

Peran *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) dan *Sucrose Transporter* (SUT) dalam Akumulasi Sukrosa pada Tomat (*Lycopersicon esculentum*) Transgenik

Parawita Dewanti¹⁾, Tri Ratnasari²⁾, Septyan Christanto¹⁾ dan Bambang Sugiharto²⁾

¹⁾Fakultas Pertanian Universitas Jember, ²⁾Fakultas MIPA Universitas Jember.
Jln Kalimantan III/23 Jember, JATIM
e-mail : parawita@yahoo.co.id

Abstrak

Sukrosa merupakan salah satu komponen penting untuk menentukan kualitas dan hasil pada tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum*). Kandungan sukrosa ditentukan oleh aktivitas enzim *sucrosa phosphate synthase* (SPS). Enzim ini mengkatalisis reaksi pembentukan sukrosa dari *fruktosa-6-fosfat* (F6P) dan *uridin-5-diphospho glukosa* (UDPG). Sukrosa disintesis pada daun kemudian ditranslokasikan ke seluruh organ dan diakumulasikan pada buah. Proses translokasi sukrosa difasilitasi oleh protein *sucrose transporter* (SUT). Oleh karena itu adanya SPS dan SUT sangat berperan terhadap akumulasi sukrosa pada tanaman tomat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran SPS dan SUT dalam akumulasi sukrosa pada beberapa buah tomat transgenik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman tomat transgenik hasil overekspresi gen SPS mampu meningkatkan sukrosa daun sebesar 116% dan overekspresi gen SUT meningkatkan sukrosa buah sebesar 124% dibandingkan tanaman kontrol (*wild type*).

Kata Kunci: Tomat, *sucrose phosphat synthase* (SPS), *sucrose transporter* (SUT), sukrosa, transgenik

PENDAHULUAN

Produk akhir asimilasi karbon pada proses fotosintesis adalah sukrosa dan pati (Kim *et al.*, 2000). Hasil fotoasimilat yang berupa sukrosa selanjutnya ditranslokasikan ke seluruh bagian tanaman untuk perkembangan tanaman (Huber dan Huber, 1996). Biosintesis sukrosa di dalam sel tanaman dipengaruhi oleh beberapa enzim, termasuk enzim SPS (*Sucrose Phosphat Synthase*). Enzim SPS berfungsi untuk mengkatalis *fruktosa-6-phosphate* dan *UDP-Glucosa* menjadi *sucrosa-6-phosphat* (Bruneau *et al.*, 1991).

Hasil beberapa penelitian membuktikan bahwa SPS merupakan enzim utama yang menentukan kemampuan tanaman dalam biosintesis sukrosa tanaman (Huber and Huber, 1996; Sugiharto *et al.*, 1997). Akumulasi sukrosa di daun tebu

berkorelasi positif dengan tingkat pertumbuhan dan produktifitas gulanya (Sugiharto *et al.*, 1997). Peranan penting SPS dalam sintesis sukrosa ini telah mendorong para peneliti untuk melakukan isolasi cDNA yang menyandi SPS diantaranya pada tanaman jagung, bayam (Sonewald *et al.*, 1993) dan pada tanaman tebu (Sugiharto *et al.*, 1997). Bahkan overekspresi gen SPS dari tanaman jagung telah berhasil meningkatkan kandungan sukrosa pada daun tanaman tomat (Worrel *et al.*, 1991; Galtier *et al.*, 1993; Laporte *et al.*, 2001), tembakau (Baxter, 2003; Lunn *et al.*, 2003, Miswar *et al.*, 2005), *spinach* dan *Arabidopsis thaliana* (Signora *et al.*, 1998).

