu, tanah yang didiami oleh sejumlah besar mikroba lainnya, semua berkompetisi untuk memperoleh karbon aktif.

Salah satu inoculan bakteri yang penting untuk meningkatkan ketersediaan nitrogen tanah, dan peningkatan hasil adalah *Azotobakter*. Kemampuan *Azotobakter* dalam memfiksasi N₂ telah diketahui pertama kali oleh Beijerinck pada tahun 1901 (Page 1986). Namun demikian peningkatan hasil ini tidak konsisten jika dibandingkan dengan rendahnya kapasitas fiksasi bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik. Karena itu, diduga terdapat faktor lain yang berperan dalam pengendalian pertumbuhan tanaman seperti produksi fitohormon, pemutusan siklus penyakit maupun hama melalui perubahan karakteristik mikroba, fisik atau kimia tanah, atau melalui peningkatan aktivitas makrofauna tanah seperti cacing tanah (Peoples *et al*, 1995). Secara umum, fiksasi nitrogen biologis sebagai bagian dari input nitrogen untuk mendukung pertumbuhan tanaman telah menurun akibat intensifikasi pemupukan anorganik. Penurunan penggunaan pupuk nitrogen yang nyata agaknya hanya dapat dicapai jika agen biologis pemfiksasi nitrogen diintegrasikan dalam sistem produksi tanaman. Sejumlah kajian mengindikasikan bahwa *Azotobakter* merupakan rizobakteri yang selalu terdapat di tanaman sereal seperti jagung dan gandum (Abbass & Okon 1993a; Abbass & Okon 1993b; Hindersah *et al*, 2000; Hindersah *et al*, 2003a) maupun sayuran (Hindersah & Setiawati 1997; Hindersah *et al*, 2003b). Dengan demikian akan

terjadi sistem asosiatif yang intensif seperti yang diperlihatkan strain *Acetobacter* dan *Herbaspirillum* dengan tebu dan *Azospirillum* dengan gandum (Kennedy *et al*, 1997). Asosiasi ini dirasakan penting mengingat nitrogen adalah unsur hara makro esensial, dan di lain pihak, produksi tanaman di Indonesia akan tergantung dari input nitrogen karena umumnya tanah di Indonesia hanya mengandung sedikit nitrogen. Pupuk nitrogen akan tetap berperan penting dalam peningkatan produksi tanaman, namun demikian penggunaannya harus diatur untuk menjamin produktivitas, stabilitas dan keberlanjutan ekosistem pertanian. Oleh karena itu, inokulasi rizobakteri *Azotobacter* selayaknya dijadikan salah satu faktor dari manajemen nitrogen dalam suatu sistem tanam sehingga akan bersifat sinergis dengan input nitrogen lainnya seperti pupuk dan bahan organik yang selanjutnya dapat menjamin kesehatan tanah.

4.2.7 *Azotobacter* dalam tanah

Di tanah india, populasi *Azotobacter* tidak lebih dari 10000 sampai 11akh/g tanah. Populasi *Azotobacter* sebagian besar dipengaruhi oleh mikroorganisme lainnya yang ada di dalam tanah. Ada beberapa mikroorganisme yang menstimulasi populasi *Azotobacter* di dalam tanah dengan demikian ada peningkatan fiksasi nitrogen oleh *Azotobacter*.

Dengan kata lain ada beberapa mikroorganisme yang secara berlawanan berpengaruh pada populasi *Azotobacter* dan karenanya proses fiksasi nitrogen terhambat. Sebagai contoh cephalosporium adalah organisme yang umumnya ditemukan dalam tanah yang membatasi pertumbuhan *Azotobacter*. *Azotobacter* juga menghasilkan beberapa substansi yang dapat mengurangi serangan tanaman dari patogen seperti Alternaria, Fusarium dan Helminthosporium. Karenanya *Azotobacter* juga berperan sebagai agen kontrol biologis.

4.2.8 Produksi Fitohormon oleh *Azotobacter*

Bentuk dan fungsi tanaman tergantung pada komunikasi antar sel yang dimediasi oleh senyawa kimia yang disebut fitohormon. Di dalam sel, fitohormon berinteraksi dengan protein khusus yang disebut reseptor. Kompleks fitohormon-reseptor ini adalah bentuk fitohormon yang aktif dan efektif dalam jumlah yang sangat kecil, yaitu antara 10^{-6} sampai 10^{-8} M. (Taiz & Zeiger 1991).

Hormon tanaman dikelompokkan ke dalam lima grup yaitu auksin, giberelin, sitokinin, etilen dan asam absisat. Tanaman memenuhi kebutuhan akan hormon tumbuh melalui kemampuannya untuk mensintesis ke lima hormon tersebut (Davies 1995) atau mendapatkannya dari rizosfir (Hindersah *et al*, 2002) maupun filosfir (Werner 1992) sebagai akibat dari aktivitas mikroorganisme dalam mensintesis fitohormon.

Kemampuan *Azotobacter* dalam memproduksi fitohormon sitokinin dan auksin dilaporkan pertama kali oleh Vancura dan Macura pada tahun 1960 (Vancura 1988). Sampai saat ini sejumlah penelitian telah membuktikan kemampuan rizobakteri *Azotobacter. chroococcum*, *A. beijerinckii*, *A. paspali* maupun *A. vinelandii* dalam memproduksi fitohormon terutama sitokinin. Taller & Wong (1989) membuktikan adanya sitokinin dari jenis zeatin ribosida (ZR), Zeatin (Z), isopenteniladenosin (2iPR), isopenteniladenin (2iP), metiltiozeatin (MSZ) dan metiltioisopentenil-adenin (MS2iP) yang diekskresikan oleh *A. vinelandii*. Abbass and Okon (1993b) memperlihatkan bahwa kemampuan *A. paspali* untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman berhubungan dengan kapasitasnya dalam mensintesis factor tumbuh.

