

## Karakterisasi Fungsi dan Peran Domain Enzim *Sucrose Phosphate Synthase* Tebu Melalui Studi Delesi Mutagenesis

### *Functional Characterization and Role of Sugarcane Sucrose Phosphate Synthase Domain through Deletion Mutagenesis Study*

Widhi Dyah Sawitri<sup>1\*</sup>), Bambang Sugiharto<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada  
Jl. Flora No.1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

<sup>2</sup>UPT. Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi-CDAST, Universitas Jember  
Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegalboto, Jember 68121

<sup>3</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember  
Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegalboto, Jember 68121

<sup>\*</sup> Penulis untuk korespondensi E-mail: [widhi.d.s@ugm.ac.id](mailto:widhi.d.s@ugm.ac.id)

Diajukan: 09 Januari 2023 /Diterima: 30 Januari 2023 /Dipublikasi: 27 Februari 2023

#### ABSTRACT

*Sucrose phosphate synthase (SPS) plays an important role for sucrose biosynthesis in plant. The plant SPS consist of several domains; N-terminal, C-terminal, and glycosyltransferase (GT) domains. However, functional study on N-terminal and C-terminal domains is unclear. Therefore, characterization of SPS domain function is necessary to be studied through deletion of N-terminal ( $\Delta N$ ), C-terminal ( $\Delta C$ ), and both domains ( $\Delta NC$ ). The  $\Delta N$ ,  $\Delta C$ , and  $\Delta NC$  mutants were expressed via recombinant *E. coli* system and partially purified to remove contaminating protein. The expression of recombinant SPS mutants were confirmed by western blot and enzyme assay analysis. The results showed that expression and enzymatic activity of  $\Delta N$  mutant were increased. Conversely, the enzymatic activity of  $\Delta C$  and  $\Delta NC$  were decreased and found to be an inactivite form of enzyme. It indicated that C-terminal domain of plant SPS has a crucial role for synthesis of sucrose. Based on this study, it indicated that N-terminal domain may demonstrate an allosteric regulation of enzyme, while C-terminal domain might be associated with catalytic reaction of enzyme.*

**Keywords:** deletion mutagenesis; sucrose metabolism; sucrose phosphate synthase (SPS); sugarcane

#### INTISARI

*Sucrose phosphate synthase (SPS) berperan penting untuk biosintesis sukrosa pada tanaman. SPS tanaman dibagi menjadi beberapa domain diantaranya bagian domain N-terminal, domain C-terminal, dan domain glycosyltransferase (GT). Namun, fungsi domain N-terminal dan C-terminal masih belum jelas. Oleh karenanya, dilakukan studi karakterisasi fungsi masing-masing domain SPS melalui penghilangan domain N-terminal ( $\Delta N$ ), C-terminal ( $\Delta C$ ), dan kedua domain tersebut ( $\Delta NC$ ). Mutan  $\Delta N$ ,  $\Delta C$ , dan  $\Delta NC$  diekspresikan melalui sistem rekombinan *E. coli* dan dilakukan purifikasi protein secara parsial untuk menghilangkan sebagian protein kontaminan. Protein rekombinan mutan dikonfirmasi ekspresinya melalui teknik *western blot* dan*

dilakukan uji aktivitas enzim. Hasil studi menunjukkan bahwa ekspresi dan aktivitas enzim mutan  $\Delta N$  meningkat. Sebaliknya, pada mutan  $\Delta C$  dan  $\Delta NC$  terjadi penurunan aktivitas enzim, bahkan mendekati kondisi tidak aktif. Hal ini mengindikasikan bahwa bagian domain C-terminal SPS tanaman memiliki peran yang sangat krusial untuk sintesis sukrosa. Melalui studi ini dapat diketahui bahwa domain N-terminal diindikasikan berperan dalam regulasi alosterik enzim, sedangkan domain C-terminal diasumsikan berkaitan dengan reaksi katalitik enzim.

