



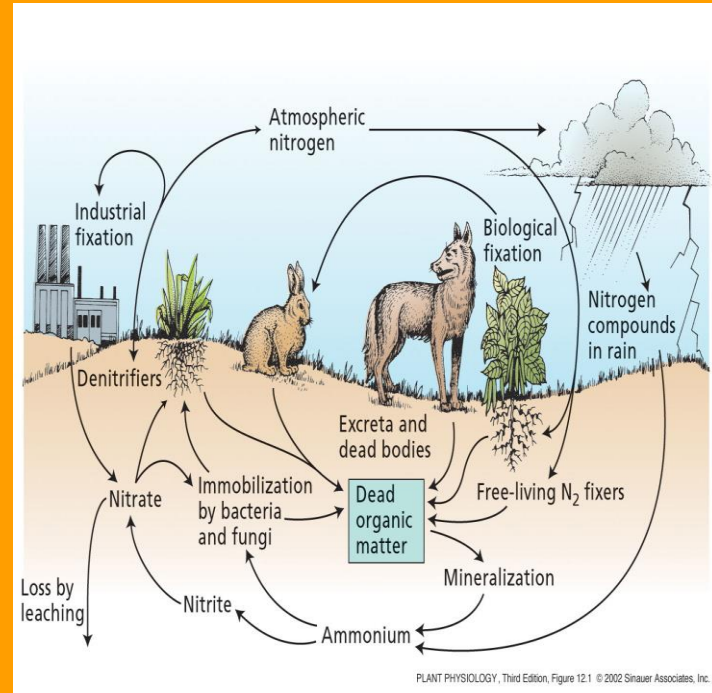
BAKTERI PENAMBAT NITROGEN (BPN) ***(BNF/Bacterial Nitrogen Fixation)***

Hanna Artuti

Nitrogen di Lingkungan

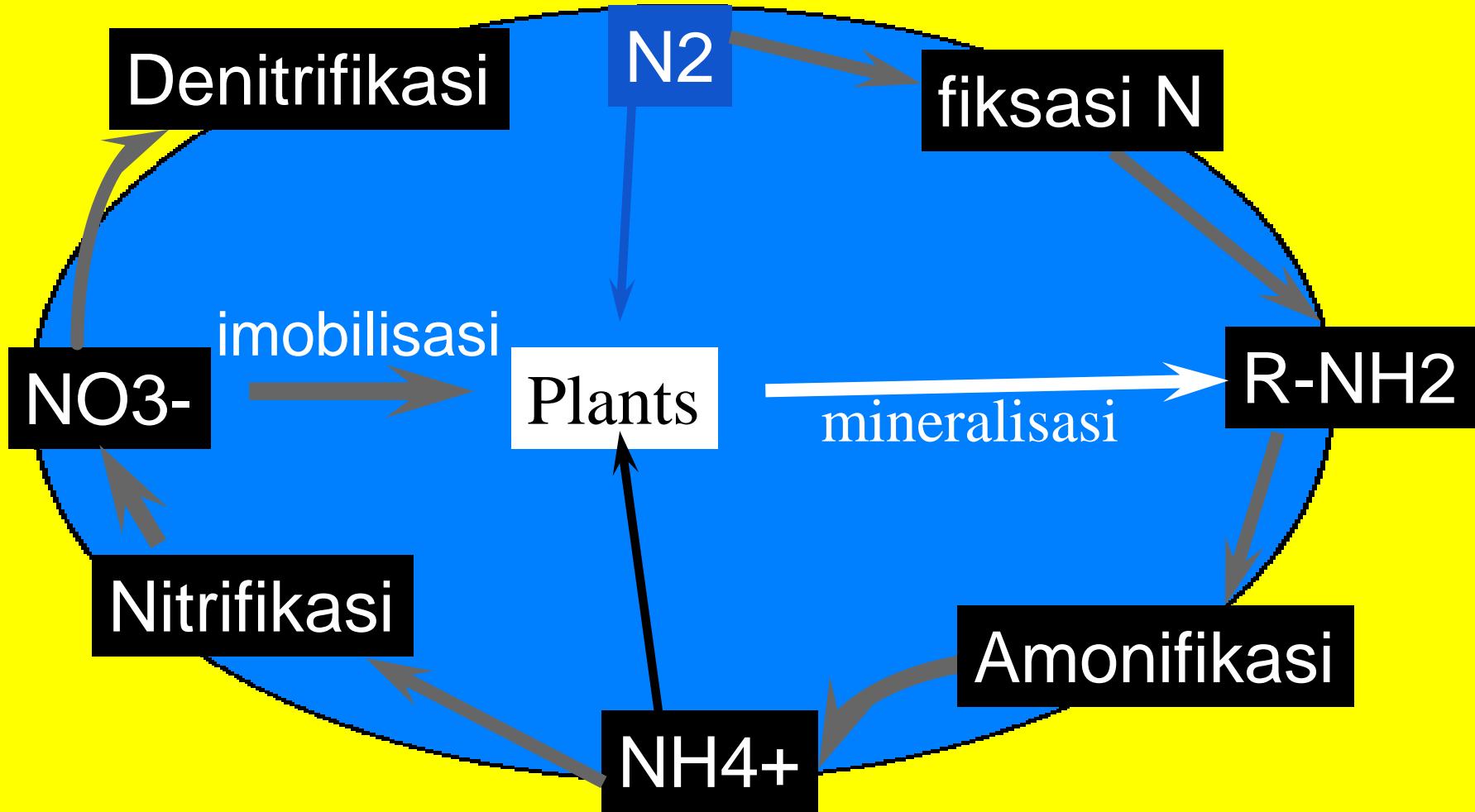
Secara alami umumnya terjadi oleh:

- ✓ **Petir (8%)**
- ✓ **Reaksi Fotokimia:**
2%: reaksi fotokimia antara gas NO dan $O_3 \rightarrow HNO_3$
- ✓ **Fiksasi Nitrogen:**
90%: bakteri – melalui proses biologi $\rightarrow N_2$ menjadi ammonium (NH_4^+)



Pentingnya Nitrogen pada Tanaman







MANFAAT BPN

- Menambat nitrogen (N_2) dr udara, di mana :
 - nitrogen udara $\pm 80\%$
 - nitrogen tanah $\pm 20\%$
- Membantu tanaman dalam memperoleh unsur N melalui hubungan **simbiotik** (bintil akar) dan **non-simbiotik** (hidup bebas di tanah)
- Membantu penambahan unsur N dalam media tanah (pupuk hayati)

