

KARAKTERISASI TRANSPORTER NITROGEN, FOSFOR DAN KALIUM DARI RHIZOBIUM UNTUK TANAMAN

Talitha Widiatningrum¹

¹Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang
Jl. Raya Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229.

*Email: talitha_widiatningrum@mail.unnes.ac.id

Abstrak

Beberapa tanaman mampu mengembangkan pola symbiosis dengan rhizobium untuk membantu perolehan nitrogen, fosfor dan kalium sebagai unsur hara utama yang menentukan produktivitas tanaman. Symbiosis ini dimulai dengan pelepasan isoflavonoid dari akar yang bertindak sebagai molekul sinyal pemanggil bakteri, selanjutnya bakteri melepaskan faktor nod untuk induksi hubungan mutualisme. Beberapa transporter berperan dalam mekanisme hantaran nutrien. Permasalahannya, diversifikasi transporter tumbuhan sangatlah luas sehingga memberikan fungsi transpor yang saling tumpang tindih dan memberikan pemahaman yang rancu. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan review sekaligus kajian bioinformatika homologi dan hubungan kekerabatan untuk memberikan pemahaman yang utuh tentang fungsi transporter. Hasil review menunjukkan adanya 3 fungsi transporter, yaitu transpor ammonium, transpor fosfat inorganik serta transpor kalium. Sementara itu, hasil analisis bioinformatika menemukan adanya hubungan kekerabatan yang cukup dekat dari masing-masing transporter.

Kata kunci: transporter nitrogen, solubilisasi fosfor, solubilisasi kalium

PENDAHULUAN

Beberapa tanaman, terutama dari Leguminosae dapat berinteraksi dengan bakteri tanah yang disebut rhizobia untuk membentuk simbiosis. Simbiosis ini dapat terjadi karena keterlibatan beragam sinyal dari dan menuju mikroba. Prosesnya diawali dengan sekresi eksudat akar berupa senyawa flavonoid dengan berat molekul rendah. Selanjutnya, rhizobia menempel pada rambut akar dengan melepaskan faktor nod (NF), suatu molekul lipo-chitooligocharida (LCO) sebagai respons terhadap flavonoid tanaman (Poole dkk, 2018). Efek yang terjadi adalah deformasi bulu akar, sehingga mengalami pembelahan sel kortikal yang lebih cepat, dan bakteri dapat melakukan invaginasi membran dengan membentuk benang infeksi, diikuti dengan organogenesis nodul pada sel-sel perisikel (Chakraborty dkk, 2022). Kesalahan pada proses infeksi seringkali mengakibatkan kegagalan organogenesis nodul. Hal ini karena proses infeksi dan organogenesis terkoordinasi dengan sinyal NF maupun flavonoid dan menyiratkan keterlibatan jalur hormonal (Singla dkk, 2017).

Banyak dilakukan riset yang membahas tentang NF maupun flavonoid tanaman. Seperti misalnya penelitian yang membahas bagaimana NF dapat merangsang pembentukan akar lateral melalui jalur sinyal simbiosis, bagaimana jalur genetik yang mengatur persepsi dan pensinyalan NF, serta bahwa NF kemungkinan besar diproduksi oleh rhizobia sepanjang proses infeksi (Herrbach dkk, 2017). Selain itu, beberapa penelitian tentang eksudat akar menemukan bahwa flavonoid memediasi interaksi mikroba tanaman dengan mengkolonisasi akar dan mendorong pertumbuhan akar, memperbaiki karakteristik kimia dan fisik tanah rizosfer, serta bahwa senyawa tersebut dapat melindungi tanaman dari infeksi mikroba, serangga, atau serangan herbivora (Singla dkk, 2017).