Selain ditentukan oleh tingkat sintesisnya, besarnya sukrosa yang dapat diakumulasikan pada organ penyimpanan juga ditentukan oleh proses transportasi

sukrosa dari daun (*source*) menuju batang/buah (*sink*). Proses transportasi sukrosa dari *source* ke *sink* difasilitasi oleh protein transport yang dikenal dengan transporter sukrosa (*sucrose transporter/SUT*). Protein *sucrose transporter* (SUT) berfungsi untuk mentranslokasi sukrosa ke organ penyimpanan. Beberapa peneliti telah berhasil mengisolasi gen SUT dari tanaman tembakau (Burkle *et al.*, 1998), kentang (Riesmeier *et al.*, 1993 ; Weise *et al.*, 2000 ; Krugel *et al.*, 2008), tomat (Weise *et al.*, 2000), tebu (Sugiharto *et al.*, unpublished results, 2008). Para peneliti menduga bahwa dengan melakukan over ekspresi gen yang mengkode transporter sukrosa dapat meningkatkan laju transportasi sukrosa, sehingga meningkatkan kemampuannya untuk mengakumulasi sukrosa di sink (Wang, 2003). Over ekspresi gen SUT tomat untuk meningkatkan translokasi sukrosa ke organ sink pada tomat telah berhasil dilakukan oleh Hackel *et al.*, 2006.

Besar kecilnya aktivitas SPS menentukan kandungan sukrosa daun dan banyak sedikitnya SUT akan meningkatkan translokasi sukrosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara aktivitas SPS dan kandungan sukrosa daun dan buah pada tanaman tomat transgenik.

METODE PENELITIAN

Bahan Tanam

Benih tomat yang digunakan dalam penelitian ini adalah klon T-SPS(3) (hasil insersi gen SoSPS1), klon T-SUT (1) (hasil insersi gen SoSUT1), klon G1 dan G2 (hasil insersi gen SoSPS1 dan SoSUT1). Benih dibibitkan selama 14 minggu dan ditanam dalam media pot. Pengambilan sampel dilakukan pada daun tomat umur 6 minggu (daun pertama sudah membuka sempurna). Sampel diambil pada siang hari/ saat ada sinar matahari, antara jam 09.00-11.00, karena diperkirakan memiliki aktivitas metabolisme yang optimal. Pengambilan dilakukan dengan cara memotong dan menimbang daun sebanyak 2 gram,

kemudian langsung dimasukkan dalam nitrogen cair sampai dilakukan analisis.

Ekstraksi Enzim

Sampel daun beku digerus dengan menggunakan *mortar-stumper* dingin dengan bantuan N cair sampai menjadi tepung. Sampel ditambah buffer ekstraksi (50 mM Mops-NaOH (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM DTT dan 10% PVP dan 10% PSMF) sebanyak 2 kali volume dari berat sampel yang digunakan dan dicampur sampai menjadi homogenat. Homogenat disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit dan supernatan diambil. Untuk menjaga stabilitas enzim, maka protein dalam supernatan yang diperoleh dilewatkan pada kolom kromatografi Sephadex G25, dengan tujuan menghilangkan senyawa-senyawa kecil yang diduga dapat menjadi inhibitor aktivitas enzim. Senyawa-senyawa kecil tersebut akan terperangkap dalam pori-pori sephadex-G25 dan protein SPS akan lolos dan ditampung dalam mikrotube kemudian disimpan di freezer -80°C untuk analisis selanjutnya.

Penentuan Aktivitas SPS (*Sucrosa Phosphate Synthase*)

Aktivitas enzim SPS ditentukan berdasarkan jumlah sukrosa yang dibentuk selama reaksi sesuai dengan metode Sugiharto *et al.*, 1995). Sampel yang sudah dilewatkan kolom kromatografi sephadex G-25 diukur aktivitas enzimnya. Sampel sebanyak 50µl ditambah 40µl buffer (50mM MOP-NaOH (pH 7,5), 15mM MgCl₂ dan H₂O), 10µl 70 mM F-6-P dan 10µl 70mM UDP-G sebagai substrat serta 10µl 70mM G-6-P sebagai aktivator. Reaksi dilakukan pada suhu 30°C selama 0,10 dan 20 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 70µl NaOH 0.5N, kemudian divorteks dan dipanaskan dalam air pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah dingin ditambahkan 250 µl resorsinol 0,1 % dalam 95% alkohol dan 750 µl HCl 30% dan diinkubasi pada suhu

80°C selama 8 menit. Besarnya sukrosa ditunjukkan dengan intensitas warna merah yang terbentuk dan nilai absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm.