**Kata kunci:** metabolisme sukrosa; mutasi delesi; *sucrose phosphate synthase (SPS)*; tebu.

## PENDAHULUAN

Sukrosa merupakan hasil utama fotosintesis di daun yang selanjutnya ditranslokasi ke seluruh bagian jaringan tumbuhan, termasuk ke organ penyimpanan pada tumbuhan. Peran sukrosa sangat penting sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan (Lemoine *et al.*, 2013; Ruan, 2012). Dalam metabolismenya, sukrosa sangat dipengaruhi oleh beberapa enzim. Salah satu enzim kunci yang bertanggung jawab dalam sintesis sukrosa adalah *sucrose phosphate synthase* (SPS; EC 2.4.1.14). SPS mengkatalisis reaksi pertama dalam pembentukan sukrosa, dari substrat *uridine diphosphate-glucose* (UDP-G) dan *fructose-6-phosphate* (F6P) menjadi *sucrose-6-phosphate* (S6P) (Huber & Huber 1996). Selain sintesis sukrosa, beberapa studi melaporkan bahwa SPS juga meregulasi partisi karbon pada tanaman. Melalui studi overekspresi pada tanaman padi (Wang *et al.*, 2015), kapas (Haigler *et al.*, 2007), kentang (Ishimaru, *et al.*, 2015), tebu (Anur, *et al.*, 2020), dan tomat (Afidah *et al.*, 2022) membuktikan adanya peningkatan akumulasi sukrosa yang akan mengarah pada peningkatan produktivitas tanaman.

Mekanisme SPS tanaman sangat kompleks karena melibatkan regulasi alosterik dimana aktivitas enzim SPS dikontrol oleh efektor *glucose-6-phosphate* (G6P) dan inorganik fosfat (Pi). Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan aktivitas enzim SPS yang terjadi akibat adanya G6P (Volkert *et al.*, 2014; Fibriani, *et al.*, 2019). Karakterisasi SPS tebu berawal dari ditemukannya dua bentuk isoform SPS, SoSPS1 dan SoSPS2, yang didapatkan dari pustaka cDNA tebu. Berdasarkan keberadaannya, diketahui bahwa SoSPS1 banyak ditemukan di daun sedangkan SoSPS2 pada organ non-fotosintetik tanaman seperti akar (Sugiharto, *et al.*, 1997). Regulasi SoSPS1 lebih sensitif terhadap efektor alosterik daripada SoSPS2. Selain itu, SoSPS1 lebih representatif sebagai enzim yang terlibat dalam fotosintesis, sehingga SoSPS1 digunakan dalam studi sebelumnya untuk dilakukan karakterisasi enzim (Sawitri, *et al.*, 2016; Sawitri, *et al.*, 2018; Kurniah, *et al.*, 2021).

SPS tidak hanya diregulasi pada sel tanaman, tetapi juga terdapat pada sel prokariotik seperti sianobakteria dan bakteri non-fotosintetik. SPS tanaman berukuran

sekitar 120 kDa dan terdiri dari tiga domain yaitu domain N-terminal, *glycosyltransferase* (GT), dan C-terminal. Berbeda dengan SPS tanaman, ukuran SPS pada sel prokariotik berkisar antara 61 kDa dan hanya memiliki satu domain yaitu domain GT (Chua *et al.*, 2008; Sawitri *et al.*, 2018). Selain itu, preferensi substrat pada SPS bakteri non-fotosintetik untuk mengkatalisis reaksi pembentukan sukrosa tidak spesifik pada UDP-G melainkan *nucleotide diphosphate-glucose* (NDP-G) dimana nukleotida di sini dapat berupa adenin (ADP-G) maupun guanin (GDP-G). Melalui studi tersebut dapat disimpulkan bahwa UDP-G adalah substrat yang spesifik pada SPS tanaman (Chua *et al.*, 2008). Pada studi sebelumnya menggunakan SoSPS1 sebagai representatif SPS tanaman dilaporkan bahwa peran domain N-terminal penting untuk regulasi alosterik (Sawitri *et al.*, 2016). Namun, peran domain C-terminal masih belum jelas karena struktur SPS tanaman belum dilaporkan. Oleh karenanya, pada studi ini dilakukan delesi domain SoSPS1 dan dikarakterisasi ekspresinya. Karakterisasi peran masing-masing domain SPS tanaman ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi target rekayasa enzim terkait metabolisme sukrosa.

