

Faktor Nod sebagai Sinyal Nodulasi untuk Fiksasi N₂ pada Tanaman Legum

Lili Sugiyarto

Jurdik Biologi FMIPA UNY

lili_sugiyarto@uny.ac.id

Abstrak

Tanaman legum mempunyai kemampuan membentuk asosiasi simbiosis dengan Rhizobium untuk memfiksasi nitrogen atmosfer. Asosiasi simbiotik yang terbentuk berfungsi sebagai symbiotic nitrogen fixation (SNF) yang terjadi dalam organ yang dikenal dengan nodul akar. Pada legume, SNF terdiri dari berjuta-juta nitrogen fixing rhizobia yang disebut bakteriod, dan sangat sensitif terhadap gangguan baik gangguan metabolik maupun lingkungan seperti cekaman kekeringan, kondisi gelap yang terus-menerus, pemupukan nitrat, salinitas dan suhu.

Pembentukan nodul akar dikontrol oleh sinyal molekul bakteri ekstraseluler yaitu faktor nod yang akan dikenali oleh tanaman inang. Faktor nod dapat memicu rambut akar menjadi mengeriting yang merupakan respon spesifik terhadap induksi Rhizobium. Selain itu, faktor nod juga menginduksi pembelahan sel korteks dan memungkinkan Rhizobium memasuki jaringan tanaman inang. Selama Rhizobium tidak dapat membentuk faktor nod, maka tidak akan terjadi nodulasi yang merupakan sinyal terjadinya simbiosis. Selain faktor nod, faktor lingkungan akar juga akan mempengaruhi pembentukan nodul dan laju fiksasi nitrogen.

Kata kunci : faktor nod, nodulasi, fiksasi N₂, simbiosis

Pendahuluan

Tanaman famili leguminosae termasuk yang paling banyak di alam, yaitu sekitar 19.000 spesies. Keberhasilannya hidup di alam disebabkan oleh kemampuannya bersimbiosis dengan bakteri Rhizobium yang mampu memfiksasi nitrogen atmosfer, dengan membentuk organ yang disebut nodul akar. Nodul akar ini merupakan tempat terjadinya fiksasi nitrogen dan dikenal dengan symbiotic nitrogen fixation (SNF). Symbiotic nitrogen fixation sangat sensitif terhadap gangguan metabolisme dan lingkungan seperti gugurnya daun, kekeringan, gelap yang terus-menerus, pemupukan nitrat, cekaman suhu dan salinitas. Beberapa tipe cekaman dapat menurunkan permeabilitas nodul terhadap oksigen dengan menghambat aktivitas nitrogenase secara tidak langsung, karena turunnya aktivitas respirasi nodul (Philipus dkk, 2008). Simbiosis antara legum-Rhizobium sangat penting dalam lingkungan pertanian sejak mereka bertanggung jawab dalam fiksasi nitrogen atmosfer. Asosiasi legum-Rhizobium berperan penting dalam menyokong nitrogen dan memelihara kesuburan tanah. Dari 19.000 spesies yang telah ditemukan, hanya sedikit spesies yang telah dipelajari

kemampuan nodulasinya. Bakteri rhizobium mampu melakukan asosiasi simbiosis dengan hampir semua tanaman legum membentuk nodul pada akar, yaitu dengan mereduksi nitrogen atmosfer membentuk amonia yang menguntungkan tanaman. Pembentukan nodul akar dikontrol oleh sinyal molekul bakteri ekstraseluler yang disebut faktor nod yang akan dikenali oleh tanaman inang.