Penentuan Kandungan Sukrosa daun dan buah

Ekstraksi dilakukan dengan menggerus 2 gram daun tomat dalam methanol 80% sebanyak 5 ml kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Pemisahan bahan terlarut dan tidak terlarut dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan supernatan yang diperoleh ditampung dalam botol falcon. Perlakuan ini diulang sampai pelet yang tersisa berwarna putih. Supernatan yang diperoleh dievaporasi pada suhu 60°C dengan rotary evaporator sampai metanol kloroform menguap sehingga yang tersisa adalah larutan berpelarut air.

Pengujian sukrosa dilakukan dengan metode Seliwanoff dalam Bintang (2010) dengan sedikit modifikasi. Sampel sebanyak 50 µl ditambah 0,5 N NaOH sebanyak 70 µl pada sampel dan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit, setelah dingin diwarnai dengan 0,1 % resorsinol dalam 95% alkohol sebanyak 250 µl dan 30% HCl sebanyak 750 µl. Untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 80°C selama 8 menit. Warna yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Untuk mendapatkan konsentrasi sukrosa, maka nilai absorbansi tersebut dihitung kandungan sukrosanya dan dibandingkan dengan kurva standart sukrosa yang telah dibuat.

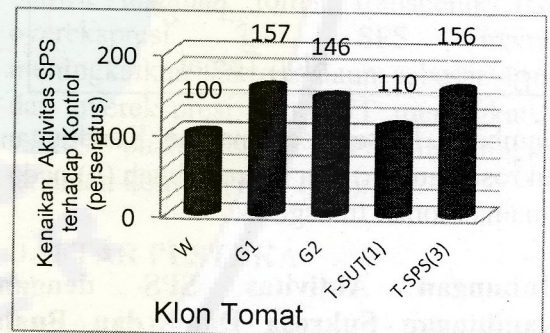
Penentuan kandungan gula sukrosa buah dilakukan pada buah tomat yang sudah masak (100% buah berwarna merah). Ekstraksi buah dilakukan dengan menggerus 3 gram daging buah tomat, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan bahan terlarut dan tidak

terlarut. Supernatan yang diperoleh ditampung untuk diukur kandungan sukrosanya dengan menggunakan metode Seliwanoff seperti di atas.

HASIL DAN PEMBAHASAN Aktivitas SPS (*Sucrose phosphate synthase*)

Analisis aktivitas SPS dilakukan untuk mengetahui apakah *overekspresi* gen SPS dapat meningkatkan aktivitas SPS pada tanaman tomat transgenik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa aktivitas SPS pada tanaman tomat transgenik menunjukkan peningkatan dibandingkan dengan tanaman kontrol (*Wild Type*)(Gambar 1).

Berdasarkan hasil uji aktivitas enzim SPS, klon T-SPS(3) mempunyai kenaikan aktivitas SPS paling tinggi yaitu sebesar 156% dari tanaman kontrol (Gambar 1a). Pada tanaman transgenik G1, G2 dan T-SUT(1) juga menunjukkan aktivitas SPS mencapai 157%, 146% dan 110% dibandingkan tanaman kontrol.

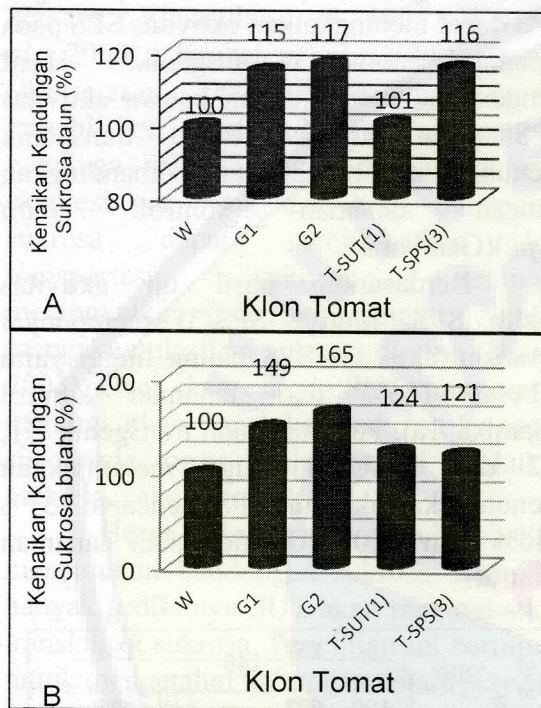


Gambar 1. Kenaikan Aktivitas SPS tanaman tomat transgenik terhadap kontrol (%)

