

AKTIVITAS NITROGENASE BINTIL AKAR DAN KADAR KLOOROFIL DAUN KACANG HIJAU (*Phaseolus radiatus* L.) PADABERBAGAIJENIS DAN KADAR ASAM FENOLAT¹

[Nitrogenases Activities in Nodules and Chlorophyll Content of Mungbean
(*Phaseolus radiatus* L.) on Various Phenolic Acids Concentration]

A Wahid Rauf

Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Papua

Jin Yahim Sentani, Tip. (0967) 592179, PO Box 256 - Sentani, Jayapura, Papua

e-mail: whdrauf@yahoo.com

ABSTRACT

Phenolic acids are one of the many secondary metabolites causing toxic upon the growth and development of plant. Phenolic acids are produced by plant and subsequently released into soil, and appears to be involved in biochemical interaction between plants and other living organisms in soil. The research was conducted to study the effect of various kinds and doses of phenolic acids on nitrogenases activities and chlorophyll content of mungbean. Research was done in the glass house of Soil Science Departemen, Faculty of Agriculture, Gadjah Mada University (GMU) from April to June 2004. The experiment was arranged by randomized block design in three replications. The treatment consist of four kinds phenolic acid i.e. vanilic, p-coumaric, ferulic and p-hydroxybenzoic with concentration at 250, 500, 1000 and 1500 mg kg⁻¹ respectively. One treatment was without phenolic acids as control. Result indicated that phenolic acids could reduce nitrogenases activities and chlorophyll content up to 53.35% and 29.98% respectively. The toxicity of p-hydroxybenzoic against both nitrogenases activities and chlorophyll content was higher than other phenolic acids.

Kata Kunci: Aktivitas nitrogenase, bintil akar, klorofil, asam fenolat, kacang hijau, *Phaseolus radiatus* L.

PENDAHULUAN

Senyawa fenolat merupakan metabolit sekunder yang ditemukan pada tumbuh-tumbuhan dan cukup mendapat perhatian karena peranannya sebagai regulator dalam sistem ekologi tumbuhan (Siqueira *et al*, 1991). Senyawa fenolat juga banyak ditemukan pada tanah-tanah yang mengandung residu tanaman (Inderjit dan Olofsson, 1998). Penyebarannya sangat luas dalam jaringan tumbuhan apabila tidak terikat dengan senyawa lain (Harborne, 1989), serta mengakibatkan pertumbuhan beberapa spesies tanaman terganggu utamanya pada proses perkecambah (Chon *et al*, 2004).

Secara kimia senyawa fenolat dapat didefinisikan sebagai senyawa kimia yang memiliki cincin aromatik yang bergandengan dengan gugus hidroksil, termasuk derivat-derivat fungsionalnya seperti ester, metil eter, glikosida dan sebagainya (Souto, *et al*, 2001). Selanjutnya dikemukakan pula bahwa di antaranya banyak yang memiliki dua atau lebih gugus hidroksil yang merupakan turunan dari salah satu dihidrat atau fenol trihidrat. Senyawa fenolat memiliki bobot molekul rendah, khususnya p-hidroksibenzoat, vanilat, p-kumarat, dan ferulat dan

tersebar luas dalam tanah tidak dalam bentuk ikatan kimia (Hartley dan Whitehead, 1985).

Senyawa fenolat diyakini berfungsi sebagai agen pengendali pertahanan dari serangan atau gangguan organisme pengganggu tanaman serta sebagai penanda pada interaksi tanaman dengan patogen dan mikroba mutualistik (Dalton, 1999). Ditemukan pula bahwa senyawa fenolat pada kadar millimolar bersifat racun pada beberapa spesies tumbuhan. Senyawa fenolat yang bersifat racun termasuk dalam senyawa yang berinteraksi alelopati pada ekosistem alam dan ekosistem pertanian (Whitehead *et al*, 1981, 1982, 1983; Rice, 1984; Inderjit, 1996).

Asam fenolat dapat berperan sebagai pembentuk senyawa humat, yang dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman dan aktivitas mikroba tanah (Hartley dan Whitehead, 1985). Selanjutnya dikemukakan pula bahwa asam fenolat khususnya p-hidroksibenzoat dan ferulat dapat menekan pertumbuhan bakteri *Rhizobium*. Senyawa tersebut dapat pula menyebabkan terhambatnya aktivitas dehidrogenase dan mengurangi kadar klorofil daun seledri (Sampietro *et al*, 2005).

