

**AKTIVITAS SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE KULTIVAR TEBU (*Saccharum officinarum* L.)
TOLERAN DAN SENSITIF SELAMA CEKAMAN KEKERINGAN**

**SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE ACTIVITY ON TOLERANCE AND SENSITIVE SUGARCANE
CULTIVAR DURING WATER STRESS**

Yudi Rinanto¹⁾ dan Bambang Sugiharto²⁾

¹⁾Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Univeritas Sebelas Maret

Email : rinanto61@yahoo.co.id

²⁾Fakultas Pertanian, Universitas Negeri Jember

ABSTRAK

Penelitian telah dilaksanakan untuk mengkaji aktivitas enzim SPS (*Sucrose Phosphate Synthase*) dan ekspresi gen SPS tanaman tebu pada kondisi cekaman kekeringan. Sebanyak 3 varietas masing-masing mewakili toleran, moderat dan peka kekeringan ditanam dalam polibag dengan media tanah masing-masing diulang 5 kali. Setelah berumur 2 bulan diperlakukan cekaman kekeringan dengan cara tanpa diberi pengairan sampai menunjukkan gejala daun menggulung pada daun pertama (K1). Sampel daun diekstraksi untuk pengujian lebih lanjut.

Pengujian enzimatik dilakukan menggunakan sampel daun pertama (K1) terhadap ke 3 varietas masing-masing diulang 3 kali, setelah diperlakukan cekaman kekeringan kemudian dilakukan analisa. Pengujian enzimatik dilakukan terhadap enzim SPS yang merupakan enzim penentu yang berperan mengakumulasi sukrosa dalam batang tebu.

Hasil penelitian menunjukkan respon aktivitas SPS varietas tebu toleran, moderat dan peka terhadap cekaman kekeringan berbeda-beda. Aktivitas SPS ke tiga varietas meningkat selama cekaman kekeringan, dengan kecenderungan M442-51 menghasilkan aktivitas lebih tinggi dibanding dua varietas lainnya.

Ekspresi gen SPS mengalami peningkatan selama cekaman kekeringan. Perlakuan hormon BA (*Benzil Adenin*), JA (*Jasmonic Acid*) dan IAA (*Indole Acetic Acid*) tidak mampu meningkatkan ekspresi gen SPS, *Rubisco* maupun *GS* (*Glutamin Synthase*). Cekaman kekeringan dan ABA menyebabkan peningkatan aktivitas SPS. Berdasarkan hasil penelitian ini diusulkan untuk menggunakan SPS sebagai indikator fisiologis faktor ketahanan kekeringan pada tebu.

Kata Kunci : tebu, cekaman kekeringan dan aktivitas SPS

ABSTRACT

The study was conducted to test of sucrose phosphate synthase (SPS) activity and the expression of SPS gene of sugarcane plant during water stress. 3 number of sugarcane varieties --- tolerance, moderate and sensitive --- was grown on polybag with soil medium, as much as five times for each treatment. After 2 month old, sugarcane was treated without watering in order to get first leave (K1) scrolling. Leaves was extracted for further analyzed

The test of enzymatic was done using the first leaf specimen (K1) toward the three cultivates in three time repetitions, after the drought stress is treated than it is analyzed. The test of enzymatic is done toward SPS enzyme as a key enzymes to play an important role for accumulation of sucrose in sugarcane stalks.

The result of the research shows SPS activity of tolerance, moderate and sensitive of cultivate sugarcane toward drought stress are significant. The activity of SPS in the three cultivates increasing during the drought stress, with indication M442-51 produces higher activity than two other cultivates.

The expression of SPS gene increases during the drought stress, but the treatment of BA, JA and IAA hormone cannot increase the expression significantly of *Rubisco* and *GS* gene. The drought stress and ABA causes the increasing of SPS activity. Based on the result of the research it is advised to use SPS as physiological indicators for drought stress on sugarcane

Key words: sugarcane, drought stress, and SPS activity

PENDAHULUAN

Cekaman kekeringan merupakan salah satu faktor yang dapat membatasi pertumbuhan tanaman sebagai akibat perubahan proses fisiologis tanaman. Pada tingkat fisiologis terjadi gangguan proses fotosintesa dikarenakan menutupnya stomata sehingga mengurangi suplai CO₂. Sejalan dengan hal tersebut, kerja enzim yang terlibat didalamnya juga terganggu.