Akumulasi sukrosa pada daun dan buah

Secara umum akumulasi sukrosa di daun pada semua tanaman tomat transgenik, mengalami peningkatan dibandingkan tanaman kontrol (Gambar 2a). Peningkatan kandungan sukrosa daun tertinggi terjadi pada tanaman transgenik klon G1, G2 dan S-SPS(3) yaitu mengalami peningkatan 115%, 117% dan 116% dibandingkan

tanaman kontrol. Pengamatan pada peningkatan kandungan sukrosa daun ternyata diikuti oleh peningkatan kandungan sukrosa buah. Peningkatan kandungan sukrosa buah tertinggi terjadi pada semua tanaman PRG yaitu klon G1, G2, S-SUT(1) yaitu 149%, 165% dan 124% dibandingkan tanaman kontrol (Gambar 2b).

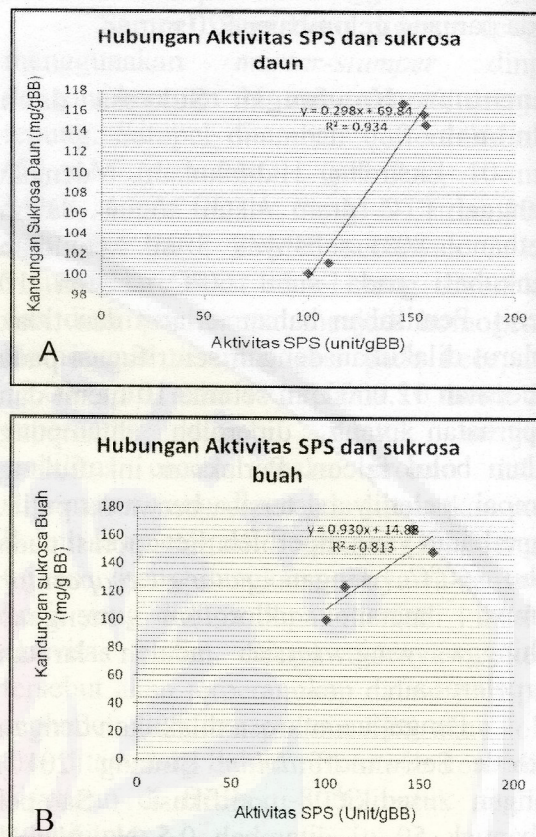


Gambar 2. Persentase kenaikan Kandungan sukrosa daun (a) dan sukrosa buah (b) pada tanaman tomat transgenik

Hubungan Aktivitas SPS dengan Kandungan Sukrosa Daun dan Buah Tomat Transgenik

Enzim SPS sebagai pengatur sintesa sukrosa di daun akan menentukan seberapa besar kandungan sukrosa di daun. Untuk mengetahui seberapa besar SPS mempengaruhi terakumulasinya sukrosa di daun maka dikorelasikan antara aktivitas SPS dengan kandungan sukrosanya. Peningkatan aktivitas SPS diikuti oleh meningkatnya kandungan sukrosa di daun (berkorelasi positif) dengan nilai r adalah 0.934 yang berarti bahwa hubungan antara

peningkatan aktivitas SPS dan peningkatan kandungan sukrosa daun mencapai 93,4% (Gambar 3a).



Gambar 3. Hubungan aktivitas SPS dan kandungan sukrosa daun (a) dan buah (b) pada tanaman tomat transgenik

Besarnya kandungan SPS juga mempengaruhi terakumulasinya sukrosa di buah, sehingga perlu dikorelasikan antara aktivitas SPS dengan kandungan sukrosa buah. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa aktivitas SPS juga diikuti oleh meningkatnya kandungan sukrosa di buah dengan nilai r adalah 0.813 yang berarti bahwa hubungan antara peningkatan aktivitas SPS dan peningkatan kandungan sukrosa buah mencapai 81,3% (Gambar 3b).