Demikian juga halnya dengan informasi bahwa interaksi ini dapat meningkatkan pertumbuhan, kualitas serta toleransi dan respon pertahanan tumbuhan yang sudah sering dibahas (Naamala dkk, 2016; Trinh, dkk 2021). Namun demikian, belum banyak penelitian yang melakukan pembahasan tentang bagaimana agar peran utama dari nodul akar ini dapat berlangsung dengan baik. Padahal, jika mengingat fungsi utama simbiosis adalah mengikat dinitrogen bebas yang banyak

terdapat di atmosfer dan menjadikannya agar tersedia bagi tumbuhan (Thies, 2021), maka akan muncul pertanyaan bagaimana agar suplai nitrogen ini bisa sampai ke tumbuhan.

Berdasarkan hal tersebut diatas, peran dari protein transpor tentunya menjadi suatu hal yang penting untuk dibahas. Apalagi, seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, maka ditemukan berbagai bakteri tanah yang mampu melakukan solubilisasi protein dan kalium. Dengan demikian, peran protein ini menjadi semakin luas, tidak hanya mentranspor nitrogen tetapi juga sulfur dan kalium. Permasalahannya, diversifikasi transporter tumbuhan sangatlah luas sehingga memberikan fungsi transpor yang saling tumpang tindih dan memberikan pemahaman yang rancu. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan review sekaligus kajian bioinformatika homologi dan hubungan kekerabatan untuk memberikan pemahaman yang utuh tentang fungsi transporter.

METODE

Metode yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari dua tahapan. Tahap pertama menggunakan kajian literatur (Tuginem, 2023) mengenai berbagai protein transporter nitrogen, fosfor dan kalium. Bahan kajian literatur adalah artikel yang sesuai dengan topik yang diperoleh berdasarkan penelusuran melalui google scholar dengan kata kunci 'nitrogen protein transporter', 'phosphorus protein transporter', and 'potassium protein transporter pada rentang waktu 10 tahun terakhir. Pemilihan artikel dilakukan berdasarkan pembahasan yang disampaikan yang berfokus kepada fungsi transporter.

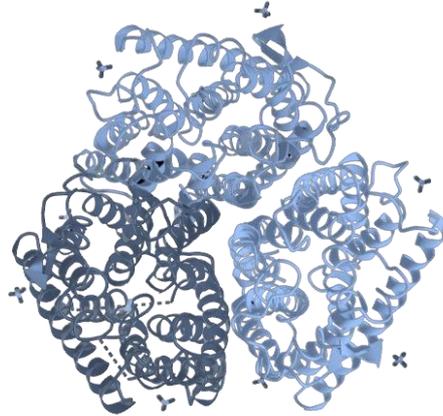
Pada tahap kedua, analisis dilakukan melalui bioinformatika, dengan cara melakukan penelusuran genom dari protein terkait melalui web server NCBI (Rangwala dkk, 2021). Setelah itu, melakukan kajian homologi gen secara otomatis dengan sistem BLAST dari NCBI untuk menentukan area terkonservasi dari setiap sekuens gen dan dilanjutkan dengan analisis filogenetik.

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Hasil Kajian Literatur

Nitrogen dan transportasinya. Nitrogen merupakan salah satu unsur hara makro yang diperlukan untuk pertumbuhan tanaman. Nitrogen juga menduduki posisi unsur yang paling melimpah di atmosfer. Namun sayangnya, tumbuhan tidak dapat memanfaatkan gas nitrogen di atmosfer secara langsung. Oleh karena itu, beberapa tumbuhan melakukan simbiosis dengan bakteri pengikat nitrogen. Bakteri ini mengubah dinitrogen atmosfer (N_2) menjadi amonia (NH_3) (Thies, 2021).

