



TRANSFORMASI GENETIK DAN EKSPRESI MUTAN *SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE* PADA TANAMAN TOMAT

Genetic Transformation and Expression of Sucrose Phosphate Synthase Mutant in Tomato Plant

Suwinda Fibriani^{1,2}, Inyana Agustien^{2,3}, Widhi Dyah Sawitri^{1,2,4,*}, Bambang Sugiharto^{1,2,3}

¹Prodi Magister Bioteknologi, Program Pascasarjana, Universitas Jember. Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

²UPT. Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi-CDAST, Universitas Jember. Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

³Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

⁴Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Jl. Flora Bulaksumur, Yogyakarta 55281

*Email: widhi.pasca@unej.ac.id

ABSTRACT

Sucrose phosphate synthase (SPS) is a key enzyme responsible for sucrose biosynthesis. In its regulation, SPS activity is modulated by an allosteric effector glucose-6-phosphate (G6P) suggested to have an ability to bind SPS N-terminus domain. To understand the role of N-terminus in regulating SPS, the SPS gene was mutated with the deletion of N-terminus domain (Δ N-SPS). The Δ N-SPS gen was transformed into tomato plants with 5% transformation efficiency. Three transgenic tomato plant 4.20, 5.5.1, and 5.10 were obtained and confirmed by PCR analysis. Transgenic tomato expression was characterized by enzymatic analysis. Result showed that the G6P allosteric regulation in transgenic Δ N-SPS had lost and the SPS activity increased by 2-fold compared to non-transgenic plant. This showed that N-terminus domain-deleted SPS could be actively expressed in plant.

Keywords: *enzyme, genetic transformation, N-terminus domain deletion, sucrose phosphate synthase, tomato*

ABSTRAK

*Sucrose phosphate synthase (SPS) merupakan enzim kunci yang bertanggung jawab dalam sintesis sukrosa. Dalam regulasinya, aktifitas SPS dipengaruhi oleh alosterik efektor glukosa-6-fosfat (G6P) yang diduga dapat berikatan pada domain N-terminus SPS. Untuk mengetahui peran N-terminus pada regulasi SPS, dilakukan mutasi SPS dengan penghilangan domain N-terminus (Δ N-SPS). Gen Δ N-SPS diinsersi pada tanaman tomat melalui transformasi genetik dengan efisiensi transformasi 5%. Tiga tanaman transgenik tomat (*event*4.20; 5.5.1; dan 5.10) didapatkan dan positif terkonfirmasi melalui analisis PCR. Ekspresi mutan dikarakterisasi melalui analisis enzimatik. Hasil menunjukkan bahwa tanaman tomat transgenik Δ N-SPS tidak dipengaruhi regulasi alosterik G6P dan aktifitas SPS 2 kali lipat lebih tinggi daripada tanaman bukan transgenik. Ini menunjukkan bahwa SPS dengan delesi domain N-terminus dapat terekspresi aktif pada tanaman.*

Kata Kunci: *delesi domain N-terminus, enzim, sucrose phosphate synthase, tomat, transformasi genetik*

PENDAHULUAN

Sukrosa berperan sangat penting, utamanya sebagai penyedia energi dan sumber karbon pada tanaman (Lemoine et al 2000; Ruan 2012). *Sucrose phosphate synthase* (SPS; EC 2.4.1.14) merupakan enzim kunci yang mengkatalisis terbentuknya sukrosa dimana reaksinya bersifat *irreversible* dari *uridine diphosphate glucose* (UDP-G) dan *fructose 6-phosphate* (F6P) menjadi *sucrose 6-phosphate* (S6P) dan UDP (Verma et al. 2011; Wang et al. 2018). SPS tidak hanya diregulasi dalam sel tanaman, tetapi juga terdapat pada sel prokariotik lain seperti *cyanobacteria* (But et al., 2013) dan bakteri non-fotosintetik (Diricks et al. 2015). Selain itu, SPS dipercaya dapat mempengaruhi partisi karbon pada tanaman. Hal ini dibuktikan dengan overekspresi yang telah dilakukan pada beberapa tanaman seperti pada transgenik arabidopsis, tomat, tembakau, tebu menunjukkan peningkatan translokasi sukrosa pada tanaman (Coleman et al. 2010; Maloney et al. 2015; Seger et al. 2015).

Mekanisme aktivitas SPS sangat kompleks karena melibatkan regulasi alosterik, fosforilasi, dan pengaruh kondisi sinar terang-gelap (Yonekura et al. 2013; Solis-Guzman et al. 2017). Regulasi alosterik SPS pada tanaman dikontrol oleh metabolit *glucose 6-phosphate* (G6P) dan inorganik fosfat (Pi) (Volkert et al. 2014). Regulasi fosforilasi dan defosforilasi SPS diatur pada residu asam amino serin posisi 162 (Ser162) pada tanaman jagung dan tebu (Sugiharto et al. 1997) serta posisi 158 (Ser158) pada tanaman bayam (Toroser et al. 1999). Aktifitas SPS meningkat pada siang hari dimana kondisi SPS mengalami de-fosforilasi dan metabolit G6P melimpah, sedangkan aktifitas SPS berkurang ketika SPS mengalami fosforilasi dan konsentrasi G6P berkurang pada malam hari (Huber dan Huber 1996).