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas SPS didapat bahwa pada semua tomat transgenik mempunyai aktivitas SPS lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol.

Terjadinya kenaikan aktivitas SPS pada tomat transgenik disebabkan oleh meningkatnya ekspresi SPS. Hasil ekspresi SPS tertinggi terjadi pada klon 3 yaitu meningkat 204% atau 2,04 kali dibandingkan tanaman kontrol. Hasil ini hampir sama dengan yang dilakukan Laporte *et al.*, (1997) yang mengekspresikan gen SPS jagung pada tanaman tomat, dimana aktivitas SPS meningkat 2-3 kalinya.

Tingginya aktivitas SPS daun tomat transgenik klon T-SPS(3) (204%) ternyata menghasilkan kandungan sukrosa daun yang tinggi pula (173%) demikian juga pada kandungan sukrosa buah, (237%). Pengamatan pada tomat transgenik klon G1 dan G2 menunjukkan bahwa aktivitas SPS yang rendah (110%) mengakibatkan kandungan sukrosa daun rendah juga (101%), namun kandungan sukrosa buah meningkat yaitu 124%. Pengamatan pada tomat transgenik hasil transformasi ganda *SoSPS1-SoSUT1* menunjukkan bahwa aktivitas SPS daun pada tanaman G1 dan G2 sebesar 157% dan 146% mengakibatkan kandungan sukrosa daun meningkat yaitu 115% dan 117% serta meningkatkan kandungan sukrosa buah sebesar 148% dan 165%. Translokasi sukrosa dari daun ke buah sebagai organ penyimpanan akan menyebabkan akumulasi sukrosa pada organ penyimpanan tersebut. Hasil penelitian Miron and Schaffer (1991), menyatakan bahwa peningkatan aktivitas SPS dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada jenis buah-buahan seperti melon dan tomat.

Enzim SPS sebagai pengatur sintesa sukrosa di daun akan menentukan seberapa besar kandungan sukrosa di daun. Untuk mengetahui seberapa besar SPS mempengaruhi terakumulasinya sukrosa di daun maka dikorelasikan antara aktivitas SPS dengan kandungan sukrosanya. Peningkatan aktivitas SPS diikuti oleh meningkatnya kandungan sukrosa di daun, berarti peningkatan aktivitas SPS akan diikuti dengan peningkatan kandungan

sukrosa daun. Michaud, (1995), menyatakan bahwa sukrosa yang disintesis di daun belum tentu diakumulasikan, tetapi setelah sukrosa disintesis, maka secepatnya akan ditranslokasikan ke organ lain.

Hal yang sama terjadi hubungan yang erat antara aktivitas SPS dan kandungan sukrosa buah, hubungan antara peningkatan aktivitas SPS dengan peningkatan kandungan sukrosa di buah mencapai 81%. Hal ini berarti peningkatan aktivitas SPS mampu meningkatkan kandungan sukrosa buah akan tetapi tidak semua sukrosa diakumulasikan karena sukrosa merupakan sumber energi untuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan, jadi selain disimpan sukrosa juga dirombak menjadi glukosa untuk sumber energi. Adanya enzim pendegradasi sukrosa yang aktif pada organ penyimpanan yaitu *Sucrose Synthase* (SS), mengakibatkan sukrosa terdegradasi menjadi glukosa dan fruktosa.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman tomat transgenik hasil overekspresi gen SPS mampu meningkatkan sukrosa daun sebesar 116% dan overekspresi gen SUT meningkatkan sukrosa buah sebesar 124% dibandingkan tanaman kontrol (*wild type*).