Sejumlah isolat *Azotobacter* yang dikulturkan pada suhu kamar maupun 30 OC selama 60 jam mengekskresikan fitohormon sitokinin, atau giberelin ke dalam media pertumbuhan bebas N. Di dalam supernatant kultur cair *A. chroococcum*, yang diisolasi dari rizosfir jagung, dengan kepadatan 108 cfu/ml terdapat kinetin dan benziladenin-9-

glukosidamasing-masing dengan konsentrasi 0.0197 dan 0.004 µg/ml. Selain sitokinin, analisis khromatografi menunjukkan supernatan mengandung 0.038 µg/ml GA5 dan 0.028 µg/ml GA7 (Hindersah *et al*, 2000). *Azotobacter* sp., diisolasi dari rizosfir tomat, yang dikulturkan di media bebas N mengekskresikan GA1 sebanyak 13.57 µg/mL dan sitokinin sebanyak 10.13 µg/mL (Hindersah *et al*, 2001). Analisis HPLC fase terbalik pada kultur isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari rizosfir bibit lettuce memperlihatkan adanya 0.04 ppm sitokinin, 1.9 ppm GA3, 0.9 ppm GA5 dan 1.0 ppm GA7 tetapi tidak terdeteksi adanya auksin (Hindersah *et al*, 2003b).

Meskipun secara teori pembentukan fitohormon terutama sitokinin dihambat oleh nitrogen tersedia, tetapi suatu isolat *Azotobacter* dari rizosfir tomat yang dikulturkan selama 72 jam pada suhu kamar di dalam media 3mL/L pupuk organik cair yang mengandung nitrogen kurang dari 1% dapat memproduksi hormon. Dengan kepadatan sel 3.7×10^9 cfu/mL isolat ini mengekskresikan 2.39 µg/mL sitokinin, tetapi tidak terdeteksi adanya fitohormon giberelin dan auksin (Hindersah *et al*, 2002b) Meskipun masih terlihat adanya inkonsistensi kualitas dan kuantitas fitohormon yang diekskresikan, data di atas membuktikan bahwa rizobakteri ini sangat berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber fitohormon eksogen tanaman. Kemampuan ini penting untuk dieksplorasi mengingat peran fitohormon yang sangat penting bagi perkecambahan dan perkembangan akar di awal pertumbuhan tanaman.

4.2.9 Seleksi Strains *Azotobacter*

Setelah proses isolasi *Azotobacter* dari dalam tanah murni, pengujian di laboratorium dalam bentuk murni. Dalam tanah yang subur pada umumnya ditemukan *A.Chroococcum*. organisme ini bersifat aerobik di alam, memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya. Dalam kultur kimia Malinin, bentuknya diperlihatkan berwarna kehitaman pada kulturnya. Organisme ini secara jelas ditemukan dalam tanah alkalin

atau tanah netral. Starin *Azotobacter* bervariasi dalam kemampuan memfiksasi N yang bergantung pada pH tanah, tanaman yang dibudidayakan dan kondisi atmosfer dalam tanah. Karena itu sering kali kapasitas pengikatan nitrogen oleh starins ini diuji. Maksudnya untuk mendapat strains dari *Azotobacter* yang sangat efisien. Pengujian salah satunya dilakukan di *green house*, dalam pot dan di lapangan di bawah bimbingan ahli mikrobiologis, beberapa diantaranya adalah sebagai berikut :

1. **Azetylene reduction Test:**. Strains *Azotobacter* yang berbeda dalam bentuk murni ditumbuhkan di laboratorium dalam tabung pemisah berbentuk kerucut (*separate conical flasks*). Tabung ini kemudian dikocok selama 72 -50 jam untuk mendapatkan pertumbuhan penuh dari bakteri dalam medium 10 – 15 ml, keduanya dipindahkan ke dalam botol, ke dalam botol ini ditambahkan 10 ml gas acetilen dan kemudian botol ditutup dengan tutup gabus dan biarkan dalam posisi berdiri dalam gudang (*shed*) selama 2 -4 jam untuk melihat reaksi enzim nitrogenase dengan gas acethylen. Selama periode ini, acethylene mengalami konversi menjadi ethylene. Persentase kedua gas ini diukur secara kromatografi. Strain yang memiliki nitrogenase lebih banyak akan membentuk gas ethylene lebih banyak juga. Secara alami, strains ini akan diseleksi untuk kegunaan selanjutnya.
2. **Percobaan dalam Pot.** Setelah dilakukan pengujian strains di laboratorium, dan seleksi strains yang lebih efisien, uji berikutnya dilanjutkan dengan percobaan dalam pot. Pada uji ini, pot dibersihkan dan diberi desinfektan lalu kemudian diisi oleh sejumlah tanah kebun yang seragam yang sebelumnya disterilisasi terlebih dahulu.

Strain yang ditemukan efisien dalam acetylene reduction test diseleksi dan kemudian diperbanyak dalam bentuk murni. Kultur air kaldu dicampur dengan liquite dan

inokulan sehingga digunakan untuk menginokulasi benih. Benih kemudian dikeringkan dalam gudang (*shed*) dan ditanam dalam pot. inokulasi yang sesuai pada tanaman kontrol dijaga untuk perbandingan. Tanaman disiram ketika diperlukan dan biarkan tumbuh selama 45-60 hari. Perbedaan antara tanaman yang dinokulasi dan tidak diinokulasi dapat dilihat dari dengan tinggi, kandungan nitrogen dalam tanaman dan tanah, dan berat kering. Strains yang efisien dapat digunakan untuk uji lapangan selanjutnya.

3. **Uji Lapangan.** Strains yang ditemukan efisien di bawah kondisi rumah kaca diperlukan untuk melalui/menjalani uji lapangan yang sangat penting. Strain yang ditemukan efisien dalam rumah kaca dan uji acetylene digunakan di lapangan untuk melihat kompetisinya dengan tumbuhan yang asli memperoleh nutrisinya dari dalam tanah. Strain efisien dari *Azotobacter* digunakan untuk benih khusus dan sown. Kontrol yang memadai/cukup senantiasa dijaga untuk perbandingan. Semua faktor yang ada dijaga kecuali inokulasi benih dengan strain *Azotobacter* yang efisien.

Setelah dewasa hasil dicatat dan dibandingkan. Percobaan diulang untuk 3 sampai 4 tahun pada tempat yang berbeda. Dari data ini strains yang efisien diseleksi dan digunakan untuk memproduksi *Azotobacter* dalam skala besar. Strains disimpan di bawah kondisi dingin atau disimpan dalam refrigerator. Untuk produksi biofertilizer, selalu disarankan untuk menggunakan lebih dari satu strains untuk keamanan.