Siklus dan fiksasi nitrogen

Nitrogen merupakan nutrisi yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang sangat besar. Nitrogen diperlukan oleh semua organisme hidup untuk sintesis protein, asam nukleat, dan komponen lain yang mengandung nitrogen. Atmosfer bumi terdiri dari hampir 80% gas nitrogen. Nitrogen di atmosfer tidak dapat digunakan secara langsung oleh organisme hidup sebelum difiksasi, yaitu direduksi menjadi amonia. Tanaman hijau sebagai produsen utama bahan organik memanfaatkan suplai fiksasi nitrogen untuk membuat protein yang masuk dan keluar melalui rantai makanan. Mikroorganisme sebagai dekomposer memecah protein dalam ekskresi dan organisme mati, melepaskan ion ammonium. Kedua proses di atas termasuk dalam siklus nitrogen. Dalam bidang pertanian, nitrogen mempunyai peran penting baik dalam segi kualitas produk dan banyaknya hasil panen. Tanaman di alam memperoleh nitrogen dari proses asimilasi nitrat dan amonium, atau dinitrogen melalui asosiasi dengan bakteri fiksasi nitrogen. Symbiotic nitrogen fixation (SNF) pada tanaman yang berfungsi sebagai sumber karbon untuk energi mereduksi dinitrogen dan melindungi enzim nitrogenase yang sensitif terhadap oksigen merupakan sistem fiksasi yang paling efektif (Stougaard, 2002). Siklus nitrogen merupakan rangkaian konversi gas nitrogen menjadi komponen organik dan akan kembali ke alam dalam bentuk nitrogen. Siklus ini berlangsung secara kontinyu, dan di kendalikan oleh dekomposer dan bakteri nitrogen. Siklus nitrogen dibagi dalam 4 tipe reaksi dan mikroorganisme yang berperan dalam semua reaksi tersebut.

Tabel 1. Tipe-tipe reaksi dalam siklus nitrogen

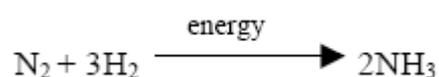
Reaction	Microorganism	Condition	Process
Nitrogen fixation	Nitrogen-fixing bacteria eg <i>Rhizobium</i>	aerobic/anaerobic	The first step in the synthesis of virtually all nitrogenous compounds. Nitrogen gas is fixed into forms other organisms can use.
Ammonification (decay)	Ammonifying bacteria (decomposers)	aerobic/anaerobic	The decomposers, certain soil bacteria and fungi, break down proteins in dead organisms and

			animal wastes releasing ammonium ions which can be converted to other nitrogen compounds.
Nitrification	Nitrifying bacteria eg <i>Nitrosomonas</i> & <i>Nitrobacter</i>	aerobic	Nitrification is a two-step process. Ammonia or ammonium ions are oxidized first to nitrites and then to nitrates, which is the form most usable by plants.
Denitrification	Denitrifying bacteria	anaerobic	Nitrates are reduced to nitrogen gas, returning nitrogen to the air and completing the cycle

(Burdass, 2002)

Fiksasi nitrogen dapat melalui 3 tahap yaitu:

1. Atmospheric fixation : fiksasi yang terjadi secara spontan jika ada cahaya, dan hanya dalam jumlah sedikit.
2. Industrial fixation : pada tahap ini energi yang digunakan sangat tidak efisien, dan digunakan untuk membuat pupuk N
3. Biological fixation : bakteri pemfiksasi nitrogen mampu memfiksasi nitrogen hingga 60%. Pada tahap ini terjadi reduksi gas nitrogen menjadi amonia yang membutuhkan 16 molekul ATP dan satu set kompleks enzim yaitu nitrogenase untuk memotong ikatan nitrogen sehingga dapat bergabung dengan hidrogen. Enzim nitrogenase secara irreversibel dapat dinaktifkan oleh oksigen dan membutuhkan energi yang besar. Reaksi reduksi yang terjadi yaitu :