Studi sebelumnya melaporkan bahwa adanya perbedaan ekspresi SPS di bakteri dan tanaman (Wang et al. 2017). Perubahan ini diasumsikan karena terputusnya domain N-terminus SPS selama proses kultivasi yang berlangsung di *E. coli*. Untuk mempelajari peran domain N-terminus pada regulasi alosterik SPS, maka mutan SPS dengan pemotongan domain N-terminus dianalisis secara *in vitro*. Hasil analisis tersebut

didapatkan bahwa SPS yang kehilangan domain N-terminus tidak dapat diaktivasi oleh G6P, tetapi spesifik aktifitas enzim meningkat hingga 10 kali lipat (Sawitri et al. 2016). Meskipun mutan tersebut lebih stabil dan memiliki prospek dalam pengembangan bioteknologi, tetapi karakterisasi dan ekspresi penghilangan domain N-terminus SPS perlu dikaji lebih lanjut pada tanaman.

Tujuan dari penelitian ini adalah dilakukan transformasi genetik dan karakterisasi tanaman transgenik untuk mempelajari ekspresi penghilangan domain N-terminus SPS secara *in vivo*. Pada studi ini, tanaman tomat digunakan sebagai tanaman model selama proses transformasi genetik (Sun et al. 2015).

BAHAN DAN METODE

Konstruksi mutan SPS pada vektor biner

Konstruksi gen Δ N-SPS dimulai dengan delesi sekitar 0,3 kB pada domain N-terminus gen full-SPS yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Sawitri et al. 2016). Full-SPS adalah gen *full-length* cDNA SPS tebu (SoSPS1) yang berukuran 3,3 kB dengan nomor aksesori AB001337 di GenBank (Sugiharto et al. 1997). Vektor pRI101-AN merupakan vektor biner yang mengandung gen penyandi ketahanan pada antibiotik *Kanamycin* yaitu *npfII* dengan promoter CaMV 35S (Gambar 1).

Tahap pertama konstruksi dilakukan dengan mengamplifikasi gen full-SPS dan gen Δ N-SPS dengan menggunakan reagen PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TAKARA, Japan) dan sepasang primer yang mengandung penambahan *NdeI* (*forward*) dan *AfeI* (*reverse*) di kedua sisi ujungnya. Kondisi suhu *polymerase chain reaction* (PCR) yaitu 94°C pada suhu *pre-denaturation* selama 3 menit, 98°C suhu *denaturation* selama 10 detik, 55°C suhu *anelling* selama 10 detik, 72°C suhu *extention* selama 3 menit dengan 35 siklus, dan 72°C suhu *final extention* selama 7 menit.

PCR produk Δ N-SPS yang dihasilkan mengandung restriksi enzim *NdeI* dan *AfeI*, selanjutnya dipotong dan diinsersikan pada sisi *NdeI* dan *SmaI* yang terdapat pada vektor biner pRI101-AN (TAKARA, Japan). Strategi konstruksi gen yang dilakukan adalah dengan pemotongan dan penyambungan pada bagian *NdeI* di sisi 5' (*upstream*) insert dan vektor. Sedangkan pada sisi 3' (*downstream*), insert

dipotong dengan *AfeI* dan vektor dipotong dengan *SmaI* selanjutnya diligasi melalui teknik dengan menghasilkan potongan yang komplement satu sama lainnya (*compatible cohesive ends*).

Konstruk yang telah didapat selanjutnya diperbanyak pada bakteri *E. coli* strain XL10-Gold, kemudian hasil konstruksi gen dikonfirmasi dengan pemotongan DNA dan sekuensing DNA. Konfirmasi melalui teknik pemotongan DNA dilakukan pemotongan dengan restriksi enzim *NdeI* untuk bagian *upstream* dan *EcoRI* di bagian *downstream* karena pada bagian *downstream* tidak lagi bisa memotong restriksi enzim *AfeI* maupun *SmaI*.