4.3 AZOSPIRILLIUM

4.3.1 Pendahuluan

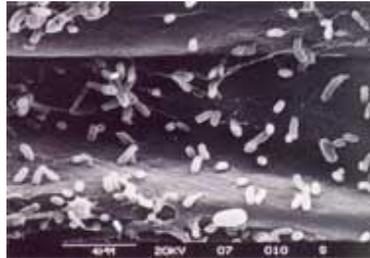
Perbedaan fisik utama antara *A. brasilense* dan *A. lipoferum* adalah bahwa *A. brasilense* senantiasa bergerak selama periode yang panjang setelah koloninya melewati trophophase. *A. brasilense* lain pada umumnya tak dapat dibedakan.

Meskipun ada konotasi pada namanya, organisme ini dapat ditemukan hampir di semua tempat. Baik *A. brasilense* atau *A. lipoferum* ditemukan pada 30-90% sampel tanah yang diambil dari seluruh dunia. Organisme ini ditemukan juga di permukaan akar tanaman, khususnya pada beras, gandum, barley dan oats. Ini menunjukkan adanya interaksi dengan tanaman disana ; keberadaannya dapat mensuplai pengikatan nitrogen, membantu pengambilan mineral, dan menyediakan hormon pertumbuhan tanaman. Mikroorganisme ini juga ditemukan telah melakukan hal yang sama dalam akar tanaman, namun yang lainnya bersifat patogenik.

Dalam kondisi aerobik, *Azospirillum* menghasilkan pigmen merah muda (pink), tetapi mikroorganisme ini tidak pernah melakukan fotosintesis. *A. brasilense* tidak mengikat nitrogen secara aerobik; mikroorganisme ini merupakan mikroaerobik pemfiksasi nitrogen. Dalam medium semisolid bebas nitrat, gerakannya menjadi nyata/jelas. Mikroorganisme ini membuat lapisan tipis di bawah permukaan untuk mencapai kondisi mikroaerobik. (flagelata berada di kutub dan di bagian lateral/samping).

A. brasilense tumbuh baik ketika terdapat malat. *A. brasilense* akan menghasilkan exopolisakarida tanpa kehadiran nitrogen. Hal ini senantiasa dilakukan sebagai sifat mutualistiknya.

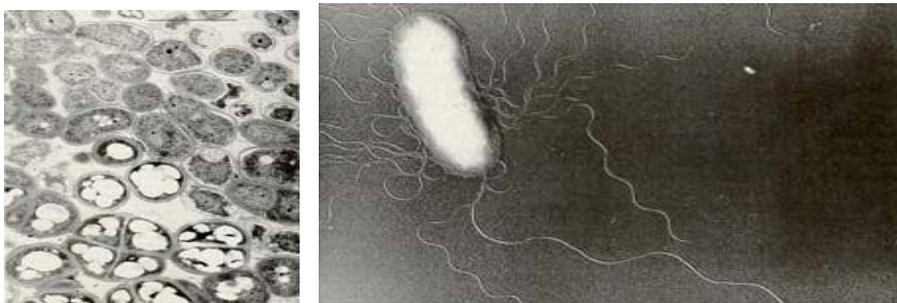
Cukup menarik, pentingnya mikroorganismenya ini dan mulai jarang ditemukan pada tanah-tanah pertanian. Pemakaian senyawa yang terlalu berat telah menghilangkannya , menghalangi kehadirannya.



Gambar 20. Scanning electron micrograph demonstrating the colonisation of wheat roots by strains of *Azospirillum*... a bacterial inoculant that acts as a phytostimulator.

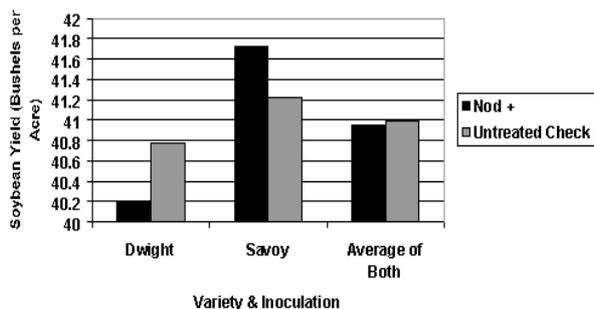


Gambar 21. *Azospirillum* induces the proliferation of plant root hairs which can result in improved nutrient uptake.

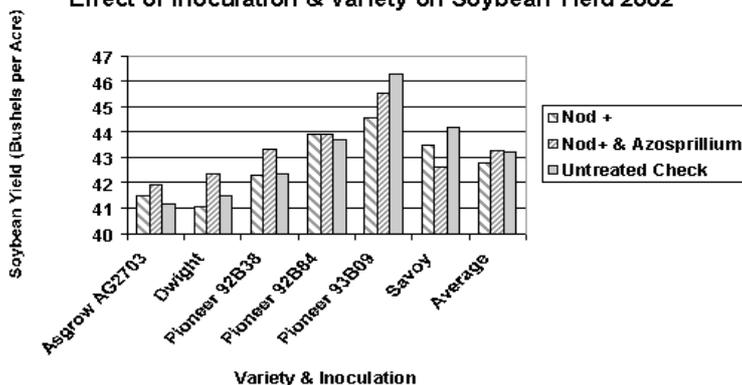


Gambar 22. Flagella: Electron micrograph of *Azospirillum*
<http://microwebiki.kenyon.edu>

Effect of Inoculation & Variety on Soybean Yield
2001-2002



Effect of Inoculation & Variety on Soybean Yield 2002



Gambar 23. Variety and Inoculationn.
<http://microwebiki.kenyon.edu>

4.3.2 Taksonomi *Azospirillum*

Taksonomi *Azospirillum lipoferum* terdiri dari tiga grup/kelompok isolat spesies ini berdasarkan karakteristik fisiologis, terutama reduksi nitrat, diantaranya sebagai berikut :

- Grup 1 (mencakup strain tipe ATCC 29145): mereduksi nitrat dan menghasilkan gas dari ammonium nitrat. Tidak memerlukan biotin untuk fiksasi nitrogen ataupun untuk pertumbuhannya ; tidak memerlukan glukosa ; positif katalase; relatif resisten terhadap streptomycin, tetracycline, gentamycine dan chloromphenicol.