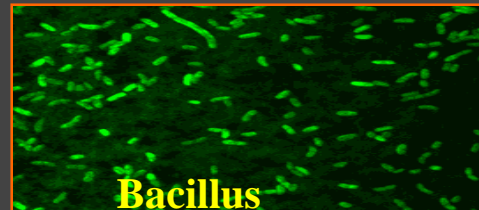
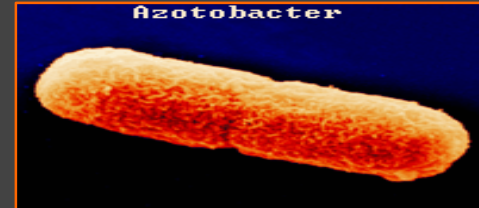
JENIS BPN

1) Non-Simbiotik (hidup bebas) :

- *Azotobacter* (aerobik)
- *Azospirillum* (aerobik)
- *Clostridium* (anaerobik)
- *Bacillus* (anaerobik)

→ Tidak membentuk bintil pd akar tanaman

“





2) Bakteri simbiotik

- Bakteri kelompok Rhizobia
- Tanaman inang: legume dgn sub-famili *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae*, *Papilionoideae*
(terdiri dari 700 genera, dan 19.700 species)
- Sebagian besar membentuk bintil pada akar tanaman inang

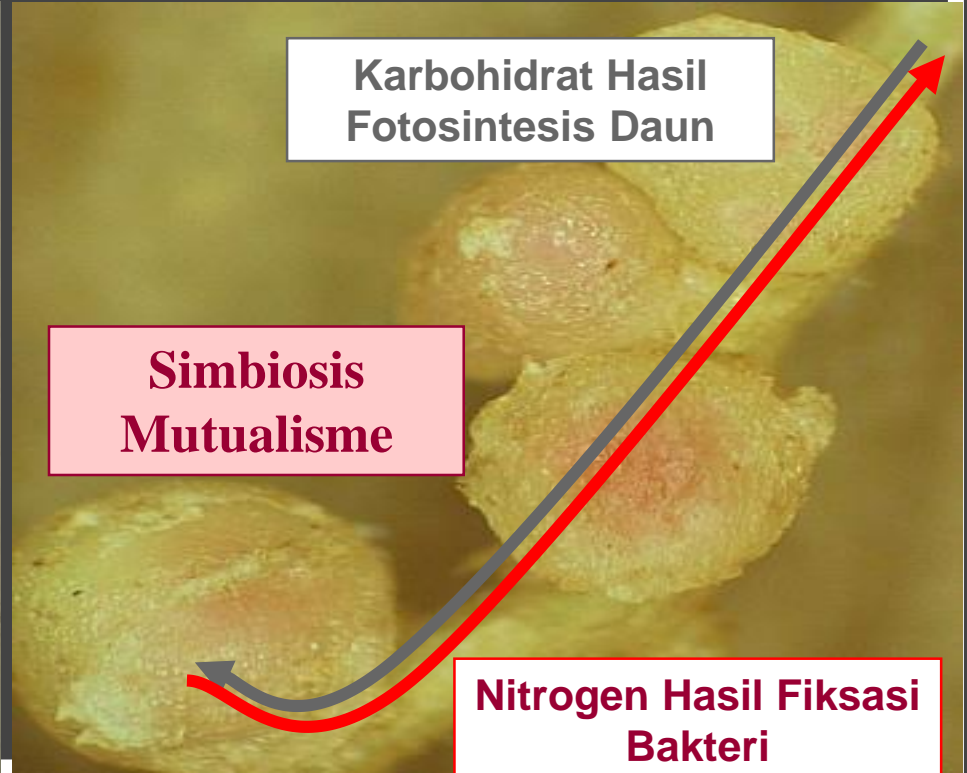
Taksonomi Rhizobia

Genus	Species	Host plant
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (clovers)
	“ <i>bv. viciae</i>	<i>Pisum</i> (peas), <i>Vicia</i> (field beans), <i>Lens</i> (lentils), <i>Lathyrus</i>
	“ <i>bv. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> (bean)
	<i>tropici</i>	<i>Phaseolus</i> (bean), <i>Leucaena</i>
	<i>etli</i>	<i>Phaseolus</i> (bean)
<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>	<i>Melilotus</i> (sweetclover), <i>Medicago</i>
	<i>fredii</i>	(alfalfa), <i>Trigonella</i>
	<i>saheli</i>	<i>Glycine</i> (soybean)
	<i>teranga</i>	<i>Sesbania</i> <i>Sesbania</i> , <i>Acacia</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	<i>Glycine</i> (soybean)
	<i>elkanii</i>	<i>Glycine</i> (soybean)
	<i>liaoningense</i>	<i>Glycine</i> (soybean)
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> (stem nodule)
‘ <i>Meso rhizobium</i> ’	<i>loti</i>	<i>Lotus</i> (trefoil)
	<i>huakuii</i>	<i>Astragalus</i> (milkvetch)
	<i>ciceri</i>	<i>Cicer</i> (chickpea)
	<i>tianshanense</i>	
	<i>mediterraneum</i>	<i>Cicer</i> (chickpea)
[<i>Rhizobium</i>]	<i>galegae</i>	<i>Galega</i> (goat’s rue), <i>Leucaena</i>
<i>Photorhizobium</i>	<i>spp.</i>	<i>Aeschynomene</i> (stem nodule)