Transformasi genetik dan seleksi

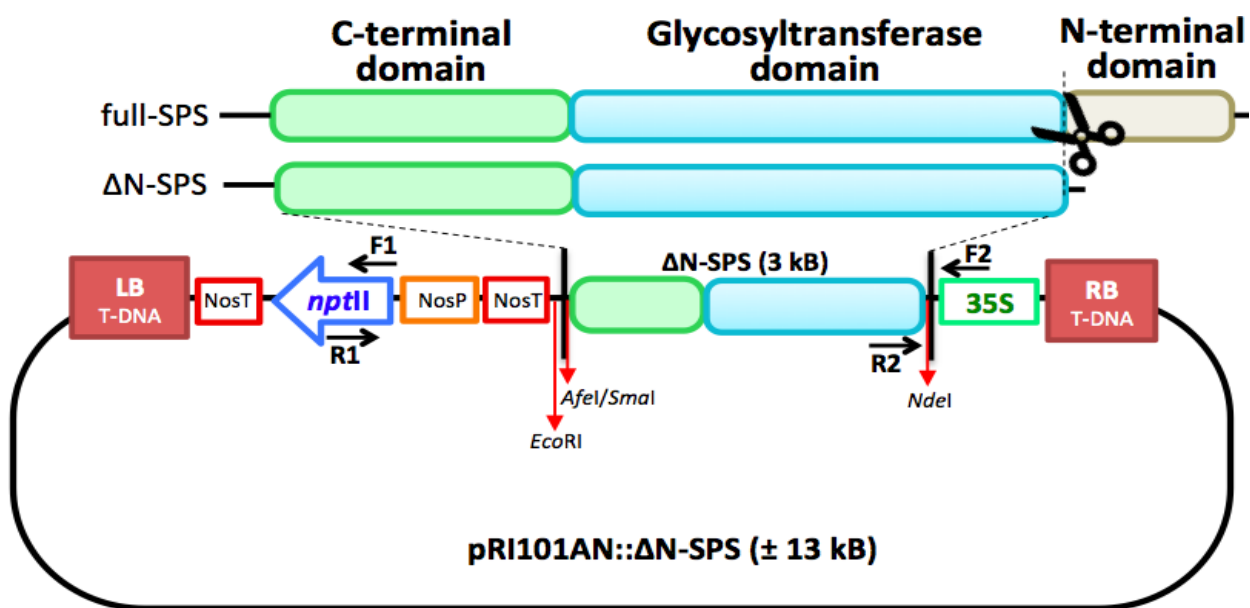
Tunas apikal tanaman tomat yang telah ditumbuhkan secara *in vitro* selama 14 hari digunakan sebagai eksplan dalam proses transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101. Gen yang akan ditransformasi meliputi full-SPS dan ΔN-SPS yang telah diinsersi pada vektor pRI101-AN. Metode transformasi yang digunakan sesuai dengan protokol yang telah deskripsi oleh Sugiharto (2018).

Transformasi gen full-SPS dan ΔN-SPS melalui infeksi *Agrobacterium* meliputi beberapa tahapan yang terdapat pada Gambar 2. Setelah proses inkubasi eksplan selama 30 menit dalam kultur *Agrobacterium* yang mengandung gen target, tahap ko-kultivasi dilakukan untuk memberi kesempatan infeksi *Agrobacterium*

dan memaksimalkan proses transfer T-DNA dari *Agrobacterium* ke tanaman (Gambar 2.1). Setelah eksplan diinkubasi selama 30 menit dengan kultur *Agrobacterium* yang mengandung gen target, selanjutnya dilakukan ko-kultivasi dimana eksplan ditumbuhkan dalam media basal MS mengandung *acetosyringone* selama 2 hari. Eksplan yang terinfeksi dipindahkan pada media seleksi MS basal mengandung 75ppm antibiotik *kanamycin* dan 500ppm *cefotaxime* (Gambar 2.2).

Seleksi tanaman transgenik dilakukan sebanyak 5 kali seleksi dan dibutuhkan 2 minggu setiap 1 kali seleksi. Tanaman yang mampu bertahan pada medium seleksi merupakan tanaman putatif transgenik (Gambar 2.3). Pada medium seleksi, cefotaxime berperan untuk mengeliminasi pertumbuhan bakteri *Agrobacterium* supaya tidak mengalami *over-growth*. Sedangkan mekanisme gen *nptII* terhadap ketahanan antibiotik yaitu dengan mensintesis enzim *nptII* dan menginaktivasi antibiotik melalui proses fosforilasi antibiotik jenis aminoglukosida seperti *kanamycin* (Breyer et al. 2014). Setelah dilakukan hingga seleksi ke-5, eksplan diaklimatisasi di dalam *growth chamber* selama 4 minggu dan dipindahkan ke rumah kaca.

Tahap selanjutnya adalah aklimatisasi dengan menumbuhkan tanaman putatif transgenik pada medium tanah di *growth-chamber* (Gambar 2.4) dan rumah kaca (Gambar 2.5 dan 2.6).



Gambar 1. Skema yang mewakili desain konstruk pRI101AN::ΔN-SP

Analisis genomik melalui PCR

Metode ekstraksi DNA dari daun tomat mengacu pada metode Dellaporta et al. (1983) dengan modifikasi minor dan sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Apriasti et al. (2018). DNA genom yang diekstraksi sebanyak 0.5 gram daun tanaman tomat yang ditumbuhkan di rumah kaca. Daun tomat tersebut digerus dengan penambahan nitrogen cair di dalam mortal dan pestel, selanjutnya dicampur buffer sebanyak 1 mL (2 kali volum) yang mengandung 100 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS, dan 5 mM 2-mercaptoethanol. Setelah diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit, sampel diberi 300µL 5M Potasium Asetat dan diinkubasi dalam es selama 10 menit. Pemisahan antara pellet dan supernatan dilakukan menggunakan

sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C, selanjutnya supernatan dipresipitasi dengan penambahan 0,8 kali volum isopropanol dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam. DNA yang terpresipitasi didapatkan dari sentrifugasi 12.000 rpm dan suhu 4°C setelah inkubasi -20°C selama 1 jam. Pellet DNA dilarutkan dalam 300µL buffer TE dan untuk menghilangkan kontaminan RNA, dilakukan penambahan RNase dan inkubasi selama 1 jam. Selanjutnya DNA dipresipitasi kembali menggunakan metode presipitasi etanol dan pellet DNA yang didapat dilarutkan dalam 20µL buffer TE.

