

Peranan Sucrose Phosphate Synthase (SPS) dan Acid Invertase (AI) Internoda Tebu (*Saccharum officinarum* L.) dalam Akumulasi Sukrosa

MISWAR¹, BAMBANG SUGIHARTO², TRI HANDOYO¹, DAN SRI AYU MADE³

¹Fakultas Pertanian Universitas Jember

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam Universitas Jember

³Alumni Fakultas Pertanian Universitas Jember

ABSTRACT

Roles of Sucrose Phosphate Synthase (SPS) and Acid Invertase (AI) of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Internodes in Sucrose Accumulation

Sucrose content is an important component of yield in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice and its synthesis is determined by the activity of Sucrose phosphate synthase (SPS; EC. 2.4.1.14). This enzyme catalyzes the penultimate reaction of the formation of sucrose from *fructose-6-phosphate* (F6P) and *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). Sucrose is synthesized on leaf and translocated into stalk at where it is accumulated to be accumulated it. In contrast to SPS, acid invertase (AI) is an enzyme that hydrolyze sucrose to glucose and fructose. The ability of sugarcane to accumulate the sucrose in stalk is determined by the differences between SPS and AI activities. This study was aimed know role of the internodes SPS and AI in sucrose accumulation in the internodes of some sugarcane varieties. SPS, AI and sucrose were extracted from internodes 1, 3 and 5 of 9 month old sugarcane. The results showed that sucrose content for all varieties increased concomitant with the rise in the age of internodes. The decrease in AI activity in internode caused the increase in sucrose content in internodes. Meanwhile, higher sucrose content in the older internodes was not followed by higher in SPS activity. Generally, there was strong negative correlation between sucrose content of internodes with SPS and AI activity. In conclusion, the ability of sugarcane to accumulate sucrose at internodes was primary determined by AI activity, while SPS activity had a small role on sucrose accumulation at internodes.

Keywords: sugarcane, sucrose phosphate synthase, acid invertase, sucrose, internodes

PENDAHULUAN

Sukrosa merupakan produksi akhir asimilasi karbon (C) pada proses fotosintesis yang terjadi di daun (Kim *et al.*, 2000) dan bentuk karbohidrat yang mudah ditransportasikan ke jaringan simpan atau *sink tissues* (Cheng *et al.*, 1996). Selain berfungsi dalam penyediaan energi dan kerangka karbon, sukrosa juga berperan dalam pengaturan ekspresi gen lainnya (Koch, 1996; Ohto *et al.*, 2001), partisi karbon asimilate (Lunn and Hatch, 1997; Grof *et al.*, 1998) serta pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2003). Dalam tanaman *sucrose phosphate synthase* (SPS; EC 2.3.1.1) merupakan enzim utama yang menentukan biosintesis sukrosa yang berlangsung di mesofil daun. Enzim ini mengkatalisis pembentukan *sucrose-6-phosphate*

(suc6P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). Selanjutnya *phosphate* pada suc6P diputus oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) sehingga dihasilkan sukrosa (Langenkemper *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005). Besar kecilnya aktivitas SPS menentukan kandungan sukrosa daun (Grof *et al.*, 1998) dan berkorelasi positif dengan rasio sukrosa:pati daun (Galtier *et al.*, 1995).

Akumulasi sukrosa pada batang tebu dimulai pada internoda yang sedang mengalami proses pemanjangan (*elongation*) sampai pada internoda yang proses pemanjangannya berhenti (Lingle, 1997; Rose & Botha, 2000). Besarnya jumlah sukrosa yang dapat diakumulasi pada batang sangat ditentukan oleh selisih antara proses sintesis dan degradasi sukrosa

yang terjadi di daun. Menurut Zhu *et al.* (1997) bahwa kandungan sukrosa batang tebu sangat berkaitan dengan besarnya perbedaan antara aktivitas SPS dan acid invertase (AI). Pada internoda batang tebu yang baru memulai proses pemanjangan mempunyai kandungan sukrosa yang rendah dan aktivitas AI sangat tinggi (Botha *et al.*, 2001). Seiring dengan semakin dewasanya internoda, kandungan sukrosa semakin meningkat dan aktivitas AI semakin menurun. Pada tanaman tebu aktivitas invertase merupakan kunci utama pengaturan akumulasi sukrosa pada batang (Gayler & Glasziou, 1972).