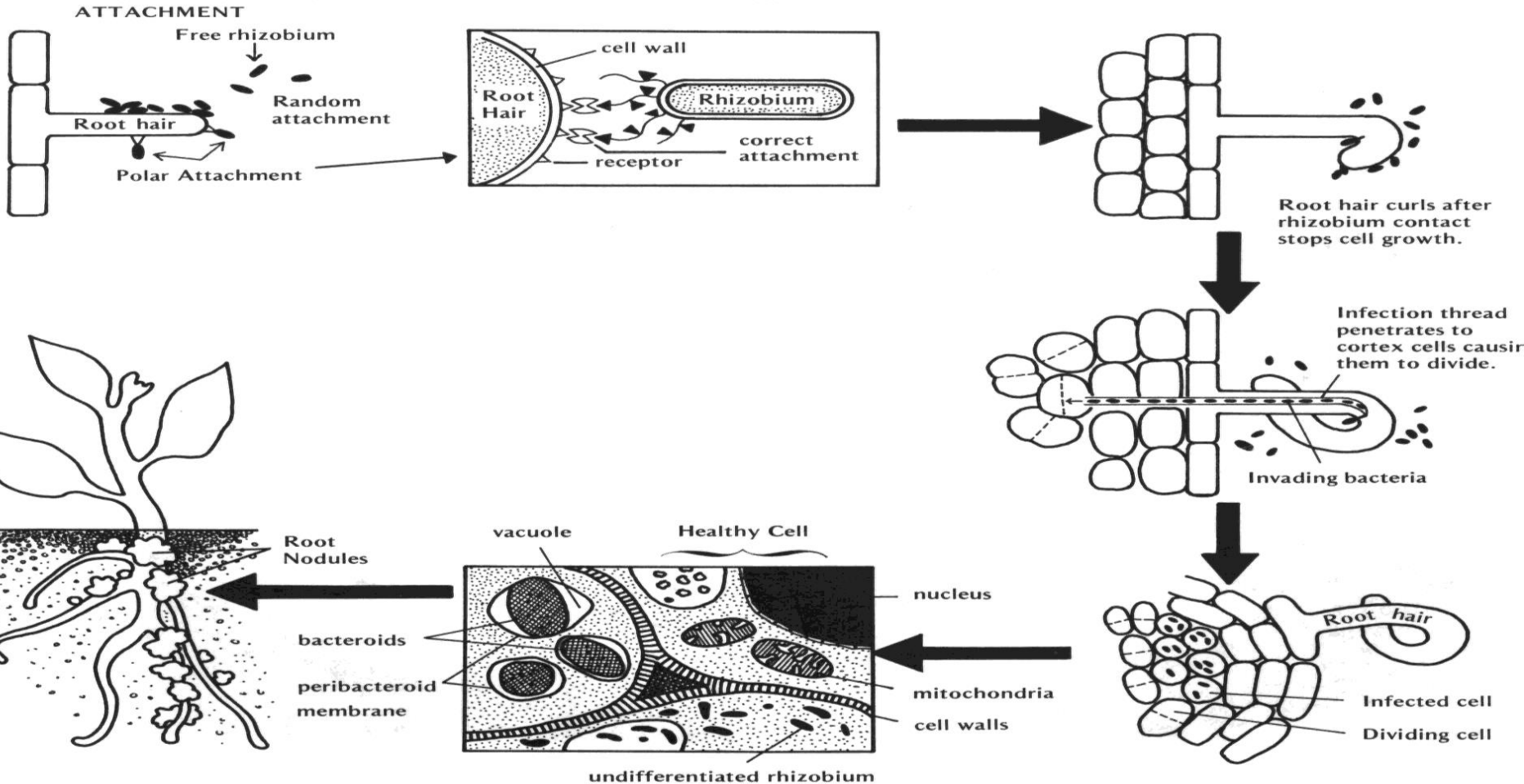
Bentuk Bintil Akar (Proses Simbiosis Mutualisme)



Bintil akar (nodule)



PROSES PEMBENTUKAN BINTIL AKAR

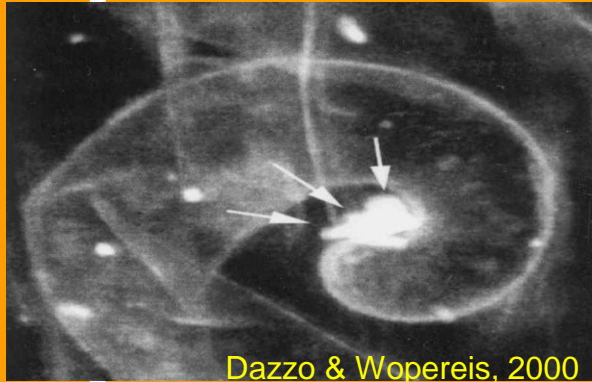


Rhizobium



Proses infeksi dan pembentukan bintil

Bintil akar Alfalfa



Rambut akar meengkung dikelilingi rhizobia

Michael Russelle - USDA-ARS Plant Science Research Unit

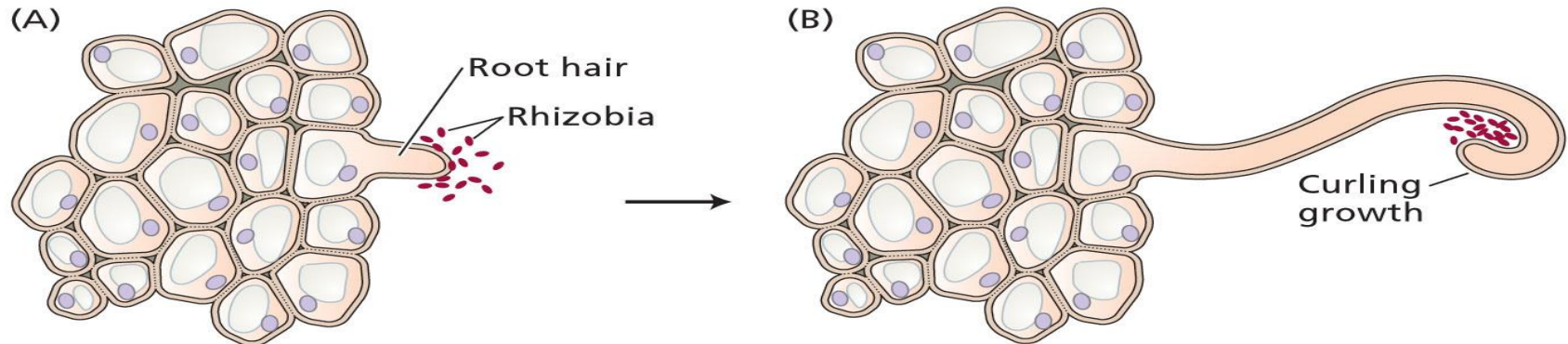


M. Barnett

Rhizobia menghasilkan benang-benang infeksi

PROSES INFEKSI DAN PEMBENTUKAN BINTIL AKAR

- Selama pembentukan awal bintil akar, 2 proses terjadi secara simultan, yaitu: **Infeksi** and **Organogenesis bintil**
 - (A)** Rhizobia menyerang rambut akar dan melepaskan faktor *gen-nod* yang menyebabkan sel² rambut akar melengkung
 - (B)** Dalam rambut akar yg melengkung, rhizobia melemahkan dinding sel akar kemudian masuk ke dalam membran plasma tanaman.