'Diterima: 25 April 2008 - Disetujui: 22 Agustus 2008

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa asam fenolat dapat pula berpengaruh terhadap hara dalam tanah (Booker *et al.*, 1992), aktivitas enzim (Devi dan Prasad, 1992), fotosintesis dan respirasi tanaman (Hejl *et al.*, 1993). Menurunnya aktivitas fotosintesis dapat berkaitan dengan perubahan kadar klorofil daun. Selanjutnya kadar klorofil daun berhubungan erat dengan produksi tanaman.

Menurunnya klorofil dalam daun akan mempengaruhi fotosintesis bersih dan secara langsung menyebabkan menurunnya pertumbuhan tanaman, sehingga berpengaruh terhadap transport karbohidrat dari daun ke bintil akar. Fotosintat tersebut umumnya dalam bentuk sukrosa yang dapat merupakan sumber makanan bagi bakteroid, energi dan reduktan bagi enzim nitrogenase untuk fiksasi amonia (Chopra *et al.*, 1998). Terganggunya aktivitas enzim utamanya enzim nitrogenase dalam bintil akar akan mempengaruhi aktivitas fiksasi nitrogen dari udara melalui bintil akar. Penelitian ini dilaksanakan untuk mempelajari pengaruh lima jenis senyawa fenolat pada berbagai kadar terhadap aktivitas enzim nitrogenase pada bintil akar dan kadar klorofil pada daun kacang hijau.

BAHANDANMETODE

Penelitian ini dilaksanakan di Rumah Kaca Jurusan Tanah, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta yang berlangsung pada April sampai Juni 2004. Senyawa fenolat standar yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam vanilat, asam *p*-kumarat, asam ferulat, dan asam *p*-hidroksibenzoat. Senyawa tersebut diperoleh dari Sigma-Aldrich Co., StXouis, Mo, USA.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok dengan tiga ulangan. Adapun perlakuan percobaan terdiri atas macam asam fenolat yaitu asam vanilat, asam *p*-kumarat, asam ferulat, asam *p*-hidroksibenzoat dengan kadar masing-masing 250, 500, 1000, 1500 mg kg⁻¹. Satu perlakuan tanpa asam fenolat digunakan sebagai pembanding.

Tanah yang digunakan dalam percobaan ini terlebih dahulu dikering anginkan, selanjutnya ditumbuk dan disaring dengan saringan berdiameter 5 mm. Tanah sebanyak 6 kg dimasukkan ke dalam polybag, ditambahkan air sampai mencapai sekitar

kapasitas lapang. Penanaman dilakukan dengan 4 benih perlubang. Pemberian pupuk dilakukan saat tanaman berumur 1 minggu dengan takaran 50 kg Urea/ha, 100 kg SP 36/ha dan 75 kg KCl/ha yang setara dengan 0,15 gram urea, 0,30 gram SP36 dan 0,22 gram KCl per polybag (6 kg tanah).

Pemberian perlakuan asam fenolat dilaksanakan 3 kali, masing-masing pada awal penanaman, 15 hari setelah tanam (HST), dan 30 HST. Volume perlakuan kadar asam fenolat diberikan berdasarkan pada lengas tanah yang hilang akibat evapotranspirasi sampai mencapai bobot semula (bobot kapasitas lapang). Untuk mengetahui besarnya penyusutan lengas tanah digunakan metode gravimetrik, yaitu menimbang pot beserta tanaman kemudian dikurangi bobot pot semula pada saat kapasitas lapang.

Setelah tanaman berumur dua minggu dilakukan penjarangan dengan meninggalkan satu tanaman yang pertumbuhannya sehat. Selama pertumbuhan tanaman, kadar lengas tanah dipertahankan sekitar kapasitas lapang, dengan cara menambahkan air pada setiap pagi dan sore hari. Pengendalian terhadap serangan hama dan penyakit dilakukan dengan penyemprotan insektisida dan fungisida pada umur satu minggu setelah tanam, selanjutnya penyemprotan dilakukan tiap 10 hari sekali.

Variabel yang diamati dalam percobaan ini adalah komponen bintil akar yang terdiri atas jumlah bintil, jumlah bintil efektif, bobot kering bintil, kemampuan simbiotik yang dapat ditentukan dengan sistem penaksiran berdasarkan nisbah jumlah bintil akar efektif dengan jumlah total bintil akar dikali seratus persen, luas daun pada umur 30 hari, dan aktivitas nitrogenase ditentukan dengan menggunakan metode "Aktivitas Reduksi Asetilen" (ARA) (Turner dan Gibson, 1980), dan penentuan jumlah klorofil dihitung berdasarkan metode Knudson *et al.* (1977).