Amonium dapat memasuki sel akar tumbuhan dengan bantuan protein transpor spesifik atau melalui sejumlah protein *channel* yang ada pada membran yang umumnya dilalui oleh ion lain dan/atau molekul air melalui mekanisme difusi/osmosis (Dai dkk, 2023). Protein transpor amonium (Amt) yang ditemukan pada tumbuhan termasuk dalam superfamili protein yang sama dengan protein yang ada pada bakteri dan hewan. Protein ini terdiri dari sekitar 400-500 asam amino yang membentuk 11 atau 12 heliks transmembran, yang dapat dibagi menjadi dua bagian (Yang dkk, 2023). Protein ini kemudian dapat bergabung dengan protein yang lain membentuk struktur dimer bahkan trimer seperti gambar 1 dibawah ini. Keberadaan saluran diantara kedua bagian menunjukkan bahwa amonium diangkut sepanjang jalur yang terletak di antara dua bagian protein. Beberapa residu yang terletak di heliks kelima dan keenam, dan loop sitosol yang sangat mobile yang menghubungkan kedua heliks ini, diperkirakan terlibat dalam pengenalan dan pengangkutan amonium (Shi, 2013; Forrest, 2013).



Gambar 1. Struktur 3D Protein transporter Amt yang bersifat trimer (PDB ID: 1XQF).

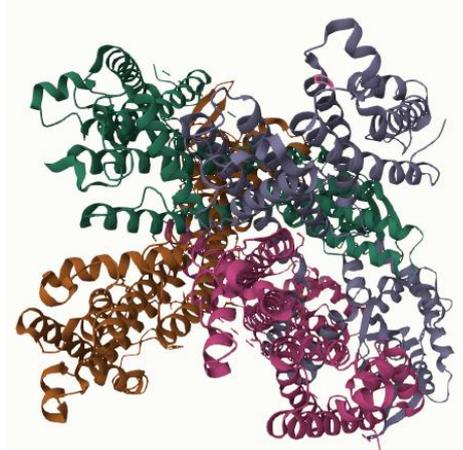
Fosfor dan transportasinya. Fosfat inorganik (Pi) dibutuhkan dalam jumlah besar oleh Leguminosae untuk mempertahankan pertumbuhan bintil. Pada saat terjadi defisiensi Pi, maka metabolisme tumbuhan, seperti fotosintesis menjadi terhambat. Hal ini tentunya memberikan efek negatif terhadap produksi flavonoid. Kuantitas flavonoid yang rendah dapat berpengaruh terhadap produksi NF yang pada perkembangan lebih lanjut dapat menghambat organogenesis nodul. Pada akhirnya, aktivitas nitrogenase menjadi terganggu (Berza dkk, 2022).

Protein transporter fosfat inorganik dikenal sebagai PHT. Protein PHT1 merupakan transporter Pi tanaman yang paling sering dikaji. Protein ini memiliki sekitar 500-600 asam amino dengan 12 domain sebagai bagian transmembran (TM) serta 2 terminal hidrofilik N dan C yang berada di sitoplasma. Semua protein PHT tanaman memiliki daerah terkonservasi berupa GGDYPLSATIxSE (Naveenarani dkk, 2023; Teng dkk, 2017). Protein PHT1 dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok. Kelompok I berisi sebagian besar PHT1 dari tanaman dikotil dan monokotil, kelompok II merupakan kelompok I dengan fungsi khusus, dan kelompok III berisi PHT1 dari Arabidopsis. Sebagian besar anggota kelompok I umumnya terlibat dalam serapan Pi langsung dari tanah sekaligus redistribusi Pi dari sumber ke organ penampung yang tereksresi dengan kuat ketika terjadi defisiensi fosfat. Kelompok II memiliki fungsi tambahan yang melibatkan mikoriza yang meningkat ekspresinya ketika terjadi invasi organisme tersebut disekitar perakaran. Kelompok III umumnya memiliki ciri khas berupa fungsi transpor vertikal fosfat dari akar hingga pucuk (Cai dkk, 2020).

Kalium dan transportasinya. Kalium (K) merupakan salah satu unsur hara utama tanaman. Kekurangan K menyebabkan hambatan pertumbuhan tanaman dan mengurangi hasil panen. Kalium (K⁺) berperan penting pada tanaman untuk mengontrol pH sel, mengatur potensial membran dan turgor sel, sekaligus sebagai kofaktor dalam proses metabolisme penting termasuk sintesis protein (Ragel et al., 2019). Sumber kalium dapat berasal secara alami dari hasil penguraian sisa tanaman dan berbagai limbah dengan bantuan bakteri. Penerapan mikroorganisme solubilisasi kalium (KSM) dapat meningkatkan kadar K dalam tanah. Mekanisme utama KSM adalah asidolisis, khelasi, reaksi pertukaran kation, kompleksolisis, dan produksi asam organik di dalam tanah (Lefoulon dkk, 2016).