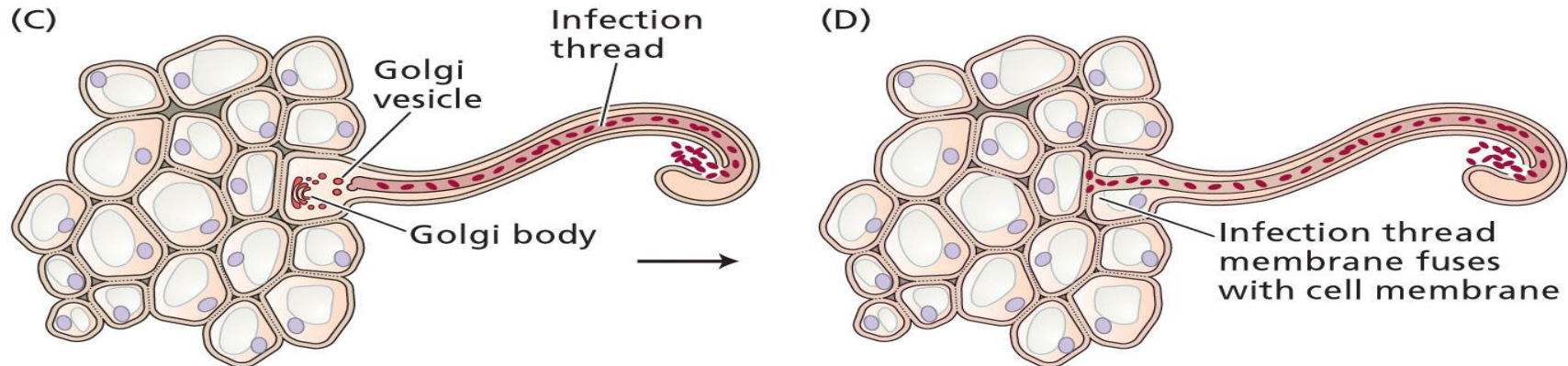
PROSES INFEKSI DAN PEMBENTUKAN BINTIL AKAR

(C) Terjadi pembentukan saluran infeksi

Material infeksi disimpan di ujung saluran dalam aparat Golgi. Degradasi dinding sel rambut akar secara lokal juga terjadi di sini.

(D) Infeksi mencapai ujung sel, dan menyerang membran plasma kemudian menyatukannya dengan membran sel rambut akar

Selanjutnya, sel² bakteri masuk ke dalam membran plasma.



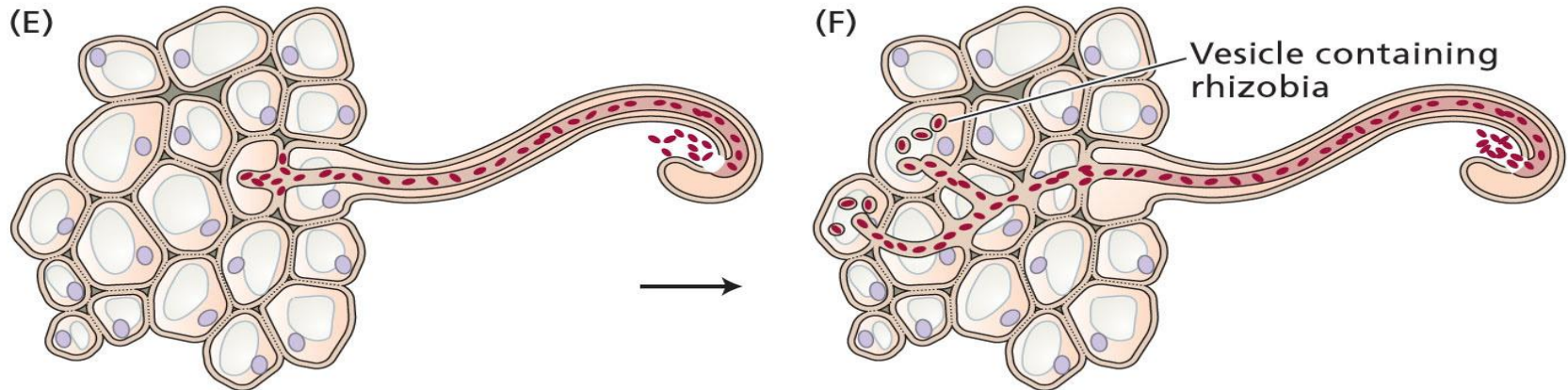
PROSES INFEKSI DAN PEMBENTUKAN BINTIL AKAR

(E) Rhizobia menembus apoplast dan masuk ke dalam lamella tengah,

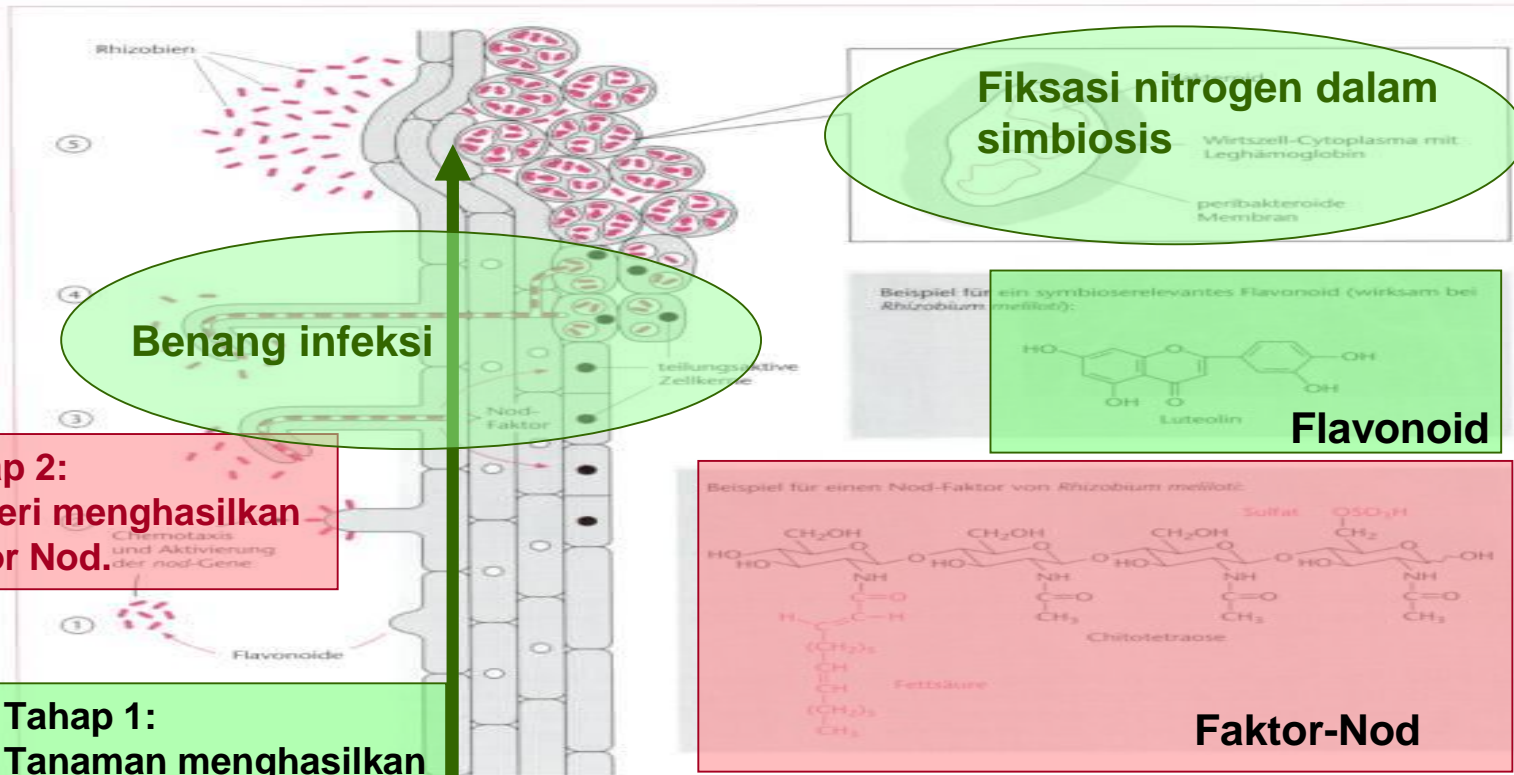
(F) Infeksi meluas dan bercabang² sampai mencapai sel² target