Analisis PCR dilakukan untuk mendeteksi keberadaan gen target pada tanaman tomat putatif transgenik. Pada studi ini, analisis PCR yang ditargetkan adalah gen



Gambar 2. Tahap transformasi gen ΔN -SPS pada tanaman tomat: (1) ko-kultivasi; (2) eliminasi; (3) seleksi dengan medium mengandung Kanamycin; (4) aklimatisasi di growth-chamber; (5-6) aklimatisasi di rumah kaca

Tabel 1. Prosentase hasil efisiensi transformasi gen Δ N-SPS pada tanaman tomat

	Tahap transformasi						
	K	S1	S2	S3	S4	S5	A
Jumlah tanaman	298	231	231	217	173	150	15
Prosentase	100%	78%	78%	73%	58%	50%	5%

nptII (*neomycin phosphotransferase*) dan gen SPS (*full-length* SPS dan Δ N-SPS). Amplifikasi gen *nptII* menggunakan sepasang primer *nptII forward* (F1) 5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGC C-3' dan *reverse* (R1) 5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCC-3' dan reagen PCR *Master Mix* (Promega, USA), sedangkan untuk gen SPS menggunakan primer promoter *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S pada bagian *forward* (F2) 5'-GAA GAC GTT CCA ACC ACG-3' dan primer SPS P9 pada bagian *reverse* (R2) 5'-ACA CGG TAT GCG CAC AAT GTA-3' dengan reagen LA Taq DNA polymerase (TAKARA, Japan). Reaksi PCR dilakukan menggunakan mesin T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad, USA) dengan kondisi suhu *pre-denaturation* 95°C selama 3 menit, selanjutnya proses *denaturation* 95°C selama 30 detik, *anelling* selama 58°C selama 30 detik, *extention* 72°C selama 1 menit sebanyak 35 siklus, dan *final extention* 72°C selama 1 menit. Visualisasi produk PCR selanjutnya dielektroforesis menggunakan 1% agarose dengan *ethidium bromide* dan didokumentasikan menggunakan Gel Documentation System (Major Science, USA).

Ekspresi protein melalui aktifitas enzim

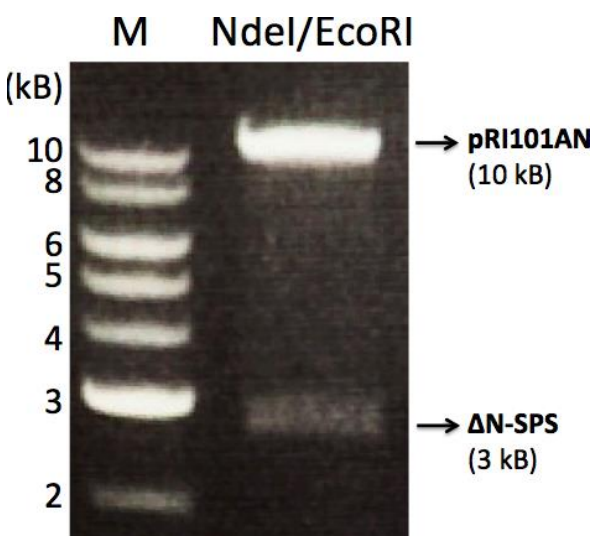
Enzim yang digunakan dalam uji aktifitas enzim didapatkan dari daun transgenik tomat. Metode ekstraksi mengacu pada Torres et al. 1989 dengan sedikit modifikasi (Sawitri et al. 2016; Neliana et al. 2019). Daun tomat digerus dengan nitrogen cair dan dicampur dengan modifikasi buffer ekstraksi sebanyak 3 kali volum [50mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 2,5mM DTT dan 10% PVPP]. Ekstrak tersebut selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Bagian supernatan diambil dan selanjutnya dipakai dalam pengukuran aktifitas enzim SPS.