## BAHAN DAN METODE

### Konstruksi mutan SoSPS1 pada vektor ekspresi pTrcHisA

Konstruksi mutan diawali dengan pemilihan sekuens yang dimutasi dan amplifikasi gen

pengkode SoSPS1. Gen pengkode SoSPS1 didapatkan dari hasil re-sekuensing rekombinan DNA SoSPS1 pada penelitian sebelumnya dengan nomor akses AB001337.1 di *GenBank* dan panjang sekuens 3,225 bp (Sawitri *et al.*, 2016). Bagian SoSPS1 yang dimutasi yaitu delesi 171 asam amino di bagian N-terminal ( $\Delta$ N-SoSPS1), delesi 340 asam amino di bagian C-terminal ( $\Delta$ C-SoSPS1), dan delesi 511 asam amino di bagian domain N-terminal dan C-terminal ( $\Delta$ NC-SoSPS1). Penghilangan bagian N-terminal dan C-terminal dihasilkan dari amplifikasi gen menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan primer pada **Tabel 1**. Hasil amplifikasi tiga macam mutasi tersebut selanjutnya dipotong dan diligasikan pada vektor ekspresi pTrcHisA (Invitrogen). Strategi yang digunakan dalam konstruksi gen ini adalah teknik dimana hasil ligasi fragmen DNA yang tidak dapat dipotong (*compatible cohesive ends*). Amplikon yang mengandung restriksi enzim *SbfI* dan *EcoRI* diligasikan pada vektor pTrcHisA yang dipotong dengan *PstI* dan *EcoRI*. Sisi restriksi enzim *SbfI* akan tersambung dengan *PstI*, tetapi sisi ini tidak dapat terpotong oleh restriksi enzim *SbfI* maupun *PstI*. Kloning hasil konstruksi dilakukan melalui sistem bakteri *Escherichia coli* strain XL10-Gold (Stratagene) dan diverifikasi menggunakan sekuensing DNA metode Sanger (Fibriani *et al.*, 2019).

**Tabel 1.** Pasang primer yang digunakan dalam konstruksi gen mutan SoSPS1

Nama primer	Sekuens nukleotida (5' – 3')
Δ N-SoSPS1	F CGC CCT GCA GGA AGG AGA AGA AGC TTT ACA TTG TG
	R CGC GAA TTC TCA CAT GCC GCT AGA AGT CTT GGA
Δ C-SoSPS1	F CGC CCT GCA GGA TGG CCG GGA ACG AGT GGA TC
	R GCG GAA TTC TCA GTC CAA CGA CAG TGG GTC GTT AGT
Δ NC-SoSPS1	F CGC CCT GCA GGA AGG AGA AGA AGC TTT ACA TTG TG
	R GCG GAA TTC TCA GTC CAA CGA CAG TGG GTC GTT AGT

### Ekspresi dan purifikasi rekombinan mutan ΔN-, ΔC-, ΔNC-SoSPS1

Plasmid mutan SoSPS1 yang telah dikonstruksi selanjutnya ditransfer ke dalam kompeten sel *E. coli* strain BL21(DE3) menggunakan metode *heat-shock* (Sawitri *et al.*, 2016). Bakteri *E. coli* strain jenis strain BL21(DE3) pada umumnya digunakan untuk ekspresi protein. Bakteri transforman ditumbuhkan pada suhu 30-37°C selama semalam sebagai kultur starter ke dalam media Luria Broth (LB) sebanyak 50 ml yang mengandung 50 µg/ml ampicillin. Kultur starter sebanyak 10 ml diinokulasikan ke dalam 1 liter media LB yang mengandung 50µg/mL *ampicillin* dan dikultur pada suhu 30°C selama sekitar 3-5 jam hingga mencapai awal fase log untuk inisiasi ekspresi protein. Ketika telah mencapai awal fase log kurva pertumbuhan bakteri, selanjutnya dilakukan tahap ekspresi protein dengan penambahan *isopropyl β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) sebanyak 0.05 mM dan pemindahan suhu kultur di 20°C selama semalam.