Vesikel dari membran tanaman terisi oleh sel² bakteri dan mereka akan masuk ke dalam sitoplasma

Terbentuklah bintil akar



Simbiosis Legum - Rizobia

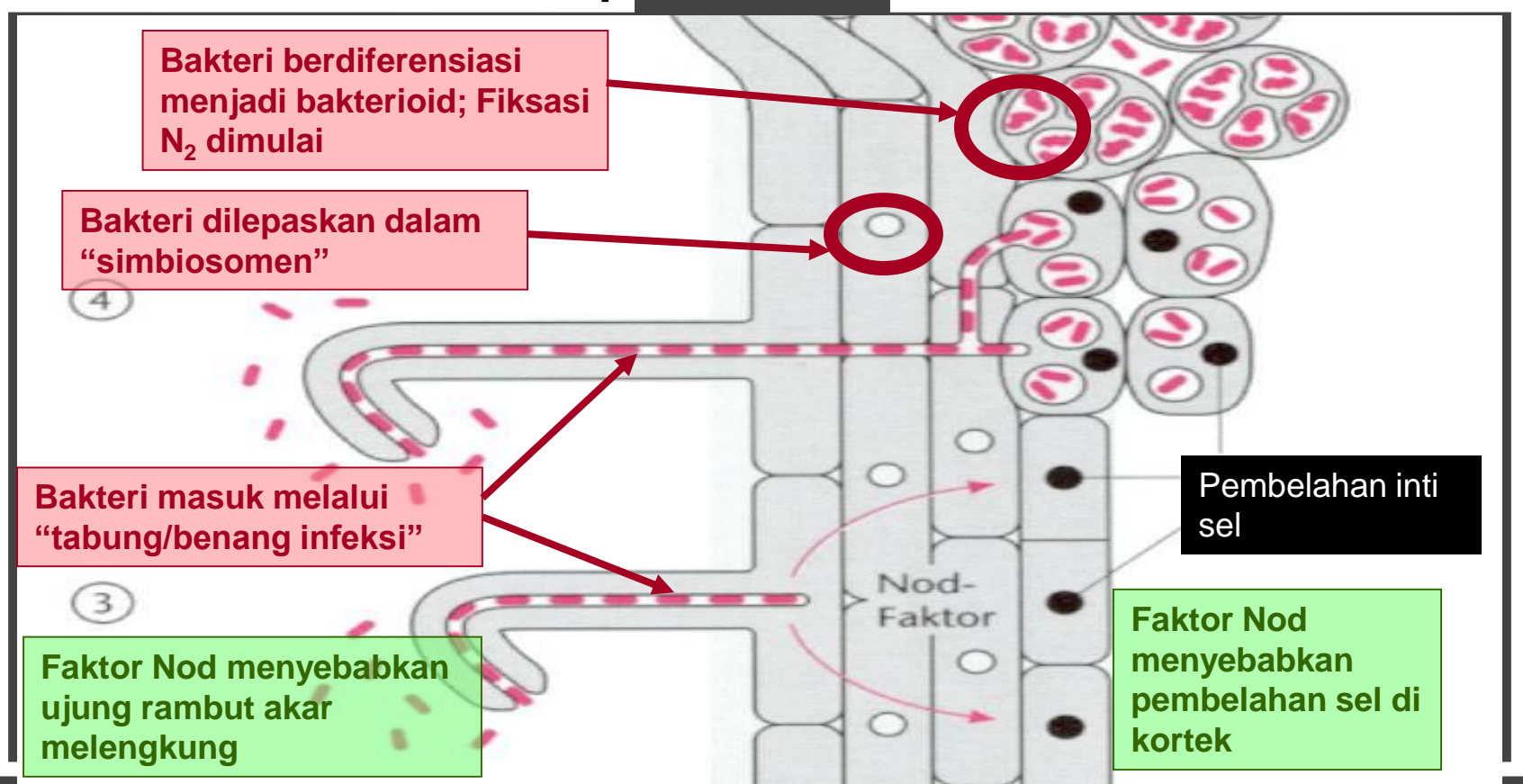


Tahap 2:
Bakteri menghasilkan faktor Nod.