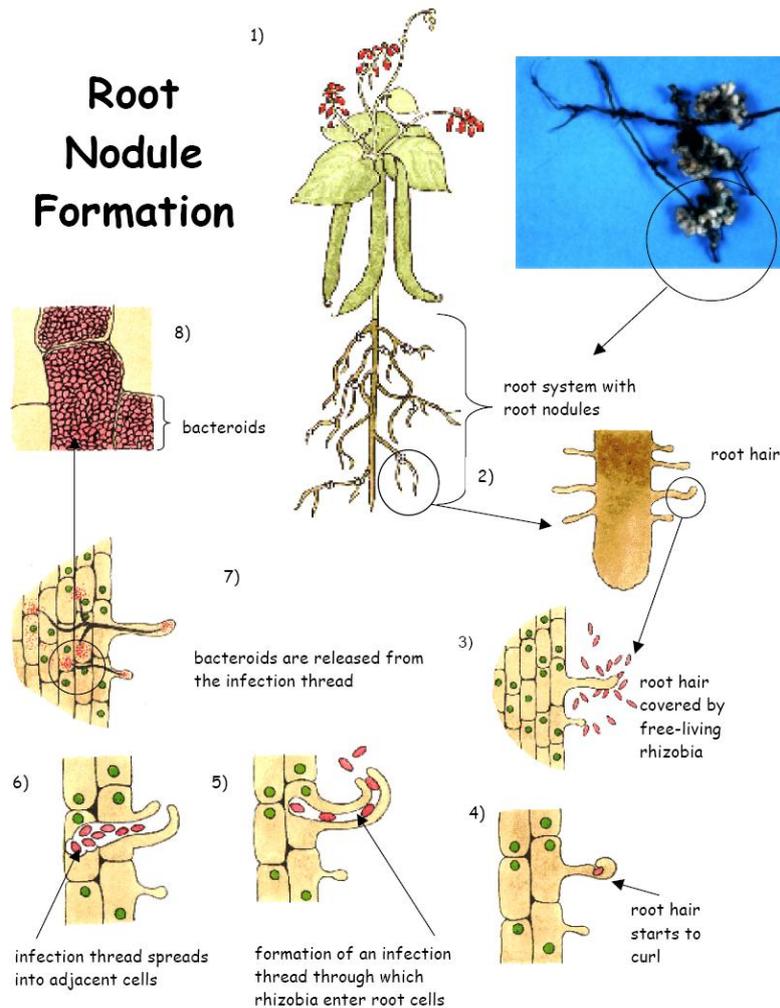
Nitrogen terfiksasi akan lebih mudah dimanfaatkan oleh tanaman melalui asosiasi simbiosis tanaman dengan bakteri pemfiksasi nitrogen. Biological nitrogen fixation (BNF) merupakan sumber nitrogen yang efisien.

Pembentukan nodul akar

Interaksi awal antara tanaman inang dengan *Rhizobium* adalah dengan melepaskan beberapa senyawa kimia oleh sel-sel akar ke tanah. Hal ini mengakibatkan tumbuhnya populasi mikrobial di daerah sekitar perakaran (rhizosfer). Reaksi antara komponen tertentu pada dinding sel bakteri dengan permukaan akar menentukan *Rhizobium* tersebut untuk mengenali inang tanaman yang tepat dan melekatkan rambut-rambut akar. Semua proses

nodulasi diatur oleh kompleks senyawa kimia antara tanaman dan bakteri (Burdass, 2007). Pembentukan nodul dikontrol oleh sinyal molekuler bakteri ekstraseluler yang disebut faktor nod yang akan mengenali tanaman inang (Balachandar dkk, 2007).