Hasil kultur keesokan harinya sekitar 17-20 jam kemudian, sel bakteri dipanen menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 6,000 *revolution per minute* (rpm)

selama 6 menit di suhu 4°C. Sel yang telah dipanen dilarutkan ke dalam buffer ekstraksi (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA; dan 1 mM PMSF) dan disonikasi selama 2 x 30 detik dalam kondisi dingin (*on ice*). Sel yang telah terhomogenisasi selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15,000 rpm selama 15 menit di suhu 4°C. Larutan supernatan dicampurkan ke dalam resin *anion exchange* DE52 (Whatman) dan difiltrasi menggunakan Miracloth (Calbiochem) untuk purifikasi protein. Dalam studi ini dilakukan purifikasi protein secara parsial dikarenakan banyaknya protein yang hilang ketika melakukan beberapa tahap purifikasi protein hingga mendapatkan protein yang murni. Sedangkan dalam studi ini diperlukan kelimpahan protein yang besar dalam analisis aktivitas enzim.

### Western blot

Total protein yang merupakan hasil ekstraksi dari sel bakteri *E. coli* kemudian dipisahkan menggunakan 10% *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide-gel electrophoresis* (SDS-PAGE) berdasarkan metode Laemmli (Sawitri *et al.*, 2016). Protein yang telah terpisah di dalam gel

selanjutnya ditransfer menggunakan membran nitroselulosa Immobilon-P (Millipore) untuk analisis *western blot* menggunakan antibodi monoklonal Xpress epitope yang mengandung histidine tag (Invitrogen) dan antibodi sekunder *alkaline phosphatase-conjugated* (BioRad). Protein yang telah bereaksi dengan antibodi divisualisasi dengan pewarnaan NBT/BCIP.

#### Aktivitas enzim

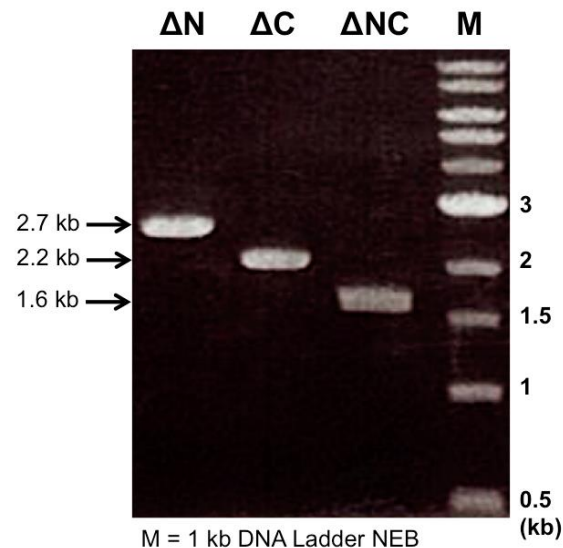
Pengukuran aktivitas enzim SPS dideskripsikan pada studi sebelumnya (Sawitri *et al.*, 2016). Total reaksi adalah 50  $\mu$ l yang mengandung 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 20 mM  $MgCl_2$ , 20 mM F6P, 20 mM UDP-G, dan enzim. Reaksi enzimatik berlangsung selama 10 menit diinkubasi pada suhu ruang 25°C dan reaksi berhenti melalui penambahan 1 M NaOH sebanyak 35  $\mu$ l kemudian dilanjutkan dengan pemanasan di suhu 95°C selama 10 menit untuk mendekomposisi sisa F6P yang tidak bereaksi. Selanjutnya dilakukan pewarnaan pada sukrosa yang terbentuk melalui penambahan 125  $\mu$ l of 0.1% (w/v) *resorcinol* dalam 95% etanol dan

30% (w/v) HCl, serta diinkubasi pada 85°C selama 8 menit. Warna yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer (SH-1000, Corona Electric) yang dilengkapi dengan *microtiter plate reader*. Untuk deteksi produk enzim SPS berupa sukrosa digunakan dengan panjang gelombang 520 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil konstruksi dan ekspresi rekombinan mutan $\Delta N$ -, $\Delta C$ -, $\Delta NC$ -SoSPS1 pada *E. coli*