Tahap 1:
Tanaman menghasilkan flavonoid

Perkembangan Nodul

Proses pembentukan bintil akar



Bakteri berdiferensiasi menjadi bakterioid; Fiksasi N₂ dimulai

Bakteri dilepaskan dalam "symbiosomen"

Bakteri masuk melalui "tabung/benang infeksi"

Faktor Nod menyebabkan ujung rambut akar melengkung

Pembelahan inti sel

Faktor Nod menyebabkan pembelahan sel di kortek

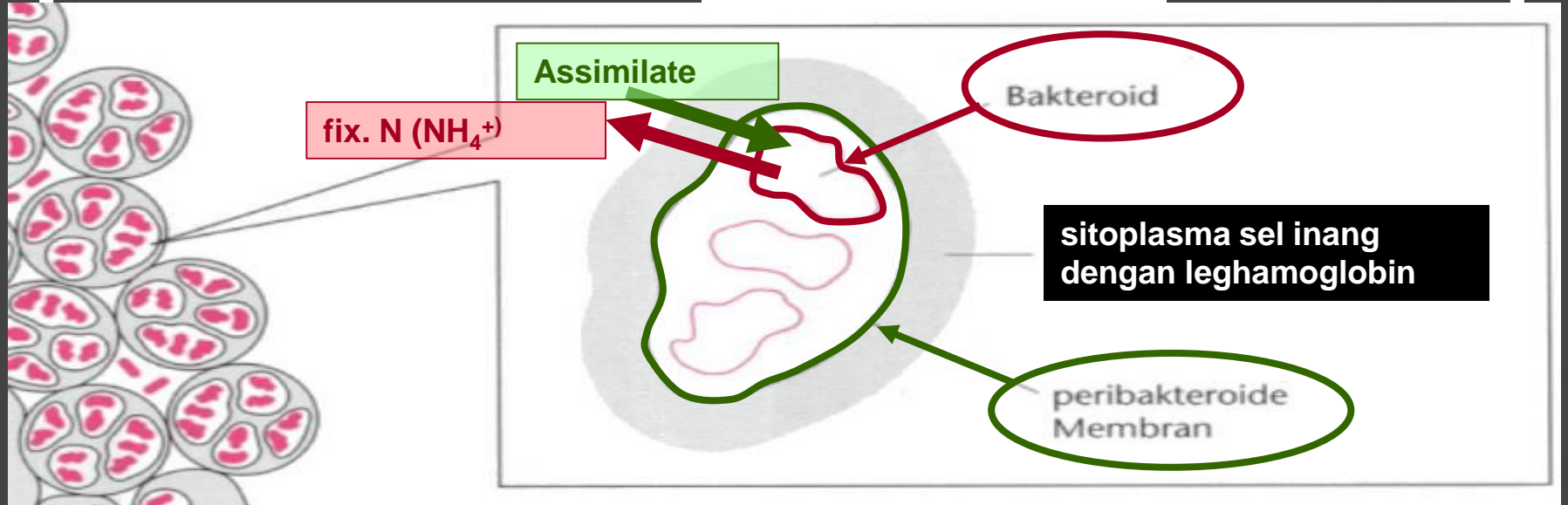
4

3

Nod-Faktor

Simbiosis bakteri

Bakteroid-Membran =
Membran bakteri

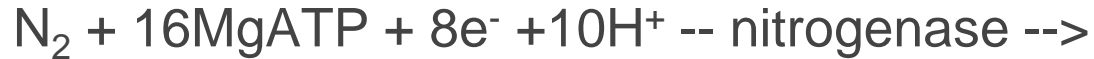


Peribakteroide-Membran =
Membran tanaman

PROSES FIKSASI N OLEH BAKTERI

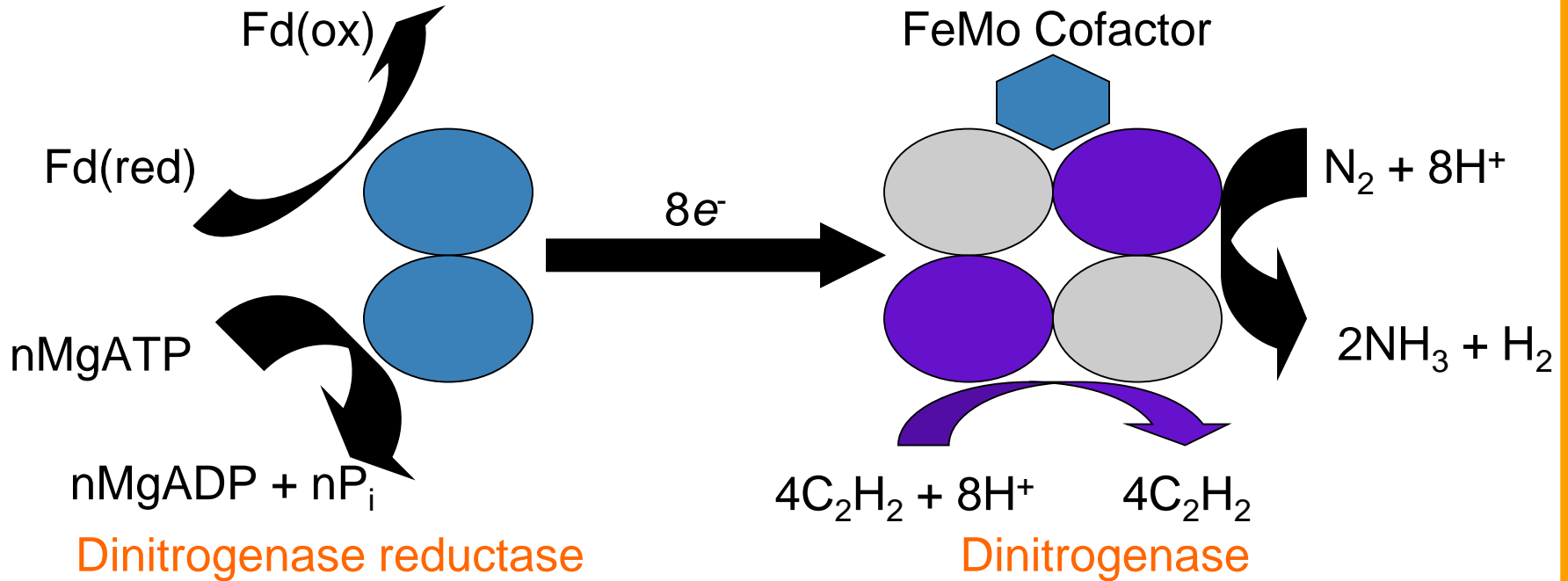
- Reduksi nitrogen (N_2) menjadi ammonia (NH_3)
- Mengubah bentuk nitrogen (N_2) yang melimpah, namun tidak tersedia secara biologis menjadi bentuk yang lebih tersedia secara biologis, NH_3 dan akhirnya, amino nitrogen $-NH_2$)
- Ikatan rangkap tiga yang sangat stabil yang menyebabkan dua atom nitrogen dalam dinitrogen terputus
- Energi dari karbohidrat yang diteruskan ke N_2 mereduksi menjadi NH_3
- Diperlukan banyak energi untuk memutus ikatan rangkap tiga