Sukrosa pada jaringan non fotosintetik yang sedang aktif tumbuh akan mengalami proses metabolisme yaitu hidrolisis dan resintesis. Dali *et al.* (1992) menduga bahwa sukrosa yang dibentuk di daun tomat akan dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh invertase setelah sampai di buah. Sukrosa kemudian dibentuk kembali (resintesis) dari glukosa dan fruktosa yang dikatalisis oleh SPS buah (Miron and Schaffer, 1991). Demikian pula halnya dengan buah kiwi (Fung *et al.*, 2003) dan buah anggur (Lowell *et al.*, 1989) terjadi resintesis sukrosa pada buah yang dikatalisis oleh SPS. Disini tampak peranan SPS buah dalam pembentukan sukrosa yang diakumulasi pada buah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara aktivitas SPS dan AI dengan kandungan sukrosa batang beberapa varietas tebu.

METODE PENELITIAN

Bahan Tanaman

Varietas tebu yang digunakan dalam penelitian ini adalah PS 41, PS 59, PS 60, PS 82-887, PS 77-1553, PS 82-3605, POJ 3016, RT 3-391, AC 6852, BOT 54 DAN V 4001 (didapat dari P3GI Pasuruan). Bibit bagal dikecambahkan terlebih dahulu pada media pasir selama \pm 1 bulan, kemudian bibit ditanam pada media dalam pot (diameter 45 cm) sampai tanaman berumur 9 bulan. Pengambilan sampel dilakukan setelah tanaman tebu berumur 9 bulan dan diambil pada pukul 11.00. Sampel batang dibagi menjadi lima berdasarkan nomor internoda dari pucuk. Internoda ke 1 ditandai dengan adanya daun muda yang masih menggulung, selanjutnya

dibawah internoda ke-1 adalah internoda ke 2, ke 3 dan seterusnya. Sampel yang digunakan adalah internoda ke 1, ke 3 dan ke 5 dan disimpan dalam nitrogen cair sampai dilakukan analisis.

Ekstraksi Enzim

Delapan gram sampel batang beku digerus menggunakan *mortar-stumper* dingin dengan bantuan N_2 cair sampai menjadi tepung. Sampel tepung kemudian ditambah bufer ekstraksi sebanyak 2 kali volume dari berat sampel dan dicampur sampai menjadi homogenat. Bufer ekstraksi yang digunakan mengandung 50 mM Mops-NaOH (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 2% PEG 20.000, 0,2% Triton X-100 dan 10% poly vinil pirolidone (PVP). Homogenat disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4°C selama 10 menit dan supernatan diambil. Protein terlarut dalam supernatan dipresipitasi dengan 4% PEG 6000 dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil, kemudian dilakukan presipitasi lagi dengan 6% PEG 6000 dan disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm, 4°C selama 20 menit. Pelet (endapan protein) hasil presipitasi terakhir dilarutkan dengan bufer A yang mengandung 50 mM Mops-NaOH (7,5), 10 mM $MgCl_2$, 0,1% Tween 80, 10% etilen glikol dan 2,5 mM DTT dan digunakan sebagai sumber enzim. Sebelum dilakukan analisis larutan enzim disaring dengan kolom kromatografi sephadex G-25 pada suhu 4°C.