Analisis statistik yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sidik ragam berdasarkan Rancangan Acak Kelompok dan analisis korelasi. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan dengan Duncan's Multiple Range Test pada tingkat ketelitian 5%, dan untuk melihat perbandingan dua nilai tengah diantara masing-masing perlakuan dilakukan uji kontras ortogonal.

HASIL

Pengaruh terhadap komponen bintil

Berdasarkan hasil perbandingan kontras ortogonal pada Tabel 1, menunjukkan bahwa jumlah bintil, jumlah bintil efektif, bobot kering bintil dan kemampuan simbiotik kacang hijau yang diberi asam fenolat nyata lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan kontrol (c1). Hal ini membuktikan bahwa keempat asam fenolat yang dicobakan pada berbagai kadar berpengaruh sangat nyata terhadap komponen bintil kacang hijau dibandingkan dengan kontrol. Hambatan pertumbuhan bintil yang diakibatkan oleh pemberian asam fenolat mencapai 59,23%.

Jumlah bintil dan jumlah bintil efektif pada perlakuan asam />-kumarat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan asam ferulat dan asam p-hidroksibenzoat (c6), akan tetapi tidak menunjukkan adanya perbedaan pengaruh terhadap bobot kering bintil, kemampuan simbiotik dan aktivitas nitrogenase. Perlakuan asam p-hidroksibenzoat secara nyata menghambat semua komponen pertumbuhan bintil akar, lebih tinggi dibandingkan dengan asam ferulat (c10).

Bobot kering bintil akar pada perlakuan asam fenolat nyata lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan kontrol (c1) (Tabel 1). Hal ini membuktikan bahwa asam fenolat menghambat penambahan bobot kering bintil akar kacang hijau. Asam p-hidroksibenzoat memiliki toksitas lebih tinggi dibandingkan dengan asam ferulat. Bobot kering bintil akar pada perlakuan asam ferulat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan bobot kering bintil akar pada perlakuan asam p-hidroksibenzoat.

Bobot kering bintil akar pada perlakuan kadar 250 mg kg⁻¹ asam p-hidroksibenzoat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan bobot kering bintil akar pada kadar 500,1000, dan 1500 mg kg⁻¹. Laju penurunan yang diakibatkan oleh asam p-hidroksibenzoat mulai terjadi pada kadar 250 mg kg⁻¹, dan penurunan bobot kering bintil yang diakibatkan oleh asam vanilat mulai terjadi pada kadar 500 mg kg⁻¹. Asam p-kumarat dan ferulat menyebabkan penurunan bobot kering bintil tertinggi terjadi pada kadar 1000 mg kg⁻¹ (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa toksitas dari masing-masing asam fenolat terhadap bobot kering bintil akar

Tabel 1. Rata-rata hasil kontras ortogonal asam fenolat terhadap komponen bintil, kemampuan simbiotik dan aktivitas nitrogenase bintil akar.