REAKSI FIKSASI



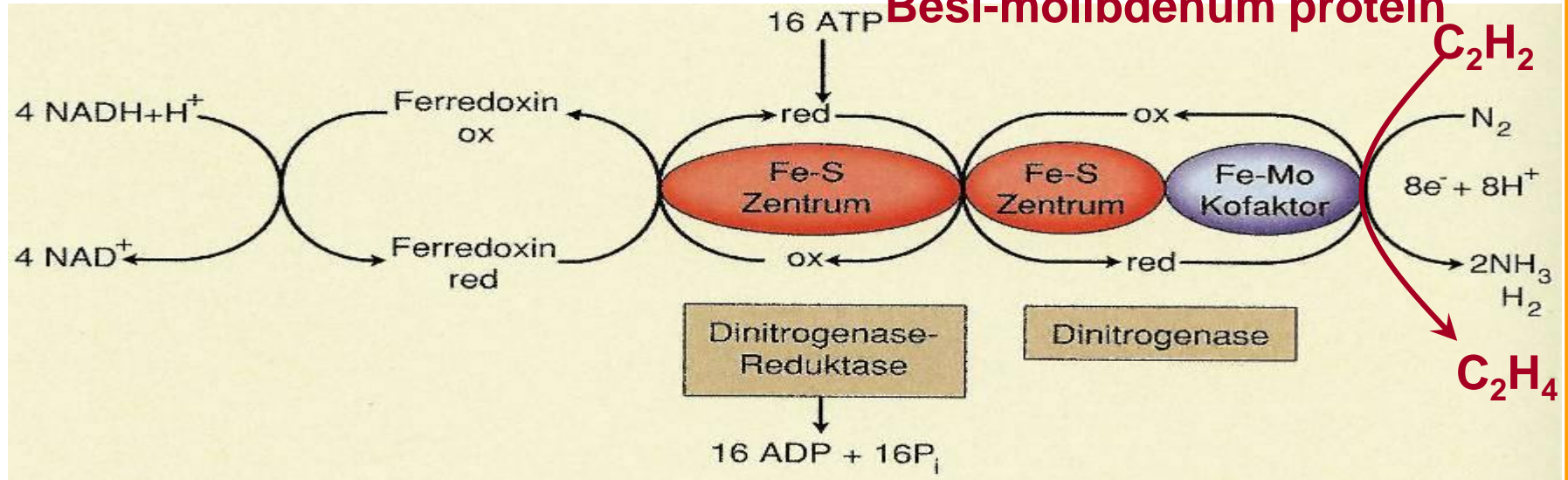
- 19-117 g karbohidrat-C untuk mengikat satu gram N_2
- Enzim nitrogenase melakukan reaksi di permukaan bagian dalam membran sel, yang tidak dapat diubah sifatnya oleh O_2 dan dengan demikian kondisi di lokasi fiksasi N harus anaerob
- Dikatalisasi secara eksklusif oleh prokariot
- Terbatas pada lingkungan di mana energi berlimpah.

Nitrogenase



Nitrogenase (I)

**Kompleks enzim
Protein besi dan
Besi-molibdenum protein**



- Enzim sensitif terhadap oksigen
- Pengeluaran energi yang besar

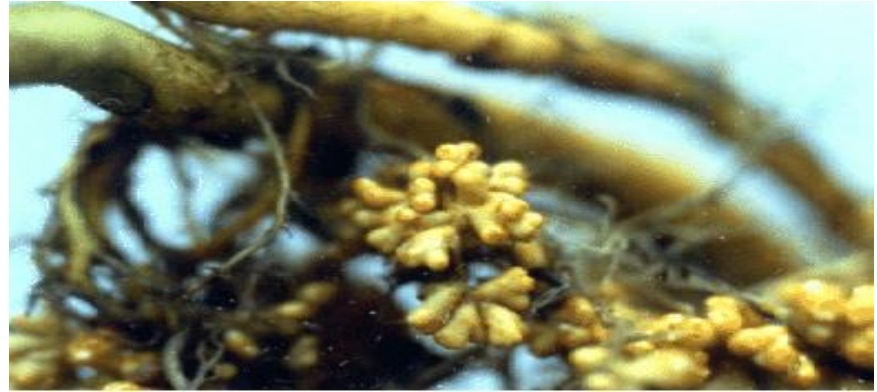
“

**PEMANFAATAN BPN UNTUK
PUPUK HAYATI**
**(Prinsip-prinsip Aplikasi Ilmu
Bioteknologi)**

(1) Eksplorasi Bakteri

Berupa:

- 1) Bintil akar
- 2) Rizosfer



(2) Sterilisasi

- Bahan
- Peralatan Lab. (basah dg autoclave dan kering dg oven)

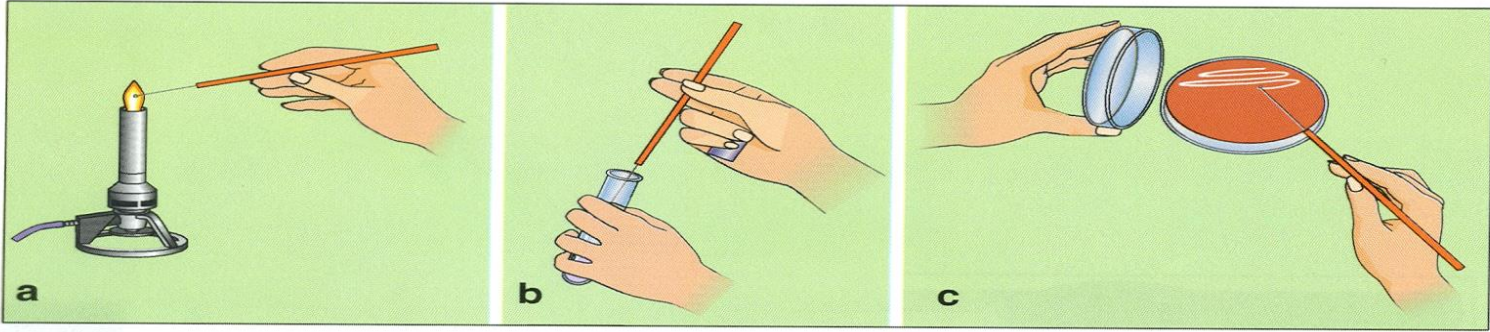
Beberapa Peralatan yang Diperlukan



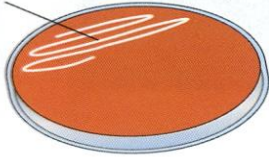
(3) Isolasi Bakteri

- Bakteri yang akan diisolasi biasanya terdapat dalam jumlah yang sangat banyak.
- Isolasi menggunakan media selektif YEMA (Yeast Extract Manitol Agar), dapat dilakukan dengan 2 cara:
 1. *Streak plate method*
 2. *Pour plate method*