Penentuan Aktifitas Sukrosa Phosphate Synthase (SPS)

Aktifitas SPS ditentukan berdasarkan jumlah sukrosa yang dibentuk selama reaksi sesuai dengan metode Kohler *et al.* (1988). 70 μ l larutan pengujian (*reaction mixture*) yang mengandung 50 mM Mops-NaOH (pH 7,5), 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Fruktosa-6-Phosphate, 100 mM Glukosa-6-Phosphate, 100 mM UDP-Glukosa ditambah 50 μ l larutan enzim. Reaksi dilakukan pada suhu 30°C selama 0, 10 dan 20 menit dan reaksi dihentikan dengan penambahan 70 μ l 0,1 N NaOH, lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit.

Jumlah sukrosa yang terbentuk selama reaksi ditentukan dengan menggunakan resorcinol (Kohler *et*

al., 1988). Aktivitas SPS didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat menghasilkan sukrosa (mM) per menit pada suhu 30°C.

Penentuan Aktifitas Acid Invertase (AI)

Aktivitas AI ditentukan berdasarkan jumlah gula reduksi yang dihasilkan dari sukrosa selama reaksi berdasarkan metode Arai *et al.* (1991). 250 µl larutan penguji yang mengandung 25 mM Mops-NaOH (pH 5,5), 100 mM Sukrosa ditambah dengan 50 µl larutan enzim dan lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 0, 10 dan 20 menit. Jumlah gula reduksi yang dihasilkan selama reaksi diukur dengan menggunakan DNS. Aktifitas AI didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang menghasilkan gula reduksi (mM) dari sukrosa per menit pada suhu 30°C.

Penentuan Kandungan Sukrosa

Sukrosa diekstraksi dengan 80% etanol, lalu diuapkan dengan *rotari evaporator*. Hasil penguapan dilarutkan dengan air destilasi dan kandungan sukrosa diukur dengan menggunakan metode resorcinol. Seratus mikroliter larutan sukrosa sampel ditambah dengan 250 µl 0,1% resorcinol dan 750 µl 30% HCl, kemudian dipanaskan pada suhu 80°C selama 8 menit. Setelah dingin diukur dengan spektrofotometer pada λ 520 nm dan jumlah sukrosa dihitung dengan menggunakan kurva standar sukrosa.

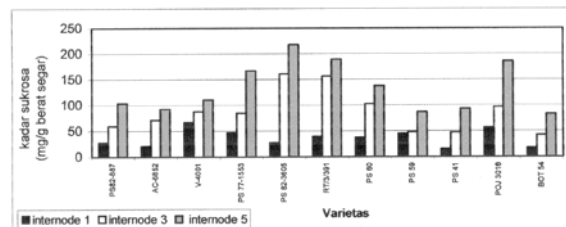
HASIL DAN PEMBAHASAN

Akumulasi Sukrosa di Batang

Pada tanaman tebu sukrosa hasil fotosintesis di daun pada akhirnya akan disimpan di batang. Kemampuan tebu dalam mengakumulasi sukrosa di batang sangat bervariasi tergantung pada varietas dan cara budidayanya. Kandungan sukrosa pada masing-masing internoda dalam satu varietas juga berbeda tergantung pada umurnya. Pada penelitian ini, diamati kandungan sukrosa pada internoda 1, 3 dan 5 pada 11 varietas tebu, seperti tampak pada Gambar 1.

Pada Gambar 1 ditunjukkan bahwa pada semua varietas tebu yang digunakan semakin tua umur internoda batang, kandungan sukrosa juga semakin tinggi. Dari

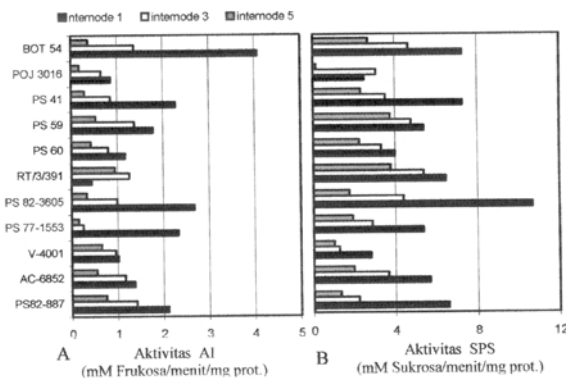
kesebelas varietas, kandungan sukrosa pada internoda 5 yang tertinggi adalah varietas PS82-3605, lalu diikuti oleh varietas RT3-391, POJ 3016 dan PS77-1553.