Pada reaksi pertukaran kation, maka akan terjadi proses masuknya kalium kedalam sel akar tanaman. Beberapa pengangkut ion yang memediasi influks K⁺ pada tanaman telah berhasil dikarakterisasi. Bentuk pengangkut ini berupa suatu protein *channel* yang dapat mengatur terjadinya proses serapan, pelepasan, dan distribusi K⁺ pada tingkat seluler dan seluruh tanaman. Salah satu protein *channel* yang membantu masuknya kalium adalah AKT1 yang terdapat pada membran sel epidermis akar (Jegla dkk., 2018). AKT1 adalah tetramer yang subunitnya menampilkan domain transmembran yang tersusun oleh bagian terminal-N dan domain terminal-C yang tersimpan di sitoplasma dengan ukuran yang besar yang terdiri dari domain homolog pengikat nukleotida siklik,

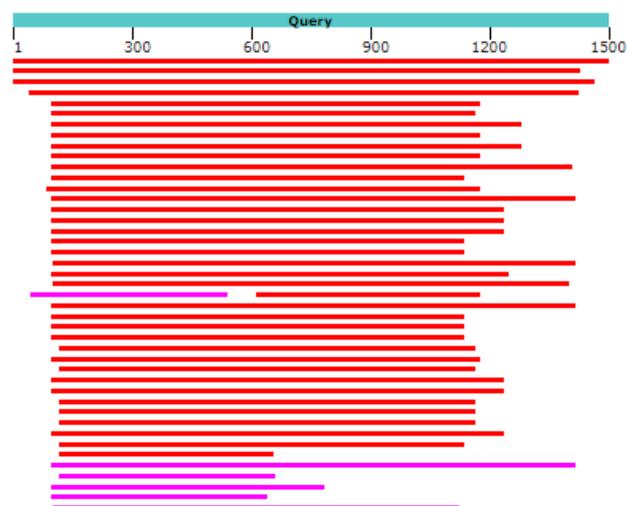
diikuti oleh domain berulang *ankyrin*, dan bagian konservasi nukleotida yang kaya akan residu hidrofobik (Jegla dkk., 2018). Domain transmembran memfasilitasi aktivitas transpor ion, sementara bagian sitosol terlibat dalam regulasi (Lefoulon dkk., 2016).



Gambar 2. Struktur 3D Protein transporter AKT1 yang bersifat tetramer (PDB ID: 7WSW).

Hasil Analisis Bioinformatika

Protein transporter ammonium. Pada situs NCBI, ditemukan 227 urutan nukleotida transporter ammonium (Amt), yang berasal dari beberapa tanaman. Sekuen protein yang terdaftar ada yang berupa revisi ataupun model mutasi. Oleh karena itu, untuk proses pensejajaran, dilakukan secara otomatis melalui sistem, lalu dipilih beberapa sekuen yang saja yang tidak overlap atau berasal dari spesies yang sama. Sistem memilih 70 spesies, yang kemudian dipadatkan menjadi 45 spesies. Bagian yang terkonservasi dari ke-45 spesies ini berada pada asam amino urutan ke 50 hingga 1000an dengan skor kemiripan lebih dari 200, sementara itu pada beberapa spesies terdapat keseragaman pada asam amino yang lebih pendek dengan skor kemiripan dibawah 200 sebagaimana gambar 3. Sementara itu, setelah dilakukan uji taksonomi, maka urutan kekerabatan dari spesies yang dikaji ada pada gambar 4.