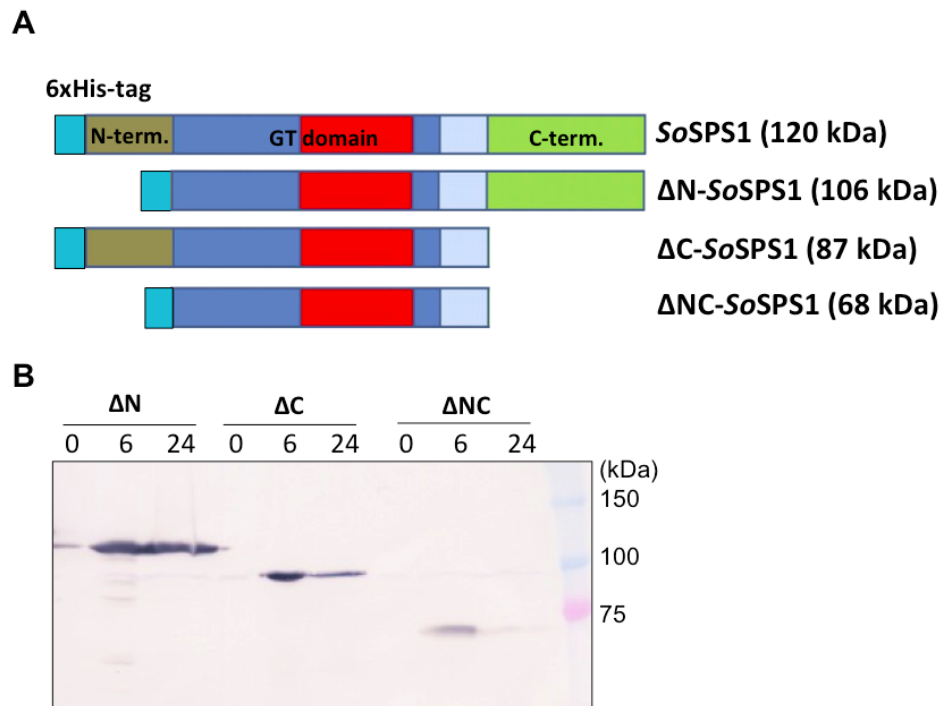
Tiga rekombinan mutan telah berhasil didapatkan melalui amplifikasi gen target SoSPS1 menggunakan beberapa pasang primer pada **Tabel 1**, kemudian diinsersikan pada vektor ekspresi pTrcHisA dan diekspresikan di bakteri *E. coli* BL21 (DE3). Hasil konstruksi telah dikonfirmasi menggunakan PCR dan didapatkan bahwa rekombinan mutan  $\Delta N$ -SoSPS1 berukuran 2.7 kB,  $\Delta C$ -SoSPS1 berukuran 2.2 kB, dan  $\Delta NC$ -SoSPS1 berukuran 1.68 kB (**Gambar 1**). Melalui sekuensing DNA, telah dibuktikan pula bahwa klon rekombinan mutan adalah klon positif yang sesuai dengan desain konstruk pada **Gambar 2A**.



**Gambar 1.** Hasil amplifikasi PCR klon rekombinan mutan menggunakan primer konstruksi pada Tabel 1. Marker (M) yang digunakan adalah 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, UK).

Untuk melihat ekspresi mutan  $\Delta N$ -,  $\Delta C$ -,  $\Delta NC$ -SoSPS1, maka dilakukan analisis *western blot* pada sampel berupa total protein rekombinan *E. coli*. Pada studi ini tidak dilakukan pengukuran total protein, tetapi total protein diambil dari pellet 1 mL kultur rekombinan *E. coli*. Pengambilan sampel dilakukan setiap 0, 6, 24 jam kultur *E. coli* dan antibodi yang mengandung histidine tag. Pada **Gambar 2B** terlihat bahwa ukuran pita protein mutan  $\Delta N$ -,  $\Delta C$ -,  $\Delta NC$ -SoSPS1 sesuai dengan model desain konstruksi pada **Gambar 2A**, yaitu  $\Delta N$ -SoSPS1 sekitar 106 kDa,  $\Delta C$ -SoSPS1 sekitar 87 kDa, dan  $\Delta NC$ -SoSPS1 sekitar 68 kDa. Hal ini membuktikan bahwa protein rekombinan mutan berhasil terekspresi

karena adanya peningkatan ketebalan pita protein dari kultur 0 jam hingga 6 jam. Ekspresi protein  $\Delta C$  dan  $\Delta NC$ -