- Grup II : Tidak memerlukan nitrat ; memerlukan biotin untuk pertumbuhan terhadap nitrogen dan NH_4^+ ; tumbuh pada glukosa ; negatif katalase; lebih sensitif terhadap antibiotik yang telah disebutkan pada grup 1.
- Grup III : Identik dengan frup I, kecuali kemampuan dalam mereduksi nitrat lebih jauh dan ini menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi terhadap tetracycline.

Krieg (1977) menyebutkan bahwa genus/genera dari *Azospirillum* terdiri dari dua spesies, yaitu *A. lipoferum* dan *A. brasiliensis*.

4.3.3 Lokasi *A. lipoferum*

Akumulasi *A. lipoferum* banyak ditemukan pada permukaan atau di dalam akar tanaman jagung, *Digitaria* dan jenis-jenis rumput lainnya

4.3.4. Potensi Fiksasi Nitrogen *Azospirillum*

Studi mengenai fiksasi nitrogen pada *A. lipoferum* dengan menggunakan ^{15}N menunjukkan bahwa organisme ini mampu memfiksasi nitrogen sendiri.

Potensi dari *A. lipoferum* yang berasosiasi dengan akar untuk memfiksasi nitrogen pada potongan sistem akar pra-inkubasi sebelum tes acetylene (reduksi C_2H_2) yang biasanya berisi potongan akar yang cukup/lebih baik daripada tanaman utuh.

4.3.5 Karakteristik, Asosiasi, dan Peran *Azospirillum* sp.

Jasad penambat N *Azospirillum* sp. yang sebenarnya sudah lama dikenal seolah-olah terlupakan selama puluhan tahun sejak pertama kali ditemukan oleh Beijerinck. Baru pada tahun 1974 setelah Day dan Dobereiner mengamati adanya asosiasi yang erat antara jasad tersebut dengan perakaran berbagai rerumputan tropika, banyak ahli mulai tertarik untuk melakukan penelitian mengenai jasad renik tersebut. Nama *Azospirillum* sebagai genus bakteri penambat N_2 diajukan oleh Krieg dan Tarrand (1978) sebagai

pengganti *Spirillum lipoferum* yang dikemukakan pertama kali oleh Beijerinck pada tahun 1925.

Pada mulanya *Azospirillum* sebagai genus mencakup dua spesies yang dikenal, yaitu *Azospirillum lipoferum* dan *Azospirillum brasilense*. Sekarang ada lima spesies tambahan, yaitu *Azospirillum amazonense*, *A. dobereineriae*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, dan *A. largimobile* (DSMZ (2003)). Menurut Dobereiner (1991), karakteristik spesies tersebut adalah seperti tercantum pada Tabel 1. Gadagi *dkk.* (2002) menyatakan bahwa di antara bakteri penambat N yang hidup bebas, *Azospirillum* sp. merupakan bakteri yang dominan dalam menambat N₂. Menurut Rocha *dkk.* (1981) dan El-Komi *dkk.* (1998), akar tanaman kelompok C4 seperti jagung, sorgum, tanaman rumput-rumputan, dan beberapa jenis tanaman lainnya secara istimewa dikolonisasi oleh *Azospirillum lipoferum*, sedangkan akar tanaman kelompok C3 seperti gandum, padi, dan *oats* umumnya dikolonisasi oleh *Azospirillum brasilense*. Hal itu terjadi karena adanya sifat kemotaksis *Azospirillum* sp. terhadap asam organik yang dihasilkan sebagai eksudat akar tanaman inang. Menurut James dan Olivares (1997), bakteri *Azospirillum* sp. digolongkan ke dalam kelompok bakteri *diazotrof endofitik fakultatif* karena bakteri itu mengandung enzim nitrogenase dan mampu menambat N secara hayati dan dapat hidup dalam jaringan akar dan mengkolonisasi permukaan akar. *Azospirillum brasilense* dapat dijumpai pada berbagai jenis tanah, rizosfer, dan tanaman serta dapat diinokulasi dari rizosfer gandum. Umumnya *A. brasilense* dijumpai pada tanah bertekstur pasir-liat berpasir (Ladha dan Watanabe, 1987, dan Zaki *dkk.*, 1992), tanah aluvial, laterit, dan salin sulfat .

Berdasarkan pengamatan tentang distribusi ekologi *Azospirillum* sp. dari penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa bakteri tersebut dapat hidup dengan baik di daerah tropika dan subtropika dan dapat hidup pada semua jenis tanah dan perakaran tanaman. Penentu penting bagi tempat hidupnya di tanah adalah vegetasi

dan pH tanah. Pada tanah hutan tropis dan sabana, bakteri hanya dijumpai secara sporadik. Jika lahan tersebut diusahakan, ternyata terjadi perkembangan bakteri di bawah rerumputan (Boddey dan Döbereiner, 1994). Di antara beberapa tanaman tropis selain rumput, hanya ubi jalar, singkong, dan akar paku-pakuan saja yang berisi *Azospirillum* jika mikroorganisme itu diinokulasikan ke tanah. Pada tanaman rumput *Digitaria* dan jagung, akar tanaman terinfeksi dan bakteri ditemukan di dalam akar. Jumlah bakteri pada akar tanaman terinfeksi diperoleh dari tanaman yang diinokulasi di lapangan sebanyak $9,0 \times 10^6$ sel g⁻¹ akar tidak steril dan $1,6 \times 10^6$ g⁻¹ akar steril (Okon, 1985). Dibandingkan dengan spesies lain, *Azospirillum brasilense* atau *Azospirillum lipoferum* mempunyai kisaran toleransi yang lebih luas, tetapi efisiensi fiksasi N₂ tetap menurun dengan terbatasnya oksigen (Del Gallo dkk., dikutip Döbereiner, 1991). Daerah penyebaran *Azospirillum brasilense* cukup luas, dari daerah temperat dengan kisaran suhu 10 sampai 20°C, subtropika, mediteran, sampai padang rumput tropis yang bersuhu 10 sampai 30 °C. Di daerah beriklim kering terlalu lama seperti Israel, spesies itu jarang ditemukan. Temperatur optimum bagi diazotrof mikroaerob adalah 32 sampai 36°C yang menjelaskan mengapa organisme itu lebih umum dijumpai di kawasan subtropika dan tropika (Döbereiner, 1991). Karakteristika organisme untuk tumbuh subur pada rizosfer adalah: (1) kemampuan bertahan terhadap perubahan fisika dan kimia lingkungan tanah, (2) kemampuan tumbuh dengan baik dan memperoleh energi yang diperlukan dari suplai karbon dan mineral pada zona perakaran, dan (3) dapat berkompetisi secara memuaskan dengan organisme rizosfer lainnya dalam keadaan energi terbatas dan nutrisi yang tersedia.