DAFTAR PUSTAKA

- Baxter, C.J., C.H. Foyer, J. Turner, S.A. Rolfe, and W.P. Quick (2003) Elevated sucrose-phosphate synthase activity in transgenic tobacco sustains photosynthesis in older leaves and alters development. *J. Exp. Bot.* 54 : 1813-1820
- Bintang, M. 2010. Biokimia (Teknik Penelitian). Erlangga. Jakarta. 87-127
- Bruneau, J.M., A.C. Worrel, B. Cambow, D. Lando and T.A. Voelker. 1991. Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plant. *Plant Physiol.* 89 : 518-524

- Burkle L., J. M. Hibberd, W. P. Quick, C. Kuhn, B. Hirner, and W. B. Frommer. 1998. The H⁺-Sucrose Cotransporter NtSUT1 Is Essential for Sugar Export from Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* (1998) 118: 59-68
- Galtier, N., C.H. Foyer, J. Huber, T.A. Voelker, S.C. Huber (1993) Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning, and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var UC82B). *Plant Physiol.* 101: 535-543
- Hackel A., N. Schauer, F. Carrari, A. R. Fernie, B. Grimm and C. Kuhn. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant Journal.* 45 :180-192
- Huber, S.C. and J.L. Huber. 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 : 431 - 444
- Kim, J.Y., A. Mahe, J. Brangeon, and J.L. Prioul (2000) A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol.* 124 : 71-84
- Krugel, U., L. M. Veenhoff, J. Langbein, E. Wiederhold, J. Liesche, T. Friedrich, B. Grimm, E. Martinoia, B. Poolman, and C. Kuhna. 2008. Transport and Sorting of the *Solanum tuberosum* Sucrose Transporter SUT1 is Affected by Posttranslational Modification. *The Plant Cell*, 20: 2497-2513
- Laporte, M.M., J.J. Galagan, A.L. Prash, P.J. Vanderveer, D.T. Hanson, C.K. Shewmaker and T.D. Sharkey (2001) Promoter strength and tissue specificity effect on growth of tomato plants transformed with maize sucrose phosphate synthase. *Planta* 212 : 817-822
- Laporte, M.M., J.A. Galagan, J.A. Shapira, M.R. Boersig, C.K. Shewmaker, and T.D. Sharkey (1997) Sucrose phosphate synthase activity and yield analysis of tomato plants transformed with maize sucrose phosphate synthase. *Planta* 203: 253-259
- Lunn, J.E., and E. MacRae (2003) New complexities in the synthesis of sucrose. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 : 208-214
- Miron, D. dan A. A Schaffer. 1990. Sucrose Phosphate Synthase, Sucrose Synthase, and Invertase Activities in Developing Fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. And the Sucrose Accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. And Bonpl. *Plant Physiol.* 95: 623-627
- Riesmeier, J.W., B. Hirner, and W. B. Frommer. 1993. Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicates a Role in Phloem Loading. *The Plant Cell*, 5: 1591-1598
- Salisbury, F. B., dan C. W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Signora, L., N. Galtier, L. Skot, H. Lucas and C.H. Foyer (1998) Over-expression of sucrose phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* result in increased foliar sucrose/starch ratios and favour decreased foliar carbohydrate accumulation in plant after prolonged growth with CO enrichment. *J. Exp. Bot.* 49: 669-680
- Sugiharto, B., H. Sakakibara, Sumadi, I. Sugiyama (1997b) Differential expression of two genes for sucrose phosphate synthase in sugar cane: Molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiol.* 38: 961-965

- Sugiharto, B., Slameto dan P. Dewanti. 2008. Peningkatan Produksi Gula melalui Overekspresi Gen untuk SPS dan SUT pada Tanaman Tebu. Laporan penelitian Hibah kompetensi. Unpublish
- Wang, N.F.Q. (2003) Analysis of sugar transport-related gene products expressed in developing seeds of *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*. Dissertation of Universität Halle-Witterberg, Germany
- Weise, A., Barker, L., Kuhn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B., and Ward, J.M. 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with long affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. Plant Cell 12 : 1345 – 1355.
- Worrel, A.C., J.M. Bruneau, K. Summerfelt, M. Boersiy and T.A. Voelker. 1991. Expression of maize sucrose-phosphate synthase in tomato leaf carbohydrate partitioning. Plant Cell. 3 : 1121-1130