Analisis biokimia dilakukan dengan mereaksikan supernatan dari ekstrak daun tanaman tomat dengan substrat UDP-G dan F6P yang diperlakukan dengan penambahan efektor alosterik G6P. Metode pengujian aktifitas SPS telah dideskripsikan pada penelitian sebelumnya (Huber et al. 1985; Sawitri et al. 2016; Sawitri et al. 2018b) dengan menggunakan *mixture buffer* yang mengandung 50mM MOPS-NaOH (pH 7,5) dan 20mM MgCl₂. Buffer tersebut dicampur dengan substrat 20mM F6P dan 20mM UDP-G, selanjutnya direaksikan dengan ekstrak enzim SPS selama 10 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 35µL 1M NaOH dan diinkubasi pada suhu 95°C selama 10 menit. Sukrosa yang terbentuk selanjutnya diwarnai dengan penambahan 125µL 0.1% Resolcinol dalam 95% Etanol, 375µL 30% HCl, dan diinkubasi pada suhu 85°C selama 5 menit. Warna yang terbentuk diukur dengan panjang gelombang 520nm menggunakan *microtiter plate reader* SH-1000 (Corona Electric, Japan).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konstruksi gen Δ N-SPS dan transformasi

Pada hasil konstruksi gen Δ N-SPS telah didapatkan bahwa vektor pRI101AN berukuran 10kB dan insersi gen Δ N-SPS



Gambar 3. Hasil pemotongan restriksi enzim NdeI/EcoRI. Marker (M) DNA yang digunakan adalah 1kB DNA Ladder (New England Biolabs, UK)

berukuran 3 kB dapat terpotong sempurna pada sampel hasil kloning setelah 2 jam inkubasi (Gambar 3). Hal ini membuktikan bahwa telah didapatkan klon positif yang mengandung gen Δ N-SPS. Selanjutnya sekuensing DNA dilakukan untuk memeriksa apakah urutan basa nukleotida pada klon positif tersebut sesuai dengan desain konstruk yang dibuat (data tidak ditampilkan). Klon positif tersebut selanjutnya digunakan untuk transformasi genetik sehingga menghasilkan tanaman transgenik tomat.

Pada penelitian ini, efisiensi metode transformasi genetik mulai tahap ko-kultivasi (K), seleksi (S) 1 hingga 5, dan aklimatisasi (A) tanaman putatif transgenik sebesar 5%. Sesuai dengan referensi yang ada bahwa prosentase efisiensi transformasi pada tanaman yang bagus adalah di atas 1% (Sugiharto 2018; Apriasti et al. 2018). Perhitungan hasil transformasi disajikan pada Tabel 1. Penurunan paling tinggi adalah perpindahan pada seleksi 5 (S5) ke tahap aklimatisasi yaitu terdapat penurunan sebesar 10 kali lipat. Hal ini mungkin disebabkan tanaman membutuhkan penyesuaian dari medium kultur jaringan ke medium tanah karena tanaman masih dalam kondisi tidak stabil.

Konfirmasi tanaman putatif transgenik

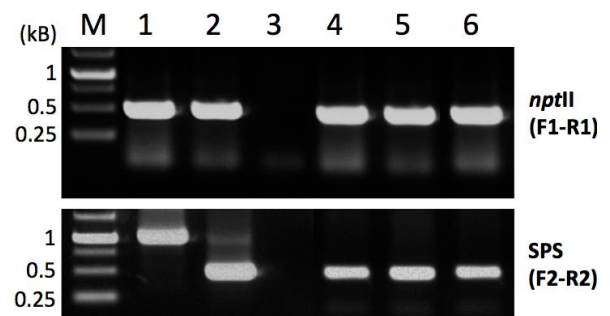
Untuk membuktikan bahwa tanaman putatif transgenik telah terinsersi gen target, analisis genomik menggunakan PCR digunakan dalam penelitian ini. Hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan pasangan primer F1-R1 dan F2-R2 menunjukkan bahwa tanaman tomat merupakan tanaman transgenik Δ N-SPS. Pada umumnya, *nptII* sering digunakan dalam mendeteksi tanaman transgenik (Yang et al. 2013). Pasangan primer F1-R1 mengamplifikasi DNA dengan ukuran sekitar 0,5 kb pada gen *nptII*, sedangkan primer F2-R2 mengamplifikasi DNA dari promoter CaMV 35S sampai dengan gen insersi SPS. Pada Gambar 4, hasil amplifikasi PCR yang menggunakan pasangan primer F2-R2 terdapat 2 macam band yaitu berukuran 1 kb dan 0,5 kb. Jika produk PCR yang dihasilkan sebesar 0,5 kb, maka gen yang terinsersi sesuai dengan gen target yaitu SPS yang telah kehilangan domain N-terminus (Δ N-SPS). Hal ini ditunjukkan sampel nomor 2, 4, 5, dan 6 pada Gambar 4. Sedangkan jika

sampel yang teramplifikasi sebesar 1 kb, maka dapat dipastikan bahwa sampel merupakan SPS dimana domain N-terminusnya masih belum hilang (full-SPS) dan ditunjukkan pada sampel nomor 1. Oleh karenanya sampel nomor 1 dijadikan sebagai kontrol pada penelitian ini.