Tanaman tebu memproduksi sejumlah besar biomasa dan sukrosa yang tersimpan dalam batang dalam konsentrasi yang tinggi. Diantara kultivar tebu terdapat variasi proporsi alokasi fotosintat yang digunakan untuk pertumbuhan maupun sebagai bahan simpanan.

Biosintesa sukrosa dalam tanaman tebu dipengaruhi oleh beberapa enzim, diantaranya adalah *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) (Lingle, 1999). SPS merupakan enzim penting pada jalur biosintesis sukrosa dan berperan di dalam menentukan kemampuan tanaman untuk mensintesis sukrosa dan mentranslokasikannya ke bagian tanaman lain (Walker dan Huber, 1989). Aktivitas SPS pada tanaman jagung berkorelasi dengan tingkat pertumbuhan tanaman. Biosintesis sukrosa selain ditentukan oleh jumlah karbon yang dapat diasimilasi, juga ditentukan oleh aktivitas enzim SPS (Huber dan Huber, 1992).

Beberapa hormon tanaman disinyalir turut berperan didalam menentukan ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan. Hormon tanaman ABA (*abscisic acid*) meningkat selama cekaman



kekeringan. Hormon ini memegang peranan penting di dalam menginduksi beberapa gen yang berperan didalam menentukan sifat toleransi ketahanan kekeringan. Selain itu banyak gen yang berkaitan dengan sifat ketahanan kekeringan dapat diinduksi dengan perlakuan ABA secara eksogen (Shinozaki dan Shinozaki, 1997). JA (*Jasmonic acid*) dan ABA dapat menginduksi terbentuknya mRNA pada tomat dan kentang (Jensen *et.al.*, 1996). Sedangkan di tebu perlakuan ABA sampai dengan konsentrasi 100 μ M dapat meningkatkan ekspresi gen *DIP* (*SoDIP22*) di daun (Sugiharto *et.al.*, 2002). Pada penelitian ini tidak akan dikaji pola perubahan peningkatan kandungan ABA selama cekaman kekeringan karena kendala teknis, tetapi akan dikaji apakah perlakuan ABA berpengaruh terhadap ekspresi gen *SPS*.

Penggunaan antibodi dalam melacak protein yang dihasilkan oleh aktivitas enzim tertentu telah secara luas dilakukan. Antibodi mempunyai sifat yang spesifik dibanding protein-protein lain karena terbuat dengan jutaan bentuk yang berbeda, masing-masing dengan tempat pengikatan (*binding site*) berbeda yang hanya mengenal molekul tertentu (*antigen*). Kekhususan yang tinggi antibodi terhadap antigen menjadikan senyawa antibodi berpotensi sangat bagus untuk digunakan sebagai alat deteksi keberadaan protein homolog. Pada penelitian ini digunakan antibodi *SPS* untuk mendeteksi protein *SPS* yang dihasilkan oleh ekspresi gen *SPS*.

Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengkarakterisasi secara fisiologis tanaman tebu selama cekaman kekeringan melalui pengukuran aktivitas enzim *SPS*.

BAHAN DAN METODA

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa bibit tebu varietas M442-51 (tahan), PSTK 91-324 (moderat) serta POJ3016 (peka) asal P3GI Pasuruan, antibodi *SPS*, *Rubisco*, *GS-1* dan *GS-2*. Setelah bibit tebu berumur 2 bulan diperlakukan cekaman kekeringan dengan cara tanpa diberi pengairan, kemudian diambil sampel daun K1 pada hari ke 0, 5, 8 dan 10 setelah cekaman kekeringan. Sampel daun digunakan untuk pengujian aktivitas *SPS*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekul Fakultas MIPA.

Pengukuran Aktivitas *SPS* serta Deteksi Protein *SPS*

Sampel daun diambil dari daun lingkaran pertama (K-1) dilakukan pada saat penyinaran penuh, ditimbang sebanyak 2 gram kemudian ditambah nitrogen cair, dihaluskan dalam mortar dengan ditambah sedikit pasir kwarsa, PVP (*Polyvinyl Pyrolidone*) 10 %, dan buffer ekstraksi mengandung 50 mM Tris; pH : 7,5 , 1mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM PMSF, 10 mM β Merchпто), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit suhu 4°C, supernatan mengandung *crude* enzim. Sebagian *crude* enzim diukur TPT (total protein terlarut) untuk bahan analisis *Western Blot*, sebagian difiltrasi melalui kolom Sephadex G25 untuk pengujian aktivitas enzim.