Pern banding Ortogonal	JB (bintil tan ⁿ¹)	JBE (bintil tan ⁿ¹)	BKB (gtarr ¹)	KS (%)	AN (nMg ⁻¹ janV ¹)
Ci=AvsB...Q	20,77-6,61**	6,44-2,40**	0,373-0,175**	46,90-30,52**	2,98-1,39**
C ₂ =B...EvsF...Q	5,96-6,83 tn	1,71-2,63**	0,188-0,170tn	26,21 -2735tn	1,50-1,36tn
C ₃ =BvsC...E	17,21-2,22**	5,88-0,33**	0,341-0,170*	48,22-18^5**	2,72-1,10*
C ₄ =CvsD,E	3,66-1,49*	0,55-0,22 tn	0,050-0,18 ltn	35,21-9,69**	0,39-1,45tn
C ₅ =D vs E	2,44-0,5 5tn	0,33-0, 11tn	0,082-0,80*	12,99-6,45 tn	0,65-2,24*
C<pF...IvsJ...Q	7,44-5,52**	3,30-2,30**	0,271-0,147tn	31,23-28,27tn	1,73-1,17tn
CT=FVSG...I	20,49-5,77**	5,55-2,55**	0,380-0,163**	39,04-2829tn	3,04-1,30**
C ₈ =G vs H,I	15,66-0,83**	5,88-0,88**	0,304-0,093*	40,24-22,77*	2,43-0,74*
C ₉ =H vs I	0,99-0,66tn	1,55-0,22**	0,129-0,05 6tn	34,86-10,87**	1,03-0,44tn
CKI=J...MvsN...Q	6304,75**	3,16-1,44***	0,211-0,082**	39,87-19,85**	1,69-0,65**
Cn=JvsK...M	15,21-3,33**	5,55-2,36**	0,363-0,161*	44,87-38,00tn	2,90-1,28*
Ci2=KvsL,M	6,88-1,55**	5,66-0,71 **	0,340-0,071**	48,21-3,61*	2,71-0,57**
Ci3=L vs M	1,77-U3tn	0,99-0,44 tn	0,086-0,05 7tn	37,01-283 ltn	0,68-0,45tn
Ci ₄ =NvsO...Q	13,33-1,88**	4,44-0,44**	0,231-0,032*	40,52-14,00**	1,84-0,25*
Cn=OvsP,Q	2,66-133tn	0,55-0,33 tn	0,057-0,014tn	36,43-2,32**	0,45-0, 11tn
Ci ₆ =PvsQ	1,66-133tn	0,44-0,33 tn	0,025-0,014tn	39,30-27,22m	0,20-0, 11tn
KK (%)	10,80	13,14	22,54	10,69	11,12

JB = Jumlah bintil, JBE = Jumlah bintil efektif, BKB = Bobot kering bintil, KS = Kemampuan simbiotik, AN = Aktivitas nitrogenase, tn = tidak berbeda nyata, * = berbeda nyata, ** = berbeda sangat nyata.

A = Kontrol

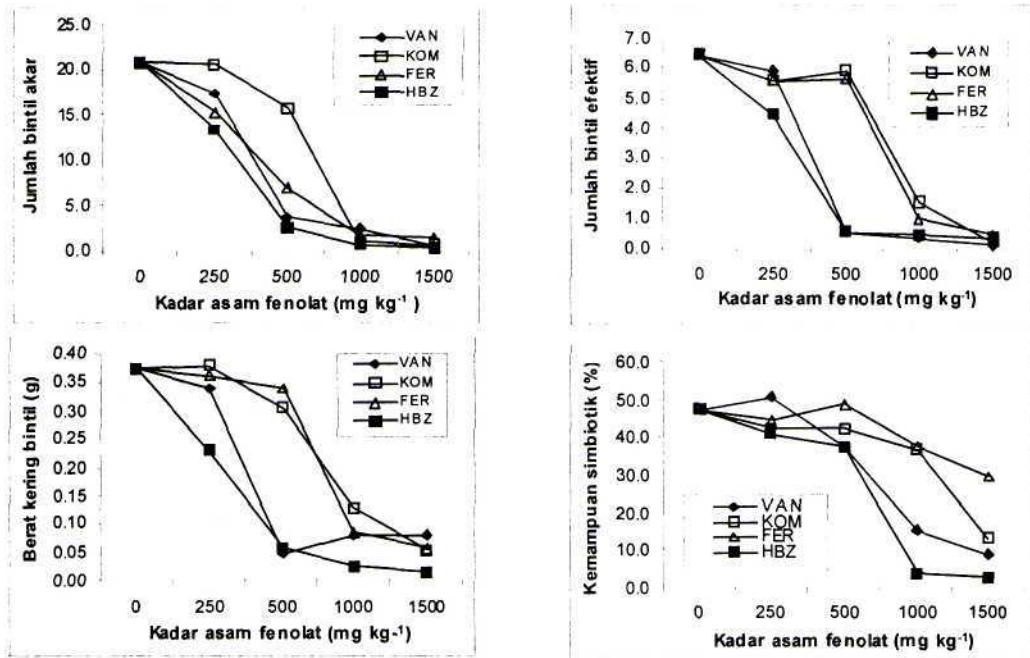
B,C,D,E = Kadar asam vanilat, masing-masing 250, 500, 1000, dan 1500 mg kgⁿ¹.

F,G,H,I = Kadar asam p-kumarat, masing-masing 250, 500, 1000, dan 1500 mg kg'.