Tiga macam sampel pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol yaitu sampel nomor 1, 2, dan 3 (Gambar 4). Sampel nomor 1 adalah plasmid pRI101AN dengan insersi full-SPS, sampel nomor 2 adalah plasmid pRI101AN dengan insersi Δ N-SPS, dan sampel nomor 3 adalah tanaman tomat *wild-type* (non-transgenik) yaitu tanaman yang tidak dilakukan transformasi genetik. Hasil transformasi genetik didapatkan 3 *event* tanaman tomat yang positif mengandung insersi gen Δ N-SPS. Hal ini menunjukkan bahwa ukuran amplifikasi gen menggunakan primer F2-R2 adalah 0,5 kb, sedangkan positif teramplifikasi gen *nptII* menggunakan primer F1-R1 (Gambar 4). Tiga *event* tanaman tomat positif transgenik tersebut adalah *event* 4.20 (sampel nomor 4), *event* 5.5.1 (sampel nomor 5), dan *event* 5.10 (sampel nomor 6). Ketiga tanaman transgenik Δ N-SPS tersebut selanjutnya dilakukan studi biokimia melalui analisis enzimatis untuk mengkonfirmasi apakah mutan Δ N-SPS pada tanaman merupakan enzim yang masih aktif seperti penelitian sebelumnya pada bakteri *E. coli* (Sawitri et al. 2016).

Analisis enzimatis tanaman mutan Δ N-SPS

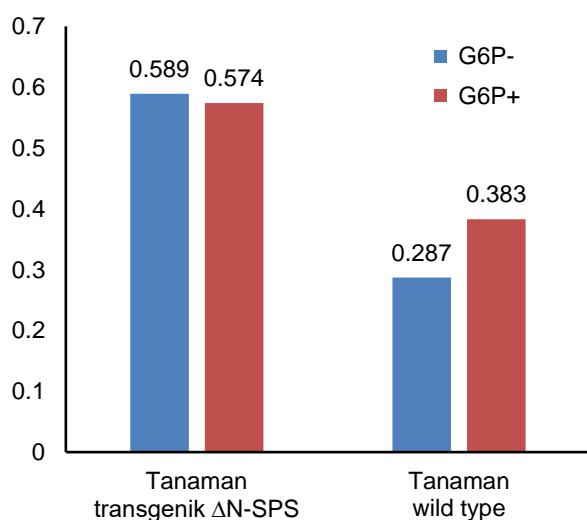
Studi biokimia melalui analisis aktifitas enzim pada tanaman positif transgenik Δ N-



Gambar 4. Hasil analisis PCR genomik DNA: (M) marker 1Kb DNA Ladder (Geneaid, Taiwan); (1) plasmid pRI101AN::full-SPS; (2) plasmid pRI101AN:: Δ N-SPS; (3) tanaman tomat non-transgenik; (4) tanaman tomat transgenik *event* 4.20; (5) tanaman tomat transgenik *event* 5.5.1; (6) tomat transgenik *event* 5.10

SPS perlu dilakukan untuk mengetahui regulasi SPS di tanaman. Grafik hasil analisis aktifitas enzim disajikan dalam Gambar 5. Warna biru menunjukkan aktifitas enzim SPS ketika tidak ditambahkan G6P dan warna merah menunjukkan aktifitas enzim SPS dengan penambahan G6P. Sesuai dengan referensi sebelumnya bahwa pada tanaman *wild-type* aktifitas enzim SPS diinduksi oleh metabolit G6P (Sawitri et al. 2016; Sawitri et al. 2018b).

Hal ini sesuai dengan hasil analisis enzimatis pada Gambar 5, yaitu menunjukkan adanya regulasi alosterik pada tanaman tomat yang tidak transgenik (*wild-type*). Aktifitas enzim pada *wild-type* dalam kondisi tanpa G6P menunjukkan sukrosa yang terbentuk sekitar 0,28 mM sukrosa/10 menit. Sedangkan dengan pemberian 5 mM G6P, produk sukrosa yang terbentuk mengalami peningkatan hingga 0,38 mM sukrosa/10 menit (Gambar 5). Sehingga dapat disimpulkan bahwa aktifitas SPS pada tanaman *wild-type* dipengaruhi oleh G6P. Tetapi ekspresi SPS pada tanaman tomat transgenik Δ N-SPS menunjukkan adanya perbedaan dari tanaman *wild-type*. Melalui data yang dihasilkan pada Gambar 5, tanaman transgenik Δ N-SPS secara dominan tidak dipengaruhi oleh G6P. Sukrosa yang terbentuk pada kondisi tidak diberi G6P yaitu sekitar 5,8 mM sukrosa/10 menit, sedangkan pada kondisi adanya G6P sebesar 5,7 mM sukrosa/10 menit. Hasil yang sama didapat



Gambar 5. Perbandingan aktifitas enzim SPS terhadap regulasi G6P antara tanaman transgenik Δ N-SPS dan tanaman *wild-type*

pada penelitian sebelumnya bahwa ketika gen Δ N-SPS diekspresikan pada *E. coli*, dimana SPS yang mengalami pemotongan domain N-terminus menunjukkan adanya penghilangan sifat alosterik dan tidak terpengaruh oleh G6P (Sawitri et al. 2016; Sawitri et al. 2018b).