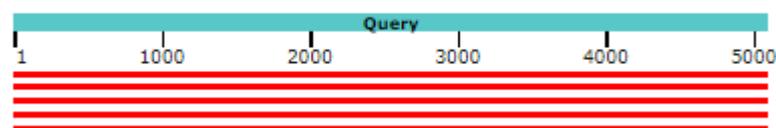
Gambar 3. Distribusi keseragaman urutan basa nukleotida penyandi protein transporter amonium.



Gambar 4. Kekerabatan spesies berdasarkan urutan basa nukleotida transporter amonium.

Protein transporter fosfat anorganik. Penelusuran di web NCBI menemukan 328 urutan nukleotida transporter fosfat inorganik (PHT1), yang berasal dari beberapa tanaman. Sebagaimana yang ditemukan pada Amt, maka beberapa sekuen protein tampak tumpang tindih. Beberapa protein ini lalu dihilangkan secara otomatis dengan menggunakan proses pensejajaran melalui sistem. Namun demikian, terdapat beberapa kendala berupa jumlah pasangan basa nukleotida yang terlalu panjang, sehingga sistem tidak dapat menampungnya. Pada tahap penelitian berikutnya dimungkinkan untuk dilakukan pemotongan sekuen yang memberikan resiko berupa kehilangan beberapa poin penting dari proses pensejajaran karena kesalahan non teknis. Sementara itu dapat pula dilakukan pensejajaran dengan elastik blast yang tentunya membutuhkan riset yang lebih lama.

Protein transporter kalium. Bagian terakhir dari kajian bioinformatika ini adalah kajian transporter kalium. Pada situs NCBI, ditemukan 1375 urutan nukleotida AKT1. Pensejajaran otomatis dengan menggunakan sistem menemukan 5 urutan nukleotida identik yang ternyata memiliki sekuens konservasi yang lebih panjang dari 200 sebagaimana Gambar 5. Setelah dilakukan uji taksonomi, maka urutan kekerabatan dari spesies yang dikaji ada pada Gambar 6.



Gambar 5. Distribusi keseragaman urutan basa nukleotida penyandi protein transporter kalium.

- ▣ [Camelineae](#)
 - . ▣ [Arabidopsis](#)
 - . . [Arabidopsis thaliana](#)
 - . . [Arabidopsis arenosa](#)
 - ▣ [Camelina](#)
 - . . [Camelina hispida](#)
 - . . [Camelina sativa](#)

Gambar 6. Kekerabatan spesies berdasarkan urutan basa nukleotida transporter kalium.

KESIMPULAN

Penelitian ini telah menyelesaikan kajian bioinformatika homologi dan hubungan kekerabatan transporter nitrogen, fosfat dan kalium. Hasil review menunjukkan adanya 3 fungsi transporter, yaitu transpor ammonium, transpor fosfat inorganik serta transpor kalium. Sementara itu, hasil analisis bioinformatika menemukan adanya hubungan kekerabatan yang cukup dekat dari masing-masing transporter