Bakteri *Azospirillum* merupakan mikroba penambat N yang hidup berasosiasi dengan tanaman di dalam akar. Asosiasi antara *Azospirillum* dengan akar tanaman mampu meningkatkan efisiensi pemupukan. Menurut Hastuti dan Gunarto (1993), asosiasi antara *Azospirillum* sp. dengan tanaman diduga bersifat simbiosis karena

bakteri itu menggunakan senyawa malat sebagai sumber C untuk pertumbuhannya. Kefalogianni dan Anggelis (2002) menambahkan bahwa asosiasi yang bersifat simbiosis antara *Azospirillum* sp. dengan tumbuhan berlangsung karena bakteri menerima fotosintat dari tumbuhan dan sebaliknya bakteri menyediakan N untuk tumbuhan dari N yang difiksasinya, zat pengatur tumbuh, vitamin, dan unsur besi. Beberapa laporan menunjukkan pengaruh positif inokulasi *Azospirillum* terhadap pertumbuhan tanaman (Elmerich, 1984; Okon, 1985; Michiels *dkk.*,1989). Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa bakteri *Azospirillum* dapat meningkatkan laju yang tinggi fiksasi N pada kondisi optimum. Kemampuan bakteri untuk bertahan tumbuh dan membentuk koloni pada rizosfer tanaman merupakan kondisi awal minimum yang harus dimiliki dalam potensinya untuk mengikat N.

Interaksi antara *Azospirillum* dengan tanaman dapat terjadi dalam rizosfer atau jaringan akar, tetapi tanpa struktur spesifik seperti pada simbiosis *Rhizobium* dengan tanaman legum. Asosiasi itu dapat terjadi terutama karena kemampuan spesies itu dalam memanfaatkan eksudat-eksudat akar secara aktif.

Menurut Del Gallo dan Fendrik (1994), ada beberapa proses terjadinya asosiasi *Azospirillum* sp. pada tanaman, yaitu (1) bakteri tertarik secara kimia (kemotaksis) oleh eksudat akar, baik secara spesifik maupun tidak spesifik dengan senyawa protein dan senyawa C spesifik, (2) bakteri melekat pada permukaan akar, ikatan tersebut lepas dan dibantu oleh flagella dan beberapa komponen senyawa *glycecalyx* (fase pelekatan 1), yang selama tahap ini aglutinasi dapat diinduksi oleh lektin, namun belum diketahui fenomena itu merupakan respons positif atau negatif terhadap tanaman, (3) ada pertukaran pesan antara tanaman dengan bakteri (melibatkan flavon/flavonoid seperti pada simbiosis *Rhizobium*), (4) serat-serat selulosa diproduksi oleh *Azospirillum* sp. yang melekatkan bakteri lebih kuat pada permukaan akar (fase pelekatan 2), dan (5) asosiasi sudah terjadi secara sempurna, terjadi produksi senyawa yang mendukung

pertumbuhan tanaman oleh bakteri dan menstimulasi produksi hormon tanaman endogen, *Azospirillum* sp. sudah ada dalam *rhizoplane* (permukaan akar) dan dalam akar tanaman dan sel-sel *Azospirillum* sp. terlihat mempunyai kemampuan untuk mengubah bentuk yang bermacam-macam (pleomorfi).

Berhasil tidaknya proses fisiologi fiksasi N *Azospirillum*, menurut Michiels *dkk.* (1989), sangat ditentukan oleh berbagai hal, yaitu: (1) pengaruh oksigen, (2) pengaruh temperatur dan pH, (3) metabolisme nitrogen, (4) metabolisme karbon, (5) aktivitas nitrogenase, (6) potensi dan efisiensi fiksasi N, dan (7) kecepatan fiksasi N. Penambatan (fiksasi) N₂ oleh *Azospirillum* sp. dimungkinkan karena adanya enzim nitrogenase. Proses fiksasi N₂ dengan adanya enzim nitrogenase terjadi sebagai berikut: (1) energi ATP dan elektron ferredoksin mereduksi protein Fe menjadi reduktan, (2) reduktan itu mereduksi protein MoFe yang kemudian mereduksi N₂ menjadi NH₃ dengan hasil sampingan berupa gas H₂, dan (3) bersamaan dengan itu terjadi reduksi asetilen menjadi etilen yang dapat digunakan sebagai indikator proses fiksasi N₂ secara biologis (Marschner (1986).

Menurut Michiels *dkk.* (1989), reaksi umum katalis nitrogenase adalah:



Potensi dan efisiensi fiksasi N *Azospirillum* cukup besar. Penelitian dengan isotop ¹⁵N memperlihatkan organisme itu mampu mengikat N oleh dirinya sendiri (tanpa asosiasi). Potensi *Azospirillum* berasosiasi dengan akar untuk memfiksasi N telah diteliti pada sistem akar inang yang dipotong yang mengalami prainkubasi sebelum uji asetilen dan langsung pada tanaman. Kecepatan fiksasi N (reduksi asetilen) yang lebih tinggi diperoleh dengan pematangan akar daripada langsung dari tanaman.

Bakteri *Azospirillum* sp. dapat diisolasi dari sepotong akar yang tumbuh di lapangan dengan aktivitas nitrogenase aktif yang tinggi melalui penelusuran dengan metode ARA (*Acetylene Reduction Assay*). Bakteri terlihat berbentuk batang bengkok

berbagai ukuran dengan bentuk setengah lingkaran atau sampai lingkaran penuh (spiral) dan dengan refraksi tubuh lipid yang nyata. Sel bakteri sangat aktif dan motilitasnya sangat karakteristik (Hamdi, 1982).