Serangkaian gen bakteri mengontrol aspek yang berbeda pada proses nodulasi. Asosiasi simbiosis yang terjadi antara legum-Rhizobium bersifat selektif karena satu strain Rhizobium hanya dapat menginfeksi spesies legum tertentu, contoh : *Rhizobium leguminosarum* dengan *viciae* membentuk nodul pada kacang polong, sedangkan *Bradyrhizobium japonicum* membentuk nodul pada kedelai. Setiap strain Rhizobium mempunyai kemampuan yang berbeda dalam membentuk nodul dengan tanaman legum tertentu (Stougaard,2000). Spesifitas gen menentukan kemampuan strain Rhizobium tertentu sehingga mampu menginfeksi tanaman legum. Walaupun demikian ada strain yang mampu menginfeksi legum tapi tidak mampu memfiksasi N₂, sehingga tidak efektif. Sedangkan strain yang efektif adalah yang mampu menginduksi nodul untuk fiksasi nitrogen. Keefektifan ditentukan oleh spesifitas gen dari serangkaian gen yang berbeda pada bakteri. Gen Nod merupakan gen yang secara langsung berperan dalam tahapan nodulasi. Faktor nod menstimulasi mengeritingnya rambut akar. Rhizobium menyerang akar melalui rambut-rambut akar tempat mereka menginduksi formasi jalur infeksi. Jalur infeksi tersusun atas sel-sel akar dan bukan bakteri, dan hanya terbentuk ketika merespon infeksi. Jalur infeksi terus berkembang melalui sel-sel rambut akar dan memasuki sel-sel akar lain yang dekat walaupun melalui percabangannya. Bakteri memperbanyak diri dengan mengembangkan jaringannya, dan secara kontinyu memproduksi faktor nod yang menstimulasi sel-sel akar berproliferasi dan akhirnya membentuk nodul akar. Setiap nodul akar diselubungi berjuta-juta bakteri Rhizobium (bakteri pemfiksasi nitrogen) yang dikenal dengan bakteroid (Burdass, 2002). Pada legum, Symbiotic Nitrogen Fixation (SNF) terjadi pada organ nodul yang terdiri dari nitrogen fixing rhizobia yang disebut bakteroid (Ott dkk, 2005). Struktur membran sel tanaman yang mengelilingi bakteroid dikenal dengan simbiosom, yang kemungkinan terdiri dari satu atau beberapa bakteroid tempat terjadinya fiksasi nitrogen (Burdass,2002). Mekanisme pembentukan nodul akar dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme pembentukan nodul akar (Burdass, 2002)

Sinyal nodulasi oleh faktor nod

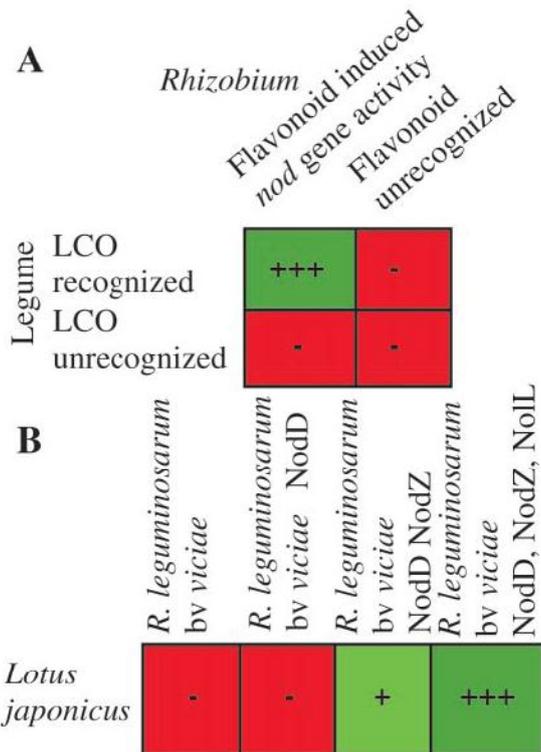
Flavonoid merupakan kelompok molekul yang tersebar dan ada dimana-mana yang diproduksi melalui jalur phenylpropanoid pada kebanyakan tanaman. Flavonoid mengalami diversifikasi bentuk dan fungsi sesuai tempat hidupnya. Biosintesis flavonoid terjadi bila tanaman melakukan proteksi terhadap kerusakan akibat sinar UV dan mikrobia patogen, berperan sebagai pigmen dan co-pigmen yang menentukan warna bunga, mengatur distribusi auksin, dan molekul sinyal untuk simbiosis dengan mikrobia (Subramanian dkk,2007).

Flavonoid yang dikeluarkan sel-sel akar mengaktifkan gen nod pada bakteri sehingga menginduksi pembentukan nodul pada akar. Berdasarkan studi secara in vitro, flavonoid berperan sebagai induser pada ekspresi gen *nod* (gen *nod* berkaitan dengan biosintesis sinyal Nod pada Rhizobium dan berperan sebagai *chemo-attractant* untuk menghimpun Rhizobium yang kompatibel pada permukaan akar. Selama nodulasi, flavonoid mempunyai peran ganda, yaitu sebagai molekul sinyal pada daerah rhizosfer untuk menghimpun Rhizobium yang

sesuai, dan menginduksi biosintesis sinyal Nod (Subramanian dkk, 2007). Selain flavonoid, betain dan xantonin juga berperan sebagai induser gen *nod*.