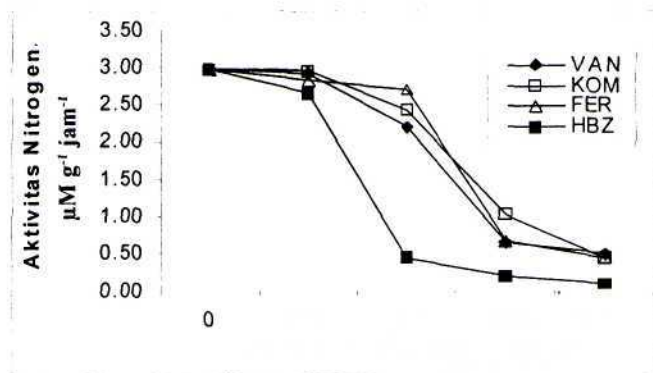
J,K,L,M = Kadar asam ferulat, masing-masing 250, 500, 1000, dan 1500 mg kg^t.

N,O,P,Q = Kadar asam p-hidroksibenzoat, masing-masing 250, 500, 1000, dan 1500 mg kg^l.

B...Q = Menunjukkan perlakuan B sampai dengan perlakuan Q.



Gambar 1. Pengaruh asam fenolat terhadap komponen bintil akar kacang hijau. VAN =Asam vanilat, KOM = Asam p-kumarat, FER = Asam ferulat, HBZ = Asam p-hidroksibenzoat.



Gambar 2. Pengaruh asam fenolat terhadap aktivitas nitrogenase. VAN = Asam vanilat, KOM = Asamp-kumarat, FER = Asam ferulat, HBZ = Asamp-hidroksibenzoat

tergantung pada kadar dari masing-masing asam fenolat tersebut. Secara umum asam p-hidroksibenzoat memperlihatkan toksitas tertinggi dibandingkan dengan asam fenolat lainnya (Gambar 1).

Kemampuan simbiotik bintil kacang hijau pada perlakuan asam p-hidroksibenzoat nyata lebih rendah dibandingkan dengan asam fenolat lainnya yaitu hanya mencapai 19,85 % dan berbeda sangat nyata dengan perlakuan asam ferulat dengan kemampuan simbiotik mencapai 39,87 % (Tabel 1), sedangkan perlakuan kontrol kemampuan simbiotiknya mencapai 46,90%. Ini berarti bahwa asam p-hidroksibenzoat dapat

menurunkan kemampuan simbiotik bintil akar kacang hijau sampai 57,6 %.

Pengaruh terhadap aktivitas *nitrogenase*

Pembandingan kontras ortogonal aktivitas nitrogenase bintil akar kacang hijau pada perlakuan asam fenolat nyata lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (c 1) (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa asam fenolat dapat menekan aktivitas nitrogenase bintil akar kacang hijau. Aktivitas nitrogenase pada perlakuan asam ferulat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas nitrogenase pada perlakuan asam p-hidroksibenzoat (c10), yaitu masing-masing 1,69 µM

Tabel 2. Persentase hambatan asam fenolat terhadap aktivitas nitrogenase, klorofil daun, dan luas daun

Asam fenolat	Aktivitas nitrogenase		Klorofil daun		Luas daun	
	ARA (HM μ g ⁻¹ jam ⁻¹)	Hambatan (%)	Jumlah (Hg ⁻¹ mg b. kering)	Hambatan (%)	Luas (dm ² tan ⁻¹)	Hambatan (%)
Vanilat	1,50	49,60	22,12	29,61	5,80	12,25
p-Kumarat	1,73	41,94	21,88	27,72	5,58	16,15
Ferulat	1,69	43,28	24,15	12,52	5,81	13,86
p-HBZ	0,65	78,18	19,62	48,50	5,10	29,36

ARA = Aktivitas Reduksi Asetilen

p-HBZ = Asam p-hidroksibenzoat

g⁻¹ jam⁻¹ dan 0,65 μ M g⁻¹ jam⁻¹.

Aktivitas nitrogenase menurun sejalan dengan meningkatnya kadar dari masing-masing asam fenolat. Laju penurunan tertinggi dari aktivitas nitrogenase mulai terjadi pada perlakuan 500 mg kg⁻¹ asam p-hidroksibenzoat (Gambar 2). Pada Tabel 2 tampak bahwa asam p-hidroksibenzoat memiliki daya hambat tertinggi (78,18%) terhadap aktivitas nitrogenase diikuti secara berturut-turut oleh asam vanilat, ferulat, dan p-kumarat, dengan daya hambat masing-masing 49,60%, 43,28%, dan 41,94%.