Penelitian dengan menggunakan kultur yang diperkaya *Azospirillum* sp. memperlihatkan korelasi yang nyata antara kepadatan jasad renik dengan aktivitas nitrogenase (Döbereiner dan Day, 1976), yang memberikan petunjuk kuat bahwa organisme tersebut merupakan jasad renik utama yang paling berperan dalam penambatan N, yang secara tidak langsung ditunjukkan dengan kemampuan jasad tersebut mereduksi asetilen, sedangkan yang secara langsung ditunjukkan dengan kemampuannya menambat $15N_2$.

Selanjutnya Gunarto *dkk.* (2001) menyatakan bahwa bakteri dari genus *Azospirillum* dapat diisolasi dari rizosfer dan perakaran berbagai varietas tanaman, termasuk sereal dan rumput. Bakteri itu merupakan mikroba penambat N yang hidup berasosiasi dengan tanaman di dalam akar. Asosiasi antara *Azospirillum* dengan akar tanaman meningkatkan efisiensi pemupukan.

Menurut Reynders dan Vlassak (1979), ternyata di samping perannya secara langsung dalam meningkatkan kandungan N tanaman, *Azospirillum* sp. juga mampu menghasilkan fitohormon yang barangkali berpengaruh lebih besar terhadap pertumbuhan tanaman daripada N yang disumbangkan. Reynders dan Vlassak juga mengamati adanya perubahan triptofan menjadi asam indolasetat (auksin) pada kultur murni *Azospirillum brasilense*. Tien *dkk.* (1979) menambahkan bahwa selain dapat menambat N dari udara, bakteri *Azospirillum* sp. juga memproduksi zat pengatur tumbuh tanaman seperti auksin, giberelin, dan sitokinin yang berguna bagi pertumbuhan tanaman.

Ditambahkan oleh Hadas dan Okon (1987) bahwa auksin berfungsi memacu pembentukan akar dan rambut akar sehingga dapat memperluas daerah serapan unsur

hara dan air oleh akar. Menurut Esparza-Mascarus (1988), *Azospirillum brasilense* memproduksi IAA lebih banyak dibandingkan dengan *Azospirillum lipoferum*. Jansen *dkk.* (1992) menyatakan bahwa giberelin terbentuk jika *Azospirillum brasilense* berasosiasi dengan *Trichoderma harzianum* dan substratnya mengandung senyawa pembentuk giberelin. Tanaman yang berasosiasi dengan *Azospirillum* sp. juga akan memperoleh bakteriosin yang berfungsi melindungi tanaman dari serangan bakterial (Michiels *dkk.*, 1989) dan memperoleh vitamin berupa tiamin, niasin, dan pantotenat (Rodelas *dkk.*, 1993). Kemudian Seshadri *dkk.* (2000) mendapatkan *Azospirillum halopraeferens* pada permukaan akar tumbuhan yang tumbuh pada tanah salin yang pada tanah itu bakteri mempunyai kemampuan melarutkan P tidak tersedia.

V. METODA UNTUK MENILAI FIKSASI NITROGEN BIOLOGIS

5.1 Pendahuluan

Penilaian kemampuan untuk memfiksasi nitrogen pada sistem tertentu memerlukan metoda yang sesuai untuk mendeteksi secara langsung dalam memperoleh nitrogen atau secara tidak langsung mengenai aktivitas nitrogenase.

Salah satunya dengan menggunakan metode ARA *Acetylene Reduction Assay*. Metode ini berdasarkan pada prinsip pengukuran aktivitas nitrogenase dalam tanaman legum, non-legumae, algae, sampel air, sampel tanah, dan sebagainya.

Metode ini terutama melibatkan proses inkubasi pada bahan yang akan diuji dalam container gas yang berisi tekanan partial dari acetylene. Pada waktu yang tepat, contoh dari udara/atmosfer dapat disemprom dengan segera atau analisis akhir dengan menggunakan ionisasi nyala api (*flame ionization*) setelah gas kromatografi. Jumlah dari C_2H_4 dapat dideteksi yang berkorelasi dengan intensitas aktivitas nitrogenase dalam sampel. Nilai nitrogenase berlaku melalui metode ini yang secara konvensional menandakan aktivitas fiksasi $N_2(C_2H_2)$ dan aktivitas nitrogenase(C_2H_2).

5.2 ACETHYLENE REDUCTION ASSAY (ARA)

5.2.1 Menyiapkan Contoh/Sampel

Metode ARA dapat dilakukan dengan segera setelah contoh/sampel disiapkan (selama 2 jam). Nodula yang terbaik untuk dilakukan uji ketika masih melekat pada akar. Pemindahan bagian atas tidak bisa diukur dan berpengaruh pada uji jangka pendek (*short term assay*).

Beberapa sistem pengikatan /fiksasi N_2 nampaknya labil pada kondisi dingin dan karenanya sampel jangan disimpan pada kondisi dingin sebelum dilakukan metode assay. Untuk perbandingan, sampling dan pengujian harus dilakukan pada saat yang

sama setiap hari harinya sebab aktivitas nitrogenase pada akar yang etnodulasi dapat berubah karena intensitas cahaya (aktivitas fotosintesis) dan temperatur /suhu sepanjang harinya. Bila memungkinkan, akar yang ternodulasi seharusnya bebas dari tanah dan dilakukan pengujian assay tanpa dilakukan pencucian.

Aktivitas berkurang ketika permukaan film dari sisa air setelah pencucian akar bernodula tidak secara hati-hati dibersihkan dan pengeringan nodula juga aktivitasnya berkurang . Sampel dilakukan uji pada ukuran kontainer dengan baik sekali, seperti botol gelas atau bitil semprot dengan sekat karet penutup untuk membiarkannya ditembus dengan jarum suntik.