Streak Plate



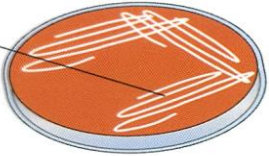
initial inoculum



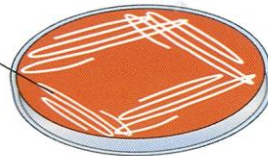
second set of streaks



third set of streaks

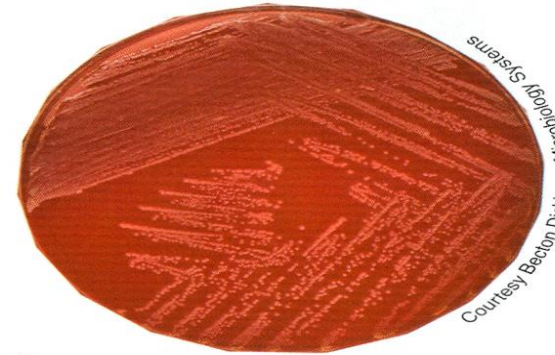


fourth set of streaks



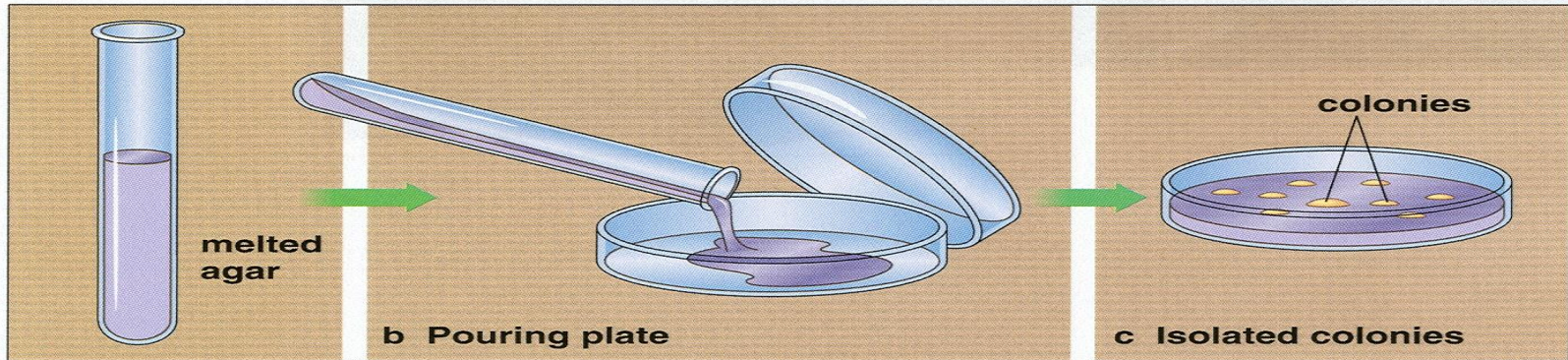
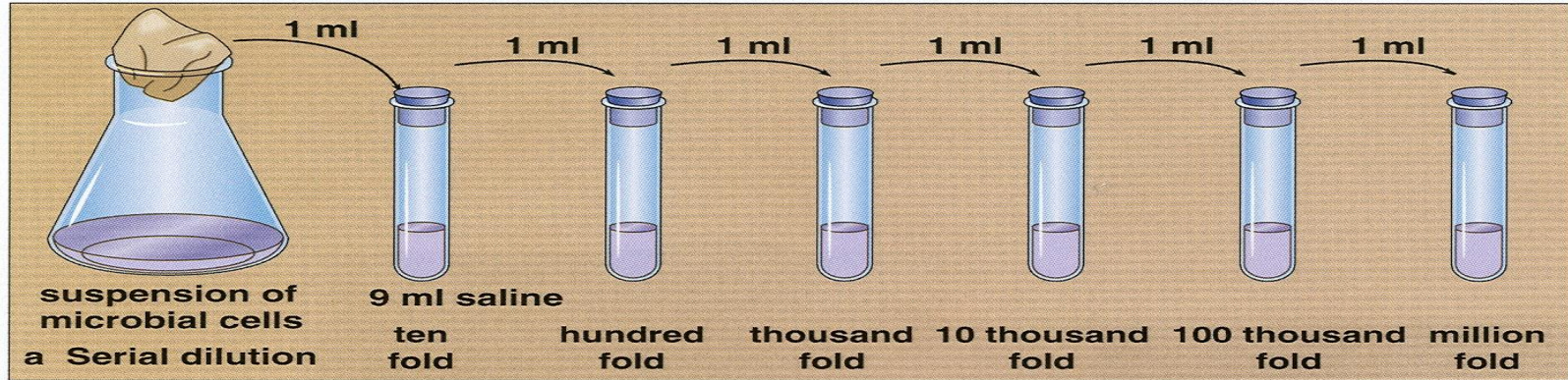
d

e



Courtesy Becton Dickinson Systems

Pour Plate



Koloni Bakteri Hasil Isolasi



(4) Uji Fisiologis Bakteri Penambat Nitrogen

Karakterisasi BPN, meliputi :

- a) Uji Congo-red → Bakteri rhizobia tdk menyerap warna merah congo (koloni tetap bening/putih susu)
- b) Uji Bromthymol-Blue → Bakteri Rhizobia bereaksi asam (koloni berwarna kuning)
- c) Uji Nitrogenase → Bakteri rhizobia memiliki enzim nitrogenase

Uji Autentikasi BPN:

- Untuk membuktikan bahwa bakteri rhizobia hasil isolasi benar2 mampu menghasilkan bintil akar setelah diinokulasikan kembali pada tanaman legum di media buatan (Nutrient-agar) atau media zeolit → secara laboratoris
- Dapat juga mengukur besarnya kemampuan bakteri dalam menyediakan nitrogen tersedia bagi tanaman (hasil aktivitas enzim nitrogenase)

Uji-uji yang Lain:

- **Uji Efektivitas** → di rumah kaca/kasa dan di lapangan menggunakan tanaman inang legum
- **Uji Media carrier** (pembawa/penyimpanan) → diperbanyak dan diproduksi sebagai pupuk hayati

TERIMA KASIH