Pengaruh terhadap klorofil dan luas daun

Secara umum keempat asam fenolat (vanilat, p-kumarat, ferulat, dan p-hidroksibenzoat) dapat menekan jumlah klorofil dan luas daun kacang hijau. Daya hambatnya meningkat seiring dengan meningkatnya kadar asam fenolat. Asam p-hidroksibenzoat mempunyai daya hambat tertinggi hingga mencapai 48,50% pada klorofil daun, di ikuti secara berturut-turut oleh asam vanilat, p-kumarat, dan ferulat. Demikian pula terhadap luas daun, asam p-hidroksibenzoat memiliki daya hambat tertinggi (29,36%) kemudian di ikuti secara berturut-turut oleh p-kumarat, ferulat, dan vanilat, dengan daya hambat masing-masing 16,15%, 13,86%, dan 12,25% (Tabel 3).

Secara umum asam p-hidroksibenzoat memberikan laju penurunan tertinggi terhadap klorofil daun dibandingkan dengan asam fenolat lainnya. Tingginya daya hambat asam p-hidroksibenzoat terhadap klorofil daun disebabkan karena asam p-hidroksibenzoat memiliki sifat asam yang cukup tinggi, sehingga dapat mengganggu pertumbuhan sel pada tanaman termasuk klorofil daun. Lehninger (1988) menyatakan bahwa sel-sel tanaman tidak dapat hidup pada keadaan asam yang terlalu tinggi. Rendahnya jumlah klorofil pada perlakuan asam p-hidroksibenzoat

dapat pula disebabkan oleh menurunnya luas daun akibat pemberian asam p-hidroksibenzoat. Hal ini dapat terjadi karena ada korelasi antara luas daun dengan total klorofil daun (Tabel 3).

Asam fenolat menurunkan luas daun dari 6,13 dm²tan⁻¹ pada tanaman kontrol menjadi 5,44 dm²tan⁻¹ atau turun 11,25 % pada perlakuan 1500 mg kg⁻¹ asam vanilat. Demikian pula pada perlakuan 1500 mg kg⁻¹ asam p-kumarat, ferulat, dan p-hidroksibenzoat, secara berturut-turut menurunkan luas daun 16,15 %, 13,86%, dan 29,36%.

PEMBAHASAN

Secara umum asam fenolat yang diuji dapat menurunkan jumlah bintil akar dan jumlah bintil efektif kacang hijau masing-masing 68,17% dan 62,70%. Demikian pula aktivitas nitrogenase dan kemampuan simbiotik masing-masing menurun 53,35% dan 34,92%. Laju penurunan yang diakibatkan oleh asam fenolat, bervariasi diantara ke empat jenis asam fenolat yang di uji. Asam fenolat yang memiliki daya hambat tertinggi terhadap komponen bintil akar dan klorofil daun adalah asam p-hidroksibenzoat.

Tingginya daya hambat asam p-hidroksi benzoat dibandingkan dengan asam fenolat lainnya disebabkan karena selain memiliki sifat asam yang lebih tinggi dibandingkan dengan asam fenolat lainnya, juga karena asam p-hidroksibenzoat dapat menekan ketersediaan hara dalam tanah. Menurut Inderjit dan Mallik (1997) asam p-hidroksibenzoat memberikan daya hambat tertinggi terhadap ketersediaan hara dalam tanah khususnya N organik, PO₄³⁻, K⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ dan Na⁺ dibandingkan dengan asam fenolat lainnya. Hasil penelitian Rice *et al.* (1981) pada tanaman kacang-kacangan menunjukkan bahwa laju penyematan nitrogen menurun sejalan dengan

Tabel 3. Rerata kadar klorofil daun dan luas daun kacang hijau pada berbagai perlakuan kadar asam fenolat