Selain itu sesuai dengan referensi sebelumnya oleh Sawitri et al. (2016) bahwa aktifitas enzim pada transgenik Δ N-SPS lebih tinggi daripada *wild-type*, meskipun peningkatan ekspresinya tidak seperti pada bakteri *E. coli* maupun kultur sel eukaryotik (*insect cell*). Pada tanaman, ekspresi peningkatan aktifitas Δ N-SPS hanya mencapai sekitar 2 kali lipat lebih tinggi daripada *wild-type* pada kondisi tanpa G6P (Gambar 5).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa N-terminus SPS berpengaruh penting dalam regulasi sintesis sukrosa. Domain N-terminus SPS diasumsikan berinteraksi dengan G6P dan berfungsi sebagai *suppressor* aktifitas SPS (Sawitri et al. 2016). Tetapi ketika domain N-terminus dihilangkan maka SPS akan kehilangan interaksi dengan G6P, sehingga regulasi alosterik menjadi hilang. Tanaman *wild-type* mengandung *full-length* SPS asli dari tomat dimana domain N-terminus masih terdapat pada SPS. Oleh karenanya, aktifitas SPS tanaman *wild-type* berpengaruh terhadap G6P. Sedangkan Δ N-SPS pada tanaman transgenik tomat ekspresinya lebih dominan, maka sesuai prediksi bahwa aktifitasnya lebih tinggi dan tidak terpengaruh pada G6P. Hasil ini membuktikan bahwa mutasi penghilangan domain N-terminus masih menghasilkan enzim SPS yang aktif pada tanaman. Oleh karenanya, dapat diasumsikan bahwa gen Δ N-SPS berpotensi untuk menjadi target dalam pengembangan *genom editing*.

Kesimpulan

Melalui studi ini telah didapatkan tiga positif tanaman transgenik tomat dengan transformasi genetik yaitu tanaman transgenik *event* 4.20, 5.5.1, dan 5.10. Tanaman transgenik telah dikonfirmasi melalui analisis PCR dan karakterisasi tanaman transgenik dilakukan dengan analisis biokimia. Sesuai prediksi, hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa ekspresi Δ N-SPS pada tanaman transgenik tomat merupakan enzim yang sama aktifnya dengan ekspresi Δ N-SPS di *E. coli*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh hibah penelitian internal Universitas Jember tahun 2018 dengan skema Kelompok Riset (KeRis) atas nama Widhi Dyah Sawitri. Selain itu, penelitian ini juga sebagiandidandani dari Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi dengan skema Penelitian Unggulan Strategis Nasional (PUSNAS) Tahun 2018 atas nama Bambang Sugiharto.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriasti R, Widyaningrum S, Hidayati WN, Sawitri WD, Darsono N, Hase T, Sugiharto B (2018) Full sequence of the coat protein gene is required for the induction of pathogen-derived resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. *Mol Biol Rep* 45(6):2749–2758. doi: 10.1007/s11033-018-4326-1
- Baskaran S, Roach PJ, DePaoli-Roach, AA, Hurley TD (2010) Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(41):17563-17568. doi: 10.1073/pnas.1006340107
- Breyer D, Kepertekh L, Reheul D (2014) Alternatives to antibiotic resistance marker genes for in vitro selection of genetically modified plants – scientific developments, current use, operational access, and biosafety considerations. *CRC Crit Rev Plant Sci* 33(4):286-330. Doi: 10.1080/07352689.2013.870422
- But SY, Khmelenina VN, Reshetnikov AS, TrotsenkoYA (2013) Bifunctional sucrose phosphate synthase/phosphatase is involved in the sucrose biosynthesis by *Methylobacillus flagellatus* KT. *FEMS Microbiol Lett* 347(1):43-51. doi: 10.1111/1574-6968.12219
- Coleman HD, Beamish L, Reid A, Park JY, Mansfield SD (2010) Altered sucrose metabolism impacts plant biomass production and flower development. *Transgenic Res* 19(2):269-283. doi: 10.1007/s11248-009-9309-5
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Diricks M, De Bruyn F, Van Daele P, Walmagh M, Desmet T (2015) Identification of sucrose synthase in nonphotosynthetic bacteria and characterization of the recombinant enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(20), 8465–8474. doi: 10.1007/s00253-015-6548-7
- Huber SC, Kerr PS, and Rufty TW (1985) Diurnal changes in sucrose phosphate synthase activity in leaves. *Physiol Plant* 64:81-87
- Huber SC, Huber JL (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:431-444. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.431
- Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, Dedaldechamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Thevenot PC, Mauorousset L, Faucher M, Girusse C, Lemonnier P, Parrilla J and Durand M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci* 4(272):1-21. doi: 10.3389/fpls.2013.00272
- Maloney VJ, Park JY, Unda F, Mansfield SD (2015) Sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact in planta and promote plant growth and biomass accumulation. *J Exp Bot* 66(14): 4383-4394. doi: 10.1093/jxb/erv101
- Neliana IR, Sawitri WD, Ermawati N, Handoyo T, Sugiharto B (2019) Development of allergenicity and toxicity assessment methods for evaluating transgenic sugarcane overexpressing sucrose-phosphate synthase. *Agronomy* 9(1):23. doi: 10.3390/agronomy9010023
- Ruan YL (2012) Signaling role of sucrose metabolism in development. *Mol Plant* 5(4):763-765. doi: 10.1093/mp/sss046
- Sawitri WD, Narita H, Ishizaka-Ikeda E, Sugiharto B, Hase T, Nakagawa A (2016) Purification and characterization of recombinant sugarcane sucrose phosphate synthase expressed in *E. coli* and insect Sf9 cells: An importance of the N-terminal domain for an allosteric regulatory property. *J Biochem* 159(6): 599–607. doi: 10.1093/jb/mvw004
- Sawitri WD, Sugiharto B (2018a) Rekayasa Sucrose Phosphate Synthase untuk Meningkatkan Sukrosa Sebagai Sumber Karbon dan Energi Bagi Pertumbuhan