Nodulasi yang terbentuk dari asosiasi legume-Rhizobium diawali dengan terjadinya pertukaran sinyal antara partner simbiotik yang diinisiasi oleh komponen flavonoid dan isoflavonoid yang dikeluarkan melalui akar tanaman. Simbion Rhizobium mengenali sinyal flavonoid spesifik yang diproduksi oleh tanaman legum yang sesuai dan merespon dengan memproduksi sinyal baru berupa lipo-chitooligosaccharide (LCO: sinyal Nod). Tipe molekul flavonoid yang disekresikan tanaman dan kemampuan Rhizobium mengenali sinyal tersebut dan kemudian menginduksi biosintesis sinyal Nod merupakan tahap paling awal untuk menentukan spesifitas tanaman inang. Pada akar tanaman inang yang sesuai, sinyal Nod menginduksi serangkaian fisiologi dan perkembangan respon berdasarkan pembentukan nodul fungsional. Salah satu responnya adalah terjadinya pembelahan sel pada sel korteks untuk inisiasi primordia nodul. Pada beberapa tanaman legum, pembelahan sel primordia didahului oleh penghambatan transport auksin oleh adanya flavonoid. Hal ini menunjukkan bahwa, flavonoid mempunyai peran penting sebagai pengatur transport auksin selama nodulasi. Selain itu flavonoid juga berperan sebagai induser sinyal Nod di dalam akar. induksi sinyal Nod inilah yang bertanggung jawab pada tingkat selanjutnya terhadap spesifitas inang.

Lipo-chitooligosaccharide (LCO) merupakan sinyal bakteri yang pertama kali dikenal oleh sel epidermis pada zona diferensiasi rambut akar (Subramanian dkk, 2007). Ekspresi gen *nod* pada bakteri, berkaitan dengan jalur infeksi dan lokalisasi LCO immunoreaktif internal pada sel nodul akar dewasa yang mengindikasikan adanya hubungan akibat sinyal LCO yang lebih awal. Setelah endositosis, sintesis LCO_s (Lipo-chitooligosaccharides) terjadi pada bakteroid. Endositosis dan diferensiasi bakteri inilah yang merupakan tanda komunikasi antara tanaman dan bakteri (Stougaard, 2000). Inisiasi hanya terjadi bila tanaman tersebut sesuai atau cocok dan sinyal molekul disintesis dan ada (gambar 2).