Aktivitas nodula menurun akibat tekanan oksigen parsial (pO_2) jatuh di bawah 0.20 atm. Untuk rhizosfer, organisme non simbiotik, pO_2 sekitar 0.04 atm adalah kisaran optimal. Bejana uji harus cukup luas untuk meminimalkan perubahan dalam pO_2 . Sampel liquid/cair harus dikocok dengan baik selama proses pengujian akan lebih baik untuk dilakukan uji pada tanah utuh. Sampel berisi alga hijau biru (*blue-green alga*) harus diiluminasi pada intensitas cahaya yang berhubungan dengan *in situ* di lapangan.

Untuk uji assay dari sistem tanah-tanaman, tanah yang telah dibuang bagian kerasnya dapat ditempatkan kontainer plastik kedap udara yang dihubungkan dengan penutup (*water seal*). Kontainer diinkubasi terlebih dahulu dalam cahaya dimana aktivitas rhizosfer berasosiasi dengan bakteri pemfiksasi nitrogen dipengaruhi oleh fotosintesis. Jumlah propane yang diketahui yang akan diberikan pada konsentrasi 100 ppm disuntikkan dan gunakan standar kalibrasi internal untuk mengukur volume gas dan ruang inkubasi (*incubation chamber*) dan untuk memonitor kebocoran dan kehilangan lainnya dari C_2H_4 .

5.2.2 Prosedur Assay

Untuk sistem aktif seperti nodula atau ganggang hijau biru, pengujian dapat dibuat dalam udara, menyediakan konsentrasi 10% C_2H_2 . Atmosfer dalam botol kecil dapat diubah dengan mengganti evacuating (mengosongkan) menjadi 30 mmHg dan dibilas dengan campuran gas yang tepat (biasanya Ar/O_2) dua sampai tiga kali.

Beberapa gas terpisah dari kontainer sampel dengan menyemprotkan dan menggantinya dengan acetylene untuk memberikan konsentrasi akhir 10% dari acetylene, mungkin dikocok dahulu dengan fase gas lalu dimasukkan ke dalam kontainer sampel. Inkubasi terbaik sampel pada temperatur dimana salah satu konstan atau sesuai dengan temperatur *in vivo*.

Setelah waktu sesuai (30 menit untuk akar nodula legum, sampai 24 jam untuk tanah) sampel gas disemprot. Untuk periode sampai sekitar 3 jam, sampel gas dapat disimpan dengan menyuntikkan jarum ke dalam tutup karet. Untuk penyimpanan sampel gas dalam periode yang panjang, sampel dapat dipindahkan ke dalam kontainer pra-evakuasi (*pre-evacuated containers*)

Volume gas dari bejana uji diukur melalui pemindahan dengan air (gunakan buret) setelah assay. Dalam hal ini tidak digunakan propane sebagai standar internal.

5.3 Kromatografi gas (*Gas Chromatography*)

Campuran gas dapat dipisahkan dengan kromatografi gas dan kemudian diukur dengan ionisasi nyala api atau detektor konduktivitas termal. Untuk acetylene, ethylene, dan propane, material beragam dapat digunakan. Sistem yang sesuai untuk digunakan adalah 80 n100 mesh porapak N atau T dengan diameter 2 m x 0.003m, tiang stainless pada 100°C, dengan gas nitrogen mengalir dengan kecepatan 25 ml/menit menggunakan hidrogen atau detektor ionisasi nyala api udara. Sistem lain yang sesuai adalah 100:0 $NO_3 PO_4$ pada spherosil x 0.3 cm tiang gelas (column glass) pada suhu 35°C dengan

gas pembawa nitrogen gas mengalir pada kecepatan 4 ml/menit. Hampir sebagian besar detektor dapat secara rutin mendeteksi 0.1 ppm C₂H₄ dalam 0.5 ml sampel gas. Untuk N atau T, CH₄ (propane) memiliki waktu penyimpanan terpendek ditelusuri dengan C₂H₄ (ethylene), C₂H₂ (acetylene) dan C₃H₈ (acetone). Untuk kolom Na₃PO₄, bagaimanapun propane eluted sebelum acetylene. Sebagian besar konsentrasi yang bertemu dalam assay, puncak tertinggi dapat secara linier dan dapat dihubungkan dengan konsentrasi dengan ketelitian yang benar .

Perhitungannya :

Perhitungan yang sesuai untuk ethylene (C₂H₄) menghasilkan dalam mol C₂H₄/h (C₂H₄/jam) adalah sebagai berikut :

$$(C_2H_4 \text{ sampel CU} \times \frac{\text{vol gas dalam sampel container}}{\text{Vol injected kedalam GLC}} \times \text{waktu pengujian (h)} \times K)$$

$$(C_2H_4 \text{ blank CU} \times \frac{\text{vol gas dalam blank container}}{\text{Vol injected kedalam GLC}} \times K)$$

Dimana :

CU = Chart unit yang adigunakan untuk mengukur tinggi puncak.

Blank = Sampel container dengan tambahan hanya C₂H₂.

K = Faktor konversi mencakup penggunaan standar campuran gas C₂H₄ untuk mengkalibrasi chromatograph

Sebagai contoh, untuk 100 ppm C₂H₂ standard, K berasal dari :

1 ml dari 100 ppm C₂H₂ berisi : 100 x 10⁻⁶ ml C₂H₄ dan = X CU

22,4 C₂H₄ pada STP = 1 mol C₂H₄

$$1 \text{ ml dari } 100 \text{ ppm C}_2\text{H}_4 = \frac{100 \times 10^{-6}}{22,4 \times 10^3} \text{ mol C}_2\text{H}_4 = 0.00446 \mu \text{ mol C}_2\text{H}_4 = X \text{ CU}$$

$$\text{Kemudian K (atau CU)} = \frac{0,00446}{X} \mu \text{ mol C}_2\text{H}_4$$