internoda 1,3 dan 5

Aktivitas SPS dan AI

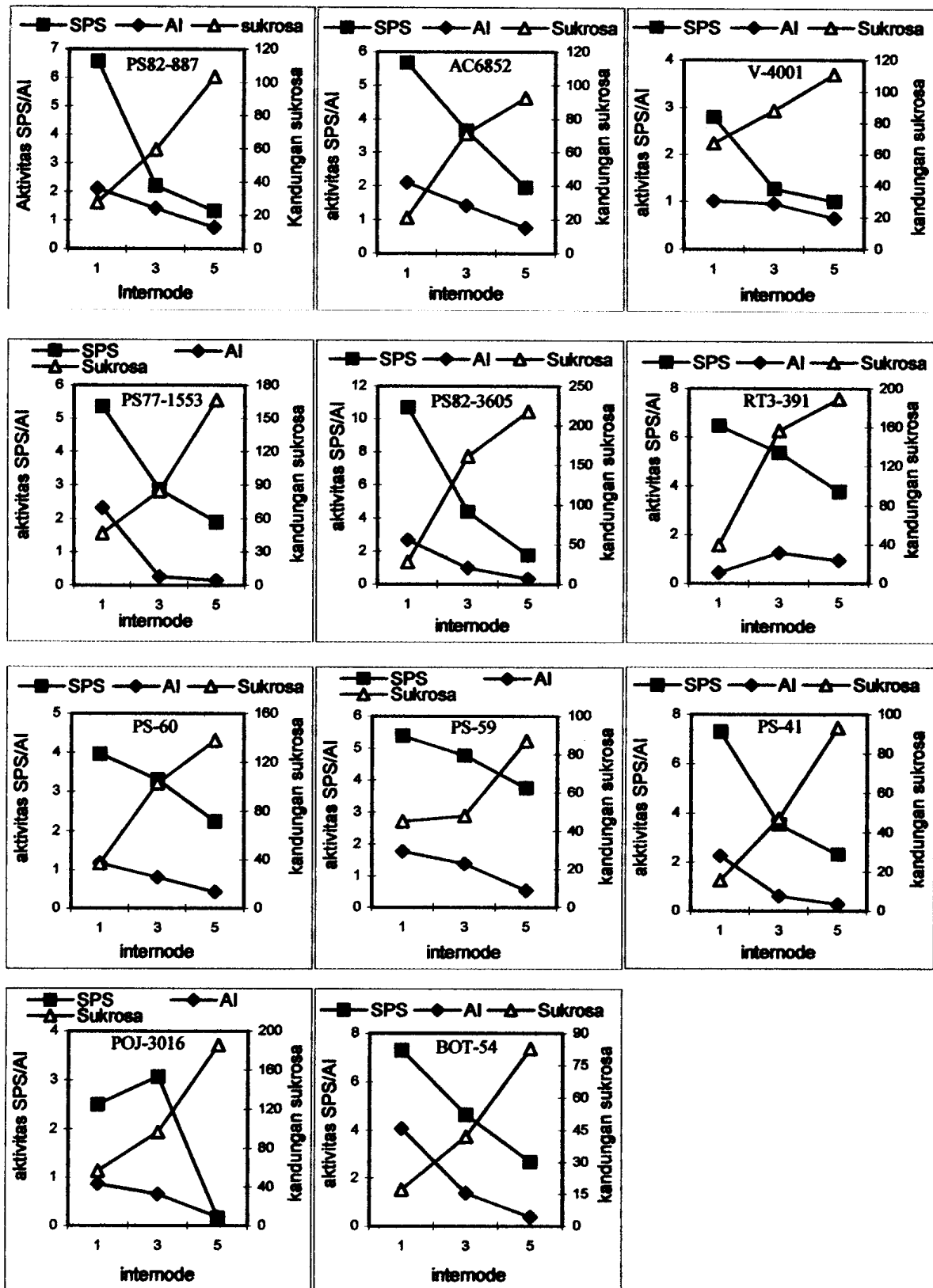
SPS merupakan enzim utama yang berperan dalam biosintesis sukrosa dalam tanaman, sehingga aktivitas SPS yang tinggi di daun dapat menghasilkan sukrosa yang besar pula. Sukrosa hasil biosintesis di daun diangkut ke batang, kemudian dihidrolisis oleh AI digunakan untuk proses pertumbuhan, sebagian hasil hidrolisis diresintesis kembali oleh SPS batang menjadi sukrosa.