Aktivitas *SPS* diukur menggunakan metode Kohler *et al.* (1988). Sebanyak 70 μ l larutan penguji *SPS* mengandung 50 mM Mops-NaOH (pH 7,5), 15 mM $MgCl_2$, 10 mM Fructose 6-P, 10 mM Glucose 6-P, 10 mM UDPG (*uridine Diphospho Glucose*), dan 50 μ l ekstrak enzim. Larutan penguji diinkubasi pada suhu 30°C, dihentikan pada 0, 15 dan 30 menit setelah pemberian ekstrak enzim dengan 70 μ l 0,5 N NaOH, kemudian dimasukkan dalam air mendidih selama 10 menit. Setelah dingin ditambahkan 0,25 ml resorsinol 0,1 % dalam ethanol 95 % dan 0,75 ml HCl 30°C dipanaskan pada suhu 80°C selama 8 menit. Aktivitas *SPS* diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm dibandingkan standart sukrosa 3 mM. Aktivitas *SPS* dinyatakan dalam jumlah sukrosa yang dibentuk per satuan waktu per jumlah total protein terlarut.

Analisis *Western Blot SPS*

Analisis *Western Blot* dimaksudkan untuk mendeteksi keberadaan protein produk gen tertentu menggunakan antibodi spesifik. Digunakan sebanyak 4 macam antibodi dalam pengujian ini, yaitu : antibodi *SPS*, *Rubisco*, *GS-1* dan *GS-2*.

Hasil isolasi protein ditambah dengan 1/10 x volume buffer loading, didenaturasi pada suhu 100°C selama 3 menit. Kemudian dielektroforesis SDS-PAGE, ditransfer pada membran NC, kemudian dihibridisasi berturut-turut dengan antibodi *SPS*, *Rubisco* dan *GS*. Visualisasi keberadaan protein pada membran dilakukan dengan menambah NBT dan BCIP.



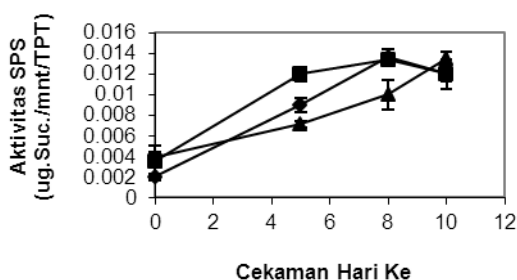
Pengaruh Pemberian Hormon Terhadap Aktivitas SPS dan Kandungan Protein SPS

Sebanyak 4 macam hormon dicobakan dalam penelitian ini, yaitu : ABA(kontrol, 10 μ M dan 100 μ M) , JA (*Jasmonic acid*), BA (*Benzil Adenin*) dan IAA (*Indole Acetic Acid*) masing-masing dengan konsentrasi 0 dan 10 μ M. Pemberian hormon dilakukan dengan cara mengoleskan larutan hormon menggunakan kuas halus pada permukaan atas dan bawah daun K1 pada pukul 08.00 pagi terhadap tanaman umur 2 bulan yang telah melalui perawatan standar. Pengambilan sampel daun dilakukan pada satu dan dua hari berikutnya pada pukul 11.00 siang terhadap daun yang diperlakukan. Cara deteksi keberadaan enzim SPS sama seperti yang telah diuraikan didepan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