DAFTAR PUSTAKA

- Berza, B., Sekar, J., Vaiyapuri, P., Pagano, M. C., & Assefa, F. (2022). Evaluation of inorganic phosphate solubilizing efficiency and multiple plant growth promoting properties of endophytic bacteria isolated from root nodules *Erythrina brucei*. *BMC microbiology*, *22*(1), 276.
- Cai, S., Liu, F., & Zhou, B. (2020). Genome-Wide Identification and Expression Profile Analysis of the PHT1 Gene Family in *Gossypium hirsutum* and Its Two Close Relatives of Subgenome Donor Species. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(14), 4905.
- Chakraborty, S., Valdés-López, O., Stonoha-Arther, C., & Ané, J. M. (2022). Transcription factors controlling the rhizobium–legume symbiosis: integrating infection, organogenesis and the abiotic environment. *Plant and Cell Physiology*, *63*(10), 1326-1343.
- Dai, J., Han, P., Walk, T. C., Yang, L., Chen, L., Li, Y., ... & Qin, L. (2023). Genome-Wide Identification and Characterization of Ammonium Transporter (AMT) Genes in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Genes*, *14*(3), 658.
- Forrest, L. R. (2013). (Pseudo-) symmetrical transport. *Science*, *339*(6118), 399-401.
- Herrbach, V., Chirinos, X., Rengel, D., Agbevenou, K., Vincent, R., Pateyron, S., ... & Bensmihen, S. (2017). Nod factors potentiate auxin signaling for transcriptional regulation and lateral root formation in *Medicago truncatula*. *Journal of experimental botany*, *68*(3), 569-583.
- Jegla T, Busey G, Assmann SM (2018) Evolution and structural characteristics of plant voltage-gated K⁺ channels. *Plant Cell* 30: 2898–2909.
- Lefoulon C, Boeglin M, Moreau B, Véry AA, Szponarski W, Dauzat M, Michard E, Gaillard I, Chérel I (2016) The Arabidopsis AtPP2CA protein phosphatase inhibits the GORK K⁺ efflux channel and exerts a dominant suppressive effect on phosphomimetic-activating mutations. *J Biol Chem* 291: 6521–6533
- Naamala, J., Jaiswal, S. K., & Dakora, F. D. (2016). Antibiotics resistance in Rhizobium: type, process, mechanism and benefit for agriculture. *Current microbiology*, *72*, 804-816.
- Naveenarani, M., Mahadevswamy, H. K., Krishna, S. S., Mahadevaiah, C., Valarmathi, R., Manickavasagam, M., ... & Appunu, C. (2023). Isolation and Characterization of *Erianthus arundinaceus* Phosphate Transporter 1 (PHT1) Gene Promoter and 5' Deletion Analysis of Transcriptional Regulation Regions under Phosphate Stress in Transgenic Tobacco.
- Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 16: 291–303.
- Quides, K. W., Weisberg, A. J., Trinh, J., Salaheldine, F., Cardenas, P., Lee, H. H., ... & Sachs, J. L. (2021). Experimental evolution can enhance benefits of rhizobia to novel legume hosts. *Proceedings of the Royal Society B*, *288*(1951), 20210812.
- Ragel P, Raddatz N, Leidi EO, Quintero FJ, Pardo JM (2019) Regulation of K⁺ nutrition in plants. *Front Plant Sci* 10: 281

- Rangwala, S. H., Kuznetsov, A., Ananiev, V., Asztalos, A., Borodin, E., Evgeniev, V., ... & Schneider, V. A. (2021). Accessing NCBI data using the NCBI sequence viewer and genome data viewer (GDV). *Genome research*, 31(1), 159-169.
- Shi, Y. (2013). Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annual review of biophysics*, 42, 51-72.
- Singla, P., & Garg, N. (2017). Plant flavonoids: Key players in signaling, establishment, and regulation of rhizobial and mycorrhizal endosymbioses. *Mycorrhiza-function, diversity, state of the art*, 133-176.
- Teng, W., Zhao, Y. Y., Zhao, X. Q., He, X., Ma, W. Y., Deng, Y., ... & Tong, Y. P. (2017). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of PHT1 phosphate transporters in wheat. *Frontiers in Plant Science*, 8, 543.
- Thies, J. E. (2021). Biological dinitrogen fixation: symbiotic. In *Principles and Applications of Soil Microbiology* (pp. 455-487). Elsevier.
- Tuginem, H. N. (2023). Penelitian strategi pengembangan koleksi di perpustakaan pada google scholar: sebuah narrative literature review. *Jurnal Pustaka Budaya*, 10(1), 32-43.
- Victor Roch, G., Maharajan, T., Ceasar, S. A., & Ignacimuthu, S. (2019). The role of PHT1 family transporters in the acquisition and redistribution of phosphorus in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 38(3), 171-198.
- Yang, C., Huang, C., Gou, L., Yang, H., & Liu, G. (2023). Functional Identification and Genetic Transformation of the Ammonium Transporter PtrAMT1; 6 in Populus. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8511.