Gambar 2. Aktivitas SPS (A) dan AI (B) pada internoda batang tebu

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas SPS dan AI di batang tebu menurun dengan semakin tuanya umur internoda batang seperti terlihat pada Gambar 2. Aktivitas SPS internoda 1 tertinggi terdapat pada varietas PS82-3605, sedangkan untuk AI terdapat pada varietas BOT-54.

Jika dihubungkan antara aktivitas SPS dan AI jika



Gambar 3. Hubungan antara kandungan sukrosa batang dengan aktivitas SPS dan AI batang pada sebelas varietas tebu.

dengan kandungan sukrosa tampak bahwa semakin rendah aktivitas SPS maupun AI maka semakin tinggi kandungan sukrosa batang (Gambar 3). Berdasarkan analisis korelasi pada semua varietas bahwa hubungan antara kandungan sukrosa batang dengan aktivitas SPS dan AI korelasi negatif, kecuali hubungan antara kandungan sukrosa dengan AI pada varietas RT3-391 berkorelasi positif (Tabel 1). Pada semua varietas tebu yang digunakan menunjukkan bahwa aktivitas SPS lebih besar dibandingkan aktivitas AI.

Kemampuan tanaman tebu dalam mengakumulasi sukrosa ditentukan oleh selisih antara aktivitas biosintesis dan degradasi sukrosa. Pada tanaman tebu batang yang terdiri dari internoda merupakan tempat untuk mengakumulasi sukrosa. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tua umur internoda maka semakin besar sukrosa yang diakumulasi (Gambar 1). Hasil yang serupa juga didapat oleh Zhu *et al.* (1997) dan Botha & Black (2000) bahwa pada internoda muda kandungan sukrosa lebih rendah dibandingkan dengan yang lebih dewasa. Menurut Lingle *et al.* (2001) bahwa internoda ke 1 sampai ke 4 merupakan internoda yang sedang mengalami proses pemanjangan, sedangkan internoda ke 5 dan seterusnya telah memanjang secara penuh. Hal ini disebabkan pada internoda muda yang sedang mengalami proses pemanjangan memerlukan energi dan kerangka karbon untuk pertumbuhannya.

Energi dan kerangka karbon tersebut disediakan oleh proses respirasi dimana sukrosa digunakan sebagai substrat dalam jalur glikolisis dan siklus krebs.