DAFTAR PUSTAKA

- Aaron Fairchild Azospirillum brasiliense.. <http://www.web.umr.edu>. Diakses tanggal 11 November 2007.
- Anke Beker. 2003. Symbiotic Plant-Microbe Interaction. www.cebitec.uni-bielefeld.de. Dikases 1 November 2007.
- Azotobacter.http://www.indiaagronet.com/indiaagronet/Manuers_fertilizers/azotobacter.htm. Diakses tanggal 11 November 2007.
- Chen, Wen-Ming, James, Euan K., Coenye, Tom, Chou, Jui-Hsing, Barrios, Edmundo, de Faria, Sergio M., Elliott, Geoffrey N., Sheu, Shih-Yi, Sprent, Janet I., Vandamme, Peter. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006 56: 1847-1851. Abstract
- Davies, P.J. 1995. The Plant Hormones: Their nature, Occurance, and function. Di dalam Davies, P.J. (ed). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisers.
- Hamdi, Y.A .. 2002. Application of Nitrogen fixing Systems in Soil Improvement and Management. FAO and Agriculture Organization of The United Nations .FAO Soil Buletin. Rome.
- Hindersah, R., & Setiawati, M.R. 1997. Upaya peningkatan efisiensi pemupukan N pada lahan marjinal dengan metode biologis dengan inikator tanaman tomat. *Laporan Penelitian*. Bandung: LP-UNPAD.
- Hindersah, R., Arief, D.H. & Sumarni, Y. 2000. Kontribusi hormonal *Azotobacter chroococcum* pada pertumbuhankecambah jagung sistem kultur cair. *Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi Pertanian*.
- Hindersah, R., Arifin, M. & Rudiwan, Y. 2002a. Pengaruh asam humat dan supernatan *Azotobacter chroococcum* terhadap pertumbuhan bibit selada (*Lactuca Sativa* L.) pada Andisol. Makalah disampaikan pada *Seminar Tahunan Himpunan Ilmu Tanah* di Mataram.
- Hindersah, R., Fitriatin, B.N. & Setiawati, M.R. 2003c. *Azotobacter* application in agricultural soil management. *Proceeding International Conference on Environment and urban management*.
- Hindersah, R., Kalay, A.M. & Setiani Muntalif, B. 2003a. Pemanfaatan lumpur instalasi pengolahan limbah domestik: Studi pendahuluan terhadap pertumbuhan vegetatif jagung manis (*Zea mays* L. var. saccharata) dan mikroba tanah. Makalah disampaikan pada *Seminar Persatuan Mikrobiologi Indonesia*, 29-30 Agustus 2003 di Bandung
- Hindersah, R., Setiawati, M.R. & Fitriatin, B.N. 2001. Pengaruh supernatan suspensi kultur cair *Azotobacter* terhadap pertumbuhan bibit tanaman tomat. *Laporan Penelitian*. Bandung: Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran.

- Hindersah, R., Setiawati, M.R. & Fitriatin, B.N. 2002b. Penentuan sumber karbon dan nitrogen untuk meningkatkan kualitas inokulan *Azotobacter* sebagai pupuk biologis pada pembibitan tomat. *Laporan Penelitian*. Bandung: Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran
- Hindersah, R., Setiawati, M.R. & Fitriatin, B.N. 2003b. Inokulasi *Azotobacter sp.* melalui filosfir dan rizosfir pada pembibitan selada lettuce (*Lactuca sativa L.*). *Laporan Penelitian*. Bandung: Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran.
- Impact I and Impact II : interactions between microbial inoculants and resident populations in the rhizosphere of agronomically important crops in typical soils <http://www.ec.europa.eu>. Diakses tanggal 11 November 2007.
- Inoculation of Forage and Legumes. 2007.Pennsylvania State University. www.cropsoil.psu.edu. Diakses 1 November 2007.
- Interaction between Legum Leguminous Plant and Rhizobia Mediated by Nod Factors. 1999. www.glicoforum.gr.jp. Diakses 1 November 2007.
- Kennedy, I.R., Lily L., Pereg-Gerk, Wood, C., Deaker, R., Gilchrist, K. & Katupitiya, S. 1997. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evaluation of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil* 194: 65-79
- List of Bacterial names with Sanding in Nomenclature (LBSN). (2004) <http://www.bacterio.cict.fr/> Diakses 1 November 2007.
- Lloret L, Ormeno-Orrillo E, Rincon R, Martinez-Romero J, Rogel-Hernandez MA, Martinez-Romero E. (2007) *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst Appl Microbiol*. Abstract
- Lyle Paul . 2002. Effect Of Inoculation Applications On Soybean Yield. Northern Illinois Agronomy Research Center 14509 University Rd. Shabbona, IL 60550. www.cropsci.uiuc.edu. Diakses tanggal 11 November 2007.
- Martin Paniske and J. Allan Dwnie. 2003. Plant Biology. Lock, Key and Symbiosis. www.nature.com. Diakses 1 November 2007.
- Murdiyarso, D. 2003. *CDM: Mekanisme Pembangunan Bersih*. Jakarta: Penerbit Buku Kompas.
- Nitrogen fixation, Root and Nitrogen – Fixin Bacteria. From Encyclopedia Britanica on Line. www.britannica.com. Diakses tanggal 6 November 2007.
- Overview of inoculant. www.legumtechnology.co.uk. Diakses tanggal 5 November 2007. Penelitian Universitas Padjadjaran.
- R.E. Hulbert . 1999. Soil Microbiology and Elective Culture Tehnique. www.slic2.edu

- Shantharam, S. & Mattoo, A.K. 1997. Enhancing biological nitrogen fixation: An appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. *Plant and Soil* 194: 205-216.
- Simarmata, T., Hindersah, R. 2004. Potensi Rizobakteri *Azotobacter* dalam Meningkatkan Kesehatan Tanah. *Jurnal Natur Indonesia* 5(2): 127-133 (2004). <http://www.unsri.ac.id>. Dikases tanggal 12 November 2007
- Sparling, G.P. 1998. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicator of soil health. Didalam Pankhurst, C., Doube, B.M. & Gupta, V.V.S.R. (eds). *Biological Indicators of Soil Health*. Wallingford: CABI Publishing.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 1991. *Plant Physiology*. California: The Benjamin/Cumming.
- Taller, B.J. & Wong, T.Y. 1989. Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* Culture Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 266-267.
- Valverde, Angel, Igual, Jose M., Peix, Alvaro, Cervantes, Emilio, Velazquez, Encarna. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006 56: 2631-2637. Abstract
- Vancura, V. 1988. Microorganisms, their mutual relation and functions in the rhizosphere. Di dalam Vancura, V. & Kunc, F. (eds.). *Soil Microbial Association*. Praha: Elsevier.
- Werner, D. 1992. *Symbiosis of Plant and Microbes*. London: Chapman and Hall.