Perlakuan	Jumlah Klorofil ($\mu\text{g mg}^{-1}$ bobot kering)		Nisbah a/b	Total Klorofil	Luas Daun ($\text{dm}^2 \text{tan}^{-1}$)
	a	b			
Kontrol	18,83 \pm 0,56	6,64 \pm 0,32	2,84	25,46	6,13 \pm 0,68
Vanilat(mg kg^{-1})					
250	18,13 \pm 0,31	6,31 \pm 0,16	2,88	24,44	6,03 \pm 0,36
500	18,25 \pm 1,14	6,03 \pm 0,54	3,03	24,28	5,81 \pm 0,42
100	16,72 \pm 1,28	5,02 \pm 0,50	3,33	21,73	5,92 \pm 0,50
1500	13,63 \pm 1,07	4,29 \pm 0,35	3,17	17,92	5,44 \pm 0,29
Koefisien korelasi (r)				0,86*	
p-Kumarat (mg kg^{-1})					
250	18,70 \pm 0,57	6,84 \pm 0,40	2,73	25,54	6,07 \pm 0,75
500	17,78 \pm 1,06	5,65 \pm 0,51	3,05	23,43	5,69 \pm 0,66
100	15,84 \pm 1,52	4,27 \pm 0,86	3,71	20,11	5,43 \pm 0,46
1500	14,19 \pm 1,7	4,25 \pm 0,45	3,34	18,44	5,14 \pm 0,73
Koefisien korelasi (r)				0,98**	
Ferulat (mg kg^{-1})					
250	18,59 \pm 0,72	6,45 \pm 0,29	2,88	25,04	6,31 \pm 0,54
500	18,11 \pm 0,51	6,51 \pm 0,17	2,78	24,62	6,16 \pm 0,31
100	18,15 \pm 0,41	6,53 \pm 0,18	2,78	24,68	5,47 \pm 0,26
1500	15,97 \pm 0,43	6,30 \pm 0,39	2,54	22,27	5,28 \pm 0,51
Koefisien korelasi (r)				0,73*	
p-Hidroksibenzoat(mg kg^{-1})					
250	17,25 \pm 0,34	6,16 \pm 0,28	2,80	23,41	5,78 \pm 0,40
500	16,63 \pm 0,52	5,68 \pm 0,44	2,93	22,31	5,64 \pm 0,36
100	14,75 \pm 0,58	4,91 \pm 0,21	3,01	19,66	4,68 \pm 0,49
1500	9,9 \pm 1,09	3,11 \pm 0,17	3,22	13,10	4,33 \pm 0,85
Koefisien korelasi (r)				0,91**	

Rerata jumlah klorofil dan luas daun \pm Standar deviasi (n = 3)

• = Berpengaruh nyata

** = Berpengaruh sangat nyata

meningkatkan kadar asam fenolat. Menurunnya ketersediaan hara Mg^{2+} akan mengakibatkan pembentukan klorofil daun menurun, karena Mg^{2+} merupakan inti dari klorofil daun.

Selain itu Rice *et al.* (1981) asam p-hidroksibenzoat dapat menekan kadar hemoglobin bintil akar lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa fenolat lainnya. Menurunnya kadar hemoglobin pada bintil akar merupakan pertanda bahwa aktivitas nitrogenase juga menurun. Tissue *et al.* (1997) menyatakan bahwa meningkatnya aktivitas nitrogenase menyebabkan meningkatnya fiksasi N_2 dari udara. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar

asam p-hidroksibenzoat dalam tanah, maka kadar hemoglobin bintil semakin rendah.

Hambatan tertinggi dari ke empat asam fenolat terhadap komponen bintil akar dan aktivitas nitrogenase mulai terjadi pada kadar 500 mg kg^{-1} , selanjutnya daya hambatnya meningkat sejalan dengan meningkatnya kadar dari masing-masing asam fenolat tersebut (Gambar 1), dan terhadap penurunan laju kemampuan simbiotik tertinggi, terjadi pada kadar 1000 mg kg^{-1} .

Demikian pula halnya terhadap luas daun menunjukkan adanya penurunan akibat meningkatnya dosis pemberian asam fenolat. Penurunan luas daun

berkorelasi nyata sampai sangat nyata dengan jumlah klorofil daun pada ke empat perlakuan asam fenolat (vanilat, p-kumarat, ferulat, dan p-hidroksibenzoat) masing-masing dengan nilai $r = 0,86^*$, $r = 0,98^{**}$ dan $r = 0,73^*$, dan $r = 0,91^{**}$ (Tabel 3). Ini menunjukkan bahwa klorofil daun menurun akibat menurunnya luas daun.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa asam fenolat dapat menurunkan aktivitas nitrogenase dan kadar klorofil daun masing-masing sampai 53,35% dan 29,98%. Jenis asam fenolat yang memiliki daya hambat tertinggi terhadap aktivitas nitrogenase dan pembentukan klorofil daun adalah asam/7-hidroksibenzoat.

Hambatan tertinggi asam p-hidroksibenzoat terhadap aktivitas nitrogenase bintil akar mulai terjadi pada kadar 500 mg kg⁻¹. Sementara asam vanilat, ferulat, dan p-kumarat hambatan tertinggi masing-masing mulai terjadi pada kadar 1000 mg kg⁻¹.