Sukrosa yang disintesis di daun tebu ditranslokasikan ke jaringan/organ penyimpan (batang) melalui proses *loading* dan *unloading* mekanisme. Di batang sukrosa akan mengalami proses metabolisme lebih lanjut yaitu hidrolisis dan resintesis. Pada internoda batang yang masih muda jumlah energi dan kerangka karbon diperlukan dalam jumlah besar, sehingga jumlah sukrosa yang dihidrolisis juga semakin besar yang mengakibatkan kandungan sukrosa batang menjadi kecil. Aktivitas AI yang menghidrolisis sukrosa pada batang menentukan jumlah sukrosa yang dapat diakumulasi (Botha *et al.*, 2001). Semakin kecil aktivitas AI pada batang akan meningkatkan kandungan sukrosa di batang. Hal ini berlawanan dengan aktivitas SPS batang, dimana semakin besar kandungan sukrosa di batang justru semakin kecil aktivitas SPS. Berdasarkan hasil penelitian ini diduga bahwa aktivitas SPS batang secara langsung tidak mempengaruhi besarnya sukrosa yang dapat diakumulasi di batang. Ini menunjukkan bahwa aktivitas SPS batang sangat kecil perannya dibandingkan aktivitas AI dalam menentukan besar kecilnya kandungan sukrosa batang tebu. Ini berlawanan dengan hasil penelitian yang didapat oleh Botha &

Tabel 1. Hubungan antara kandungan sukrosa dengan aktivitas SPS dan AI batang pada sebelas varietas tebu

Varietas	SPS		AI	
	Pers. regresi	r	Pers. regresi	r
PS82-887	$y = -12.109x + 104.28$	-0.90	$y = -55.872x + 142.84$	-0.99
AC-6852	$y = -19.460x + 134.82$	-0.98	$y = -53.145x + 137.01$	-0.98
V-4001	$y = -20.681x + 123.50$	-0.92	$y = -104.88x + 180.28$	-0.94
PS 77-1553	$y = -30.787x + 203.37$	-0.90	$y = -38.619x + 134.58$	-0.77
PS 82-3605	$y = -21.224x + 254.54$	-1.00	$y = -80.611x + 242.98$	-1.00
RT3-391	$y = -53.223x + 405.13$	-0.91	$y = 157.550x - 10.504$	+0.83
PS 60	$y = -55.723x + 269.36$	-0.95	$y = -133.81x + 198.96$	-0.98
PS 59	$y = -26.883x + 184.45$	-0.95	$y = -35.541x + 103.56$	-0.97
PS 41	$y = -13.879x + 112.71$	-0.92	$y = -32.411x + 86.05$	-0.89
POJ 3016	$y = -37.576x + 184.73$	-0.88	$y = -188.13x + 218.97$	-1.00
BOT 54	$y = -14.002x + 115.65$	-0.97	$y = -16.063x + 78.40$	-0.92

Black (2000) dimana aktivitas SPS pada internode semakin meningkat dengan semakin tuanya umur internode. Demikian pula pada buah tomat, kandungan sukrosa yang tinggi di buah tomat diikuti dengan tingginya aktivitas SPS (Dali *et al.*, 1992). Lebih lanjut dijelaskan bahwa pada buah tomat, sukrosa yang telah dihidrolisis oleh AI akan disintesis kembali oleh SPS buah. Pada semua varietas, hubungan antara aktivitas SPS dan AI batang dengan kandungan sukrosa batang mempunyai korelasi negatif (Tabel 1). Semakin tua umur internoda batang maka semakin rendah pula aktivitas metabolismenya, sehingga tidak memerlukan energi dan kerangka karbon yang banyak untuk pertumbuhan dan perkembangannya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa kemampuan tanaman tebu untuk mengakumulasi sukrosa di batang lebih banyak ditentukan oleh aktivitas SPS daun dan translokasinya oleh protein *sucrose transporter* (protein SUT), sedangkan peran SPS batang sangat kecil. Sebaliknya aktivitas AI batang secara langsung ikut menentukan besarnya sukrosa yang dapat diakumulasi di batang disamping aktivitas AI di daun.

Saran

Untuk mengetahui kemampuan tanaman tebu dalam mengakumulasi sukrosa secara keseluruhan, perlu dilakukan analisis aktivitas enzim yang memecah sukrosa (sucrose synthase, acid invertase, neutral invertase) pada daun.

DAFTAR PUSTAKA

Arai, M., H. Mori, & H. Imaseki. 1991. Roles of Sucrose-4-Metabolizing Enzymes in Growth Seedlings, Purification of Acid Invertase from Growing Hypocotyls of Mung Bean Seedlings. *Plant Cell Physiol* 32: 1292 – 1298.