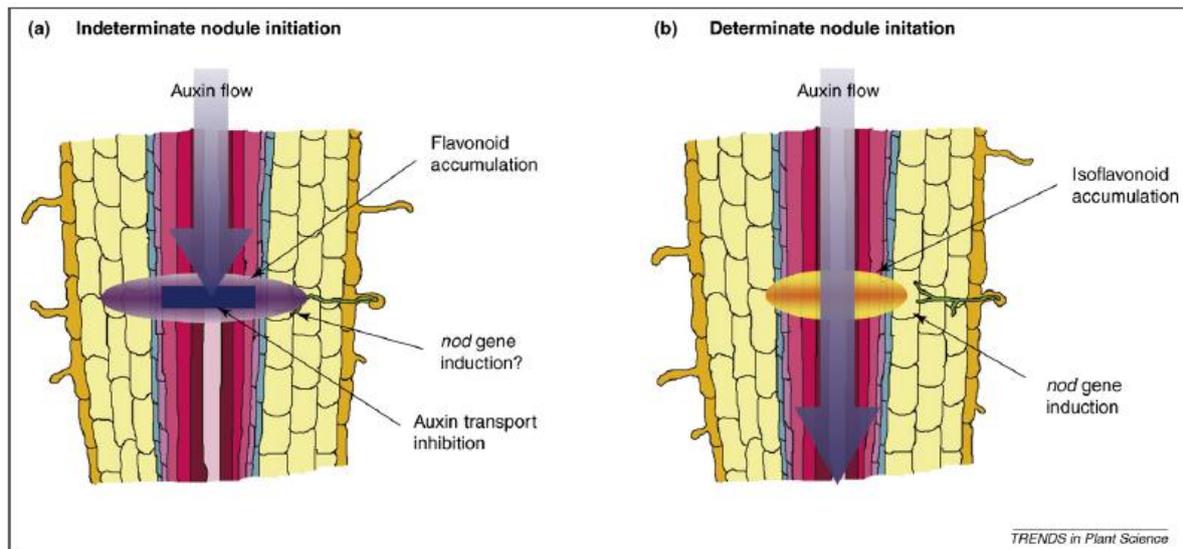


Gambar 2. Skema representasi komunikasi awal antara tanaman legum dan Rhizobium (- tidak ada nodulasi, + nodulasi lambat, +++ nodulasi normal (Stougaard, 2000).

Nodul legum diklasifikasikan menjadi 2 tipe yaitu nodul determinate dan nodul indeterminate berdasarkan ontogeninya. Nodul determinate berbentuk spheris (spherical), tumbuh dari sel korteks bagian luar akar, dan tidak terdiri dari meristem yang persisten. Tanaman legum yang menghasilkan nodul determinate (legum tropis dan subtropis) adalah kacang kedelai, kacang tanah, dan teratai. Sedangkan nodul indeterminate berbentuk silindris, tumbuh dari perisikel dan sel kortek bagian dalam akar dan terdiri dari meristem terminal yang persisten. Sedangkan tanaman legum yang menghasilkan nodul indeterminate (legum daerah temperate/beriklim sedang) adalah alfalfa (*Medicago sativa*), semanggi, dan kacang polong.

Flavonoid berperan penting selama proses nodulasi, setelah Rhizobium masuk ke dalam akar. Ada 2 kemungkinan peranan flavonoid, (a) menghambat transport auksin pada daerah infeksi Rhizobium, (b) menginduksi biosintesis sinyal Nod Rhizobium. Tidak adanya flavonoid pada pembentukan nodul indeterminate tanaman *Medicago truncatula* menghambat transport auksin pada daerah infeksi dan secara signifikan menghambat pembentukan nodul. Sedangkan tidak adanya isoflavonoid pada pembentukan nodul determinate tanaman kedelai (*Soy beans*) juga menghambat baik transport auksin dan terbentuknya nodul (gambar 3).

Namun demikian, percobaan nodulasi pada akar kedelai yang kekurangan isoflavon menggunakan sel *Rhizobium* yang hipersensitif terhadap isoflavon, menunjukkan bahwa isoflavon berperan dalam biosintesis sinyal Nod tapi tidak menghambat transport auksin. Secara konsisten, selama pembentukan nodul indeterminate, flavonoid mengatur terjadinya penghambatan transport auksin pada daerah infeksi. Sedangkan selama pembentukan nodul determinate tidak ada penghambatan transport auksin secara signifikan.



Gambar 3. Inisiasi nodul determinate dan nodul indeterminate (Subramanian dkk, 2007).

Kesuksesan nodulasi terjadi pada kondisi terbatasnya nitrogen. Walaupun pada kondisi optimal, kebanyakan jalur infeksi terjadi pada lapisan sel hipodermal akar dan jumlah nodul yang terbentuk dibatasi oleh tanaman itu sendiri. Beberapa kondisi lingkungan merupakan faktor pembatas untuk pertumbuhan dan aktivitas tanaman untuk memfiksasi N_2 . Pada simbiosis legum-*Rhizobium*, proses fiksasi nitrogen sangat berhubungan dengan fisiologi tanaman inang. Tipikal cekaman lingkungan yang biasa dihadapi oleh nodul legum dan partner *rhizobium*-nya adalah kekeringan, salinitas, suhu, logam berat, hilangnya fotosintat dan nitar tanah. Satu faktor cekaman lingkungan yang muncul dapat mempengaruhi laju fotosintesis dan secara langsung berpengaruh terhadap metabolisme nodul. Suhu tanah yang tinggi pada daerah tropis dan subtropis, mempengaruhi biological nitrogen fixation (BNF) pada tanaman legum. Suhu tanah yang tinggi mempengaruhi infeksi bakteri dan fiksasi N_2 pada beberapa jenis tanaman legum, seperti kedelai, kacang tanah, dan buncis. Nodulasi dan symbiotic nitrogen fixation (SNF) tergantung dari strain bakteri dan jenis tanaman legum. Suhu berpengaruh terhadap infeksi rambut akar, diferensiasi bakteroid, struktur nodul, dan