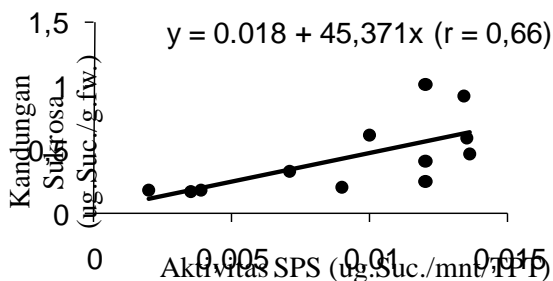
Pengujian Aktivitas Enzim SPS

Cekaman kekeringan dapat meningkatkan aktivitas enzim SPS pada beberapa tanaman (Foyer, 1998). Pengamatan aktivitas SPS tanaman tebu selama cekaman kekeringan dapat dilihat pada Grafik 1. Cekaman kekeringan sampai dengan hari ke 10 menyebabkan peningkatan aktivitas SPS ke tiga kultivar. Pada awal cekaman kekeringan sampai dengan cekaman hari ke 5 aktivitas SPS meningkat secara tajam pada kultivar tahan (M442-51) dan moderat (PSTK91-324) dibandingkan kultivar peka (POJ3016). Biosintesis sukrosa dikatalisis oleh enzim SPS, sehingga peningkatan aktivitas SPS menyebabkan pembentukan sukrosa juga meningkat (data tidak disajikan). Hal yang sama juga diketemukan pada tanaman jagung, dimana kandungan sukrosa berkorelasi positif dengan aktivitas enzim SPS (Foyer, 1998).



Grafik 1. Hubungan Lama Kekeringan dengan Aktivitas Enzim SPS (ug/mnt/tpt) Pada Daun Tebu (▲ = POJ3016, ■ = M442-51, ◆ = PSTK91-324). Data Pengamatan Aktivitas SPS merupakan Rerata Dari 2 Kali Pengukuran.

Banyak sedikitnya kandungan sukrosa pada tebu berhubungan dengan tinggi rendahnya aktivitas SPS. Hubungan antara aktivitas SPS dan kandungan sukrosa selama cekaman kekeringan dapat dilihat pada Grafik 2. Peningkatan aktivitas SPS selama cekaman kekeringan menyebabkan kandungan sukrosa juga meningkat pada ke tiga kultivar tebu dengan nilai korelasi $r = 0.66$.

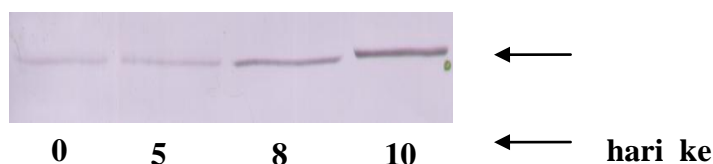


Grafik 2. Hubungan Antara Aktivitas SPS (ug.Suc./mnt/TPT) dengan Kandungan Sukrosa (ug.Suc./g.fw.) Selama Cekaman Kekeringan pada ke Tiga Kultivar Tebu.

Analisis Western Blot SPS

Analisis Western Blot dilakukan untuk mengetahui apakah peningkatan aktivitas SPS dikarenakan adanya peningkatan kandungan protein SPS. Pada Gambar 3 terlihat bahwa cekaman kekeringan menyebabkan peningkatan protein SPS. Jika dikaitkan dengan aktivitas enzim SPS (Grafik 1), maka peningkatan aktivitas enzim dikarenakan adanya peningkatan protein SPS. Hal ini berarti bahwa cekaman kekeringan meningkatkan ekspresi gen SPS melalui peningkatan kandungan protein SPS dan aktivitas SPS.