Botha, E.C., B.J.B. Sawyer, & R.G. Birch. 2001. Sucrose metabolism in the culm of transgenic sugarcane with reduced soluble acid invertase

activity. *Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol.* 24 : 588-591

- Botha, F.C., & K.G. Black (2000) Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane. *Aust. J. Plant Physiol.* 27 : 81-85
- Chen, S., M. Hajirezaei, M. Peisker, H. Tschiersch, U. Sonnewald, and F. Bornke (2005) Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta* 221 : 479-492
- Cheng, W.H., K. H. Im, & P. S. Chourey (1996) Sucrose phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transitions in maize leaf. *Plant Physiol.* 111 : 1021-1 029
- Dali, N., D. Michaud, & S. Yelle (1992) Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sugar accumulation in sucrose accumulating tomato fruits. *Plant Physiol.* 99 : 434-438
- Fung, R.W.M., G. L. Kamper, R.C. Gardner, & E. MacRae (2003) Differential expression within an SPS gene family. *Plant Sci.* 164 : 450-470
- Galtier, N., C.H. Foyer, E. Murchie, R. Alred, P. Quick, T.A. Voelker, C. Thepenier, G. Lasceve, and T. Betsche (1995) Effect of light and atmospheric carbon dioxide enrichment on photosynthesis and carbon partitioning in leaves tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants over-expression sucrose phosphate synthase. *J. Exp. Bot.* 46 : 1335-1344
- Gayler, K.R., & K.T. Glasziou (1972) Physiological function of acid and neutral invertase in growth and sugar storage in sugarcane. *Plant Physiol.* 27 : 25-31
- Grof, C.P.L., J.L. Huber, S.D. McNeil, L.E. Lunn & J.A Campbell (1998) A modified assay method show leaf sucrose phosphate synthase activity is correlated with leaf sucrose content across a range of sugarcane varieties. *Aust. J. Plant Physiol.* 25 : 499-502
- Kim, J.Y., A. Mahe, J. Brangeon, & 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.
- Koch, K. E. (1996) Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 47 : 509-540
- Kohler, J., E. Komor, M. Thom, and A. Maretzki (1988) Activity of sucrose phosphate synthase in sugarcane leaves. *Phytochemistry* 27 : 1605-1608
- Langenkamper, G., R.W.M. Fung, R.D. Newcomb, R.G. Atkinson, R.C. Gardner, & E.A. MacRae (2002) Sucrose phosphate genes in plant belong to three different families. *J. Mol. Evol.* 54 : 322-332
- Lingle, S.E. (1997) Seasonal internoda development and sugar metabolism in sugarcane. *Crop Sci.* 37 : 1222-1227
- Lingle, S.E., A.B. Allen, & M.I. Valdez-Garza (2001) Comparison of sucrose metabolism and gene expression in two diverse *Saccharum officinarum* genotypes. *Proc. Int Soc. Sugar Cane Technol.* 24 : 323-326
- Lowell, C.A., P.T. Tomlinson, and K.E. Koch (1989) Sucrose metabolizing enzymes in transport tissue and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiol.* 90 : 1394-1402
- Lunn, J.E. and M.D. Hatch (1997) The role of sucrose phosphate synthase in the control photosynthate partitioning in *Zea mays* leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 24 : 1-8
- Miron, D., and A.A. Schaffer (1991) 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
- Ohto, M., K. Onai, Y. Furkawa, E. Aoki, T. Araki, and K. Nakamura (2001) Effect of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127 : 252-261
- Rose, S. and F.C. Botha (2000) Distribution patterns of neutral invertase and sugar content in sugarcane internodal tissues. *Plant Physiol. Biochem.* 38 : 819-824
- Zhu, Y.J., E. Komor, and P.H. Moore (1997) sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol.* 115 : 609-616