DATARPUSTAKA

- Booker FL, V Blum and EL Fiscus. 1992.** Short-term effects of ferulic acid on ion uptake and water relation in cucumber seedling. *Journal of Experimental Botany* 93, 649-655.
- Chon SU, CJ Nelson and Contts. 2004.** Osmotic and autotoxic effects of leaf extracts on germination and seedling growth of alfalfa. *Agronomy Journal*. 96, 1673-1679.
- Chopra J, N Kaur and AK Gupta. 1998.** Carbohydrate status and sucrose metabolism in mungbean roots and nodules. *Phytochemistry* 49, 1891-1895.
- Dalton BR. 1999.** The occurrence and behavior of plant phenolic acids in soil environment and their potential involvement in allelochemical interference interaction: Methodological limitation in establishing conclusive proof of allelopathy. In: *Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interaction*, 57-74. KMM Inderjit, Dakshini and CL Foy (Eds.). CRC Press. Florida.
- Devi SR and MNV Prasad. 1992.** Effect of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. *Journal of Chemical Ecology* 18, 1981-1990.
- Harborne JB. 1989.** General procedures and measurements of total phenolic. In: *Methods in Plant Biochemistry I. Plant Phenolic*. PM Dey and JB Harborne (Eds.). Academic Press. London.
- Hartley RD and DC Whitehead. 1988.** Phenolic acid in soils and their influence on plant growth and soil microbial processes. In: *Soil Organic Matter and Biological Activity*, 109-149. D Vaughan and RE Malcolm (Eds.). Martinus Nijhoff/ Dr W Junk Publishers. Netherlands.
- Hejl AM, FA Einhellig and JA Rasmussen. 1993.** Effect of juglone on growth photosynthesis and respiration. *Journal of Chemical Ecology* 19, 559-568.
- Inderjit. 1996.** Plant phenolics in allelopathy. *The Botanical Review* 62, 186-202.
- Inderjit and All Mallik. 1997.** Effect of phenolic compounds on selected of soil properties. *Forest Ecology and Management* 92, 11-18.
- Inderjit and M Olofsson. 1998.** Using and improving laboratory bioassays in rice allelopathy research. In: *Allelopathy in Rice*, 45-55. M Olofsson (Ed.). IIRI Philippines.
- Lehninger AL. 1988.** *Dasar-dasar Biokimia. Jilid I*. M Thenawijaya (Penerjemah). Erlangga. Jakarta.
- Knudson LL, TW Tibbits and GE Edwards. 1977.** Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant Physiol.* 60, 606-608.
- Rice EL. 1984.** *Allelopathy*, 2nd ed., Academic Press. Orlando (Fla., USA).
- Rice EL, Lin CY and Huang CY. 1981.** Effect of decomposing rice straw on growth and nitrogen fixation by *Rhizobium*. *Journal of Chemical Ecology* 7, 333-344.
- Sampietro DA, MA Vattuone and MI Isla. 2005.** Plant growth inhibitors isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) straw. *Plant Physiol.* 163, 837-846.
- Siqueira JO, MG Nair, R Hammerschmidt GR and Saffir. 1991.** Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial system. *Critical Review of Plant Sciences* 10, 63-69.
- Souto XC, JC Balano, L Gonzales and XX Santos. 2001.** HPLC techniques - phenolics. In: *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, 251-282.. MJR Roger (Ed.). Kluwer Academic Publishers. London.
- Tissue DT, JP Megonigal and Thomas RB. 1997.** Nitrogenase activity and N₂ fixation are stimulated by elevated CO₂ in a tropical N₂-fixing tree. *Oecologia*. 109, 28-33.
- Turner GL and AH Gibson. 1980.** Measurement of N fixation by indirect means. In: *Methods for Evaluating Biological N Fixation*. FJ Bergensen (Ed.). John Wiley and Sons. New York.
- Whitehead DC, H Dibb and RD Hartley. 1981.** Extractant pH and the release of phenolic compounds from soils, plant roots and leaf litter. *Soil Biol. Biochem.* 13, 343-348.
- Whitehead DC, H Dibb and RD Hartley. 1982.** Phenolic compounds in soil as influenced by the growth of different plant species. *J. Appl. Ecol.* 19, 579-588.
- Whitehead DC, H Dibb and RD Hartley. 1983.** Bound phenolic compounds in water extract of soils, plant root, and leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry* 15, 133-136.