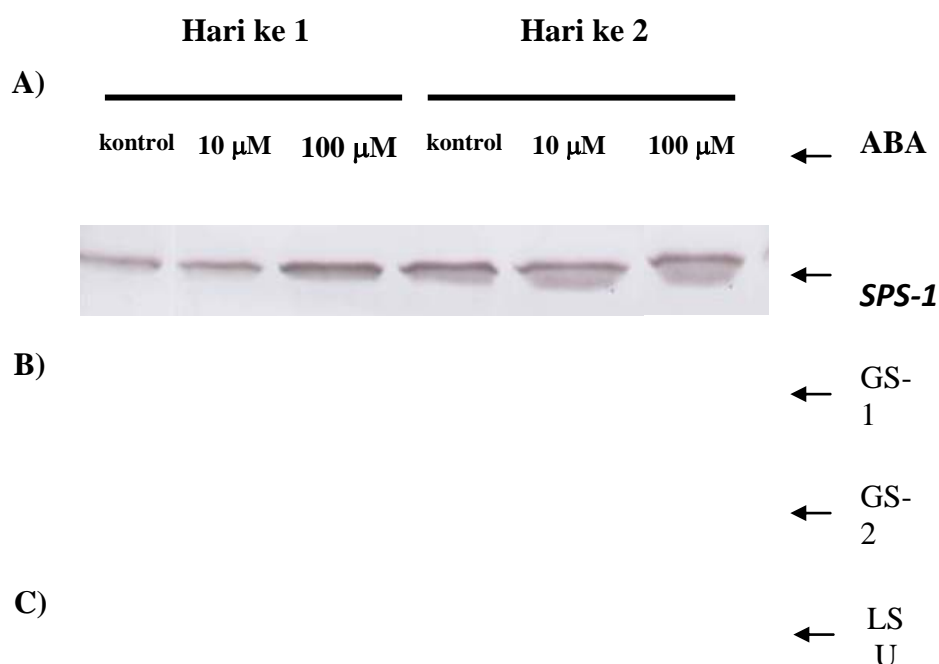


Gambar 1. Analisis Western Blot protein SPS-1 Kultivar M442-51 karena perlakuan Cekaman Kekeringan. Protein dipisahkan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE 12,5 %, masing-masing kolom berisi 30 μg

Hasil analisis Western Blot menunjukkan bahwa cekaman kekeringan dapat meningkatkan ekspresi gen *SPS*. Untuk mengetahui apakah ekspresi gen *SPS* dapat difasilitasi oleh *ABA* maka pada penelitian ini telah diteliti tentang pengaruh *ABA* terhadap ekspresi gen *SPS*.

Perlakuan Hormon

Beberapa hormon tanaman telah diketahui berperan didalam meregulasi ekspresi gen pada kondisi cekaman kekeringan, diantaranya adalah hormon *ABA*. Perlakuan *ABA* sampai dengan konsentrasi 100 μM menyebabkan peningkatan ekspresi gen *SPS* pada hari pertama, tetapi setelah hari ke dua peningkatannya tidak nyata (Gambar 2A). Hal ini berarti regulasi ekspresi gen *SPS* diinduksi baik oleh cekaman kekeringan (Gambar 1) maupun perlakuan *ABA* eksogen.



Gambar 2. Analisis Western Blot Protein SPS-1 Kultivar M442-51 karena Perlakuan Hormon ABA. Larutan ABA Dioleskan pada Permukaan Bawah dan Atas Daun K1 Masing-Masing Sebanyak 1 ml Per Daun. Sampel Daun Diambil pada jam 11.00 siang. Protein Dipisahkan Menggunakan Elektroforesis SDS-PAGE 12,5 %, Masing-Masing Kolom Berisi 30 μg Protein. Protein Rubisco (LSU), GS-1 dan GS-2 Digunakan sebagai Pembanding Mewakili Jenis Protein Lain.

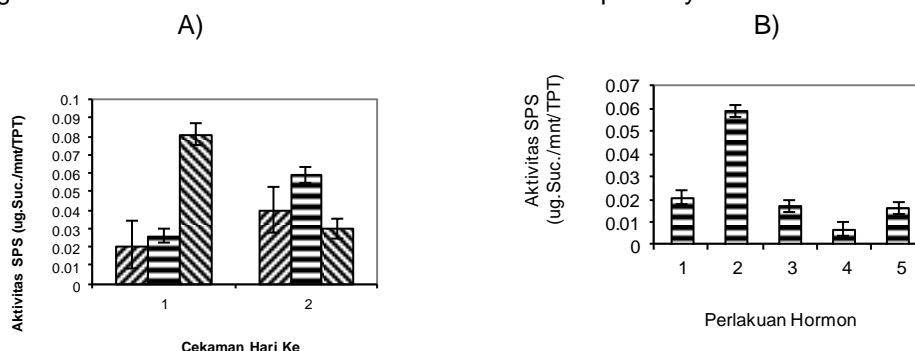
Perlakuan *ABA* sampai dengan konsentrasi 100 μM selama dua hari tidak mempengaruhi ekspresi gen *Rubisco* dibandingkan kontrol. Hal yang sama terjadi pada ekspresi gen *GS1* dan *GS2*, dimana perlakuan *ABA* sampai dengan konsentrasi 100 μM selama dua hari tidak mempengaruhi keduanya (lihat Gambar 2B dan 2C).

Perlakuan *ABA* sampai dengan 100 μM pada hari ke-1 menyebabkan peningkatan aktivitas *SPS*. Tetapi perlakuan *ABA* pada hari ke-2 berpengaruh tidak konsisten (Grafik 3A), dimana aktivitas *SPS* meningkat pada perlakuan 10 μM *ABA*, tetapi menurun pada perlakuan 100 μM *ABA*. Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh pemberian *ABA* terhadap peningkatan regulasi ekspresi gen *SPS* berlangsung singkat yaitu satu hari setelah pemberian *ABA*. Terjadinya penurunan aktivitas *SPS* pada hari ke dua dimungkinkan karena telah terjadi degradasi *ABA*.