- Tanaman. In: Wikantika K (ed) Bunga Rampai ForMIND 2018. ITB Press, Bandung, Indonesia, pp 165-172. ISBN: 978-602-0705-19-4
- Sawitri WD, Afidah SN, Nakagawa A, Hase T, Sugiharto B (2018b). Identification of UDP-glucose binding site in glycosyltransferase domain of sucrose phosphate synthase from sugarcane (*Saccharum officinarum*) by structure-based site-directed mutagenesis. *Biophys Rev* 10(2):293–298. doi: 10.1007/s12551-017-0360-9
- Seger M, Gebril S, Tabilona J, Peel A, Sengupta-Gopalan, C (2014) Impact of concurrent overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS1) and sucrose phosphate synthase (SPS) on growth and development in transgenic tobacco. *Planta* 241(1):69-81. doi: 10.1007/s00425-014-2165-4
- Solis-Guzman MG, Arguello AG, Lopez BJ, Ruiz HLF, Lopez MJE, Sanchez CL, Carreon AY, Martinez TM (2017) Arabidopsis thaliana sucrose phosphate synthase (sps) genes are expressed differentially in organ and tissue, and their transcription is regulated by osmotic stress. *Gene expr patterns* 25-26:92-101. doi: 10.1016/j.gep.2017.06.001
- Sugiharto B, Sakakibara H, Sumadi, Sugiyama T (1997). Differential expression of two genes for sucrose-phosphate synthase in sugarcane: Molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiol* 38(8):961-965. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029258
- Sugiharto B (2018) Chapter 8: Biotechnology of drought-tolerant sugarcane. In: Oliveira AD (ed) *Sugarcane Technology and Research*. IntechOpen, Florida, USA, pp 139-165. doi: 10.5772/intechopen.69564
- Sun S, Kang XP, Xing XJ, Xu, XY, Cheng J, Zheng SW, Xing GM (2015) Agrobacterium-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. *Biotechnol Biotechnol Equip* 29(5):861-868 doi: 10.1080/13102818.2015.1056753
- Toroser D, McMichael Jr R, Krause KP, Kurrect J, Sonnewald U, Stitt, Hubber SC (1999) Site-directed mutagenesis of serine-158 demonstrated its role in spinach leaf sucrose-phosphate synthase modulation. *Plant J* 17(4):407-413. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00389.x
- Torres WK, Kerr PS, Huber SC (1987) Isolation and characterization of multiple form of maize leaf sucrose-phosphate synthase. *Physiol Plantarum* 70:653-658
- Verma AK, Upadhyay SK, Verma PC, Solomon S, Singh SB (2011) Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars. *Plant Biol* 13(2):325-332. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00379.x
- Volkert K, Debast S, Voll LM, Schießl I, Hofmann J, Schneider S, Börnke F (2014) Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in Arabidopsis thaliana limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *J Exp Bot* 65(18):5217-5229. doi: 10.1093/jxb/eru282
- Wang J, Du J, Mu X, Wang P (2017) Cloning and characterization of the *Cerasus humilis* sucrose phosphate synthase gene (*ChSPS1*). *Plos One* 12(10): e0186650. doi: 10.1371/journal.pone.0186650
- Wang D, Zhao J, Hu B, Li J, Qin Y, Chen L, Qin Y, Hu G (2018) Identification and expression profile analysis of the sucrose phosphate synthase gene family in *Litchi chinensis* Sonn. *PeerJ* 6:e4379. doi: 10.7717/peerj.4379
- Yang L, Wang C, Wang L, Xu C, Chen K (2013) An efficient multiplex PCR assay for early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in transgenic plant material. *Turk J Agric For* 37:157-162. doi: 10.3906/tar-1009-1265
- Yonekura M, Naohiro A, Hirose T, Onai K, Ishiura M, Okamura M, Ohsugi R, Ohto C (2013) The promoter activities of sucrose phosphate synthase genes in rice, *OsSPS1* and *OsSPS11*, are controlled by light and circadian clock, but not by sucrose. *Front Plant Sci* 4(31):1-8. doi: 10.3389/fpls.2013.00031