fungsi nodul akar legum (Zahran, 1999). Suhu tanah yang rendah menurunkan nodulasi dan laju fiksasi N₂ (Duke dkk, 1979).

Kesimpulan

Asosiasi simbiotik antara legum-Rhizobium membentuk organ nodul pada akar yang berperan sebagai symbiotic nitrogen fixation (SNF). Pada SNF terdapat bakteroid yang sangat sensitif terhadap gangguan metabolik dan lingkungan seperti, cekaman kekeringan suhu, salinitas, logam berat dan nitrat tanah. Pembentukan nodul akar dikontrol oleh sinyal molekuler bakteri ekstraseluler yaitu faktor nod yang akan dikenali oleh tanaman inang. Komunikasi awal antara legum-Rhizobium terjadi karena adanya pertukaran sinyal yaitu sinyal flavonoid spesifik yang diproduksi tanaman legum dan respon balik dari Rhizobium dengan memproduksi sinyal baru berupa lipo-chitooligosaccharide (LCO: sinyal Nod). Tipe nodulasi yang terbentuk bersifat spesifik tergantung dari tanaman inang.

Saran

Keberhasilan nodulasi pada asosiasi simbiotik legum-Rhizobium dipengaruhi oleh karakter masing-masing tanaman legum dan strain Rhizobium. Selain itu spesifitas gen dan faktor lingkungan juga mempengaruhi mekanisme nodulasi. Faktor-faktor di atas perlu diperhatikan untuk keberhasilan pembentukan nodul dan kemampuannya memfiksasi N₂ secara optimal.

Daftar Pustaka

- Balachandar,D., P.Raja.,K.Kumar., and SP.Sundaram. 2007. *Non-rhizobial nodulation in legumes*.Biotechnol.Mol.Biol.2(2):049-057.
- Burdass,D.2002. *Rhizobium, root nodules and nitrogen fixation*.
www.microbiologyonline.org.uk.
- Duke, S.H., LE. Schrader, CA.Henson., JC. Servaites., RD. Vogelzang., JW. Pendleton. 1979. *Low root temperature effects on Soybean Nitrogen Metabolism and Photosynthesis*. Plant Physiol.63:956-962.
- Ott, H., Joost, T.V.D., Catrin,G., Lene,K., Guilhem, D., Helene,V., Vivien, B., Tomasz, C., Peter, G., Michael, K.U. 2005. *Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant Growth and development*.Elsevier.15:531-535

- Philippus D.R., V. Heerden., G. Kiddle., TK. Pellny.,PW. Mokwala., A Jordaan., AJ. Strauss.,MD. Beer.,U. Schluter., KJ. Kunert and CH. Foyer. 2008. ***Regulation of Respiration and the oxygen diffusion barrier in soybean protect symbiotic nitrogen fixation from chilling-induced inhibition and shoots from premature senescence.*** Plant physiol. **148**:316-327.
- Stougaard, J. 2000. ***Regulators and regulation of legume root nodule development.*** Plant Physiol. **124**: 531-540.
- Subramanian, S., G. Stacey and Oliver Yu.2007. ***Distinct, crucial roles of flavonoid during legume nodulation.*** Plant science.**12**:7.
- Zahran, H.H. 1999. ***Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate.*** Micribiol.Mol.Biol.Rev. **63**:4.