Untuk mengetahui apakah aktivitas *SPS* juga dipengaruhi oleh hormon selain *ABA*, maka dicobakan hormon *BA*, *JA* dan *IAA* dengan konsentrasi 10 μM ., hasil penelitian terlihat pada Grafik 3B. Perlakuan

hormon *BA*, *JA* dan *IAA* justru menyebabkan penurunan aktivitas *SPS* dibanding kontrol, sedangkan perlakuan *ABA* dengan konsentrasi 10 μM menghasilkan aktivitas *SPS* lebih tinggi dibanding kontrol.

Perlakuan hormon *ABA* hanya berpengaruh terhadap ekspresi gen *SPS* yang ditandai oleh adanya peningkatan sintesa protein *SPS* (Gambar 2A), dan tidak berpengaruh terhadap ekspresi gen *Rubisco* dan *GS* (Gambar 2B dan 2C). Hal ini menunjukkan adanya spesifikasi hormon yang dapat mempengaruhi ekspresi gen-gen tertentu. Aktivitas *SPS* diinduksi oleh hormon spesifik yaitu *ABA*.



Grafik 3. Pengaruh Aktivitas *SPS* karena perlakuan : A. Hormon *ABA* (□ : Kontrol, ▨:10 μM dan ▩: 100 μM) pada hari ke1 dan ke 2. B. 1= Kontrol, 2= *ABA*, 3=*BA*, 4=*JA* dan 5=*IAA* masing-masing dengan konsentrasi 10 μM

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa :

1. Terjadi peningkatan aktivitas *SPS* lebih kurang sebesar 6,5 kali dibandingkan kontrol pada kultivar toleran selama cekaman kekeringan.
2. Selama cekaman kekeringan terjadi peningkatan ekspresi gen *SPS* yang ditandai oleh adanya peningkatan aktivitas *SPS* dan protein *SPS*.
3. Peningkatan ekspresi gen *SPS* selama cekaman kekeringan difasilitasi oleh hormon *ABA*. Ekspresi gen *SPS* dipengaruhi oleh pemberian hormon *ABA* serta tidak dipengaruhi oleh hormon *BA*, *JA* dan *IAA*.

Saran

Enzim *SPS* disarankan dapat digunakan sebagai indikator ketahanan kekeringan pada tebu secara fisiologis.

Ucapan terima kasih:

1. Ketua Pusat Penelitian Biologi Molekul Universitas Jember yang telah memberikan fasilitas laboratorium selama pelaksanaan penelitian.
2. Kepada Direktur Pusat Penelitian Perusahaan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan yang telah berkenan memberikan bantuan berupa bibit tebu dari kebun koleksinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Foyer, C., 1998. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbone metabolism in maize leave. *J. Plant Physiol.*,(117): 283-292.
- Huber, S. and Huber, C., 1992. Role of sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *J. Plant Physiol.*,(99): 1275-1278.
- Jensen, A.B. Busk, P.K. Figueres, M. Mar Alba, M. Peracchia, G. Messeguer, R. Goday, A. and Pages, M., 1996. Drought signal transduction in Plants. *J. Plant Growth Regulator.*,(20): 105-110
- Kohler, J. Komor, E. Thom, M. and Maretzki, A., 1988. Activity of sucrose phosphate synthase in sugarcane leaves. *J. Phytochemistry.*,(77): 1605-1608.
- Lingle, S.E., 1999. Sugar Metabolism during Growth and Development in Sugarcane Internode. *J. Crop.Sci.*,(39): 480-486.
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *J. Plant Physiol.*,(115): 327-334.
- Sugiharto, B., Netty, E. Hitoshi, M. Aoki, K. Sakakibara, K.Y. Yamaya, T. Tasuo, S. Hitoshi, S., 2002. Identification and Characterization of a Gene Encoding Drought – Inducible Protein Localizing in Bundle Sheath Cell of Sugarcane. *J. Plant Cell Physiol.*, 43 (3) : 350-354.
- Walker, J.L. and Huber, S.C., 1989. Purification and preliminary characterization of sucrose phosphate synthase using monoclonal antibodies. *J. Plant Physiol.*, (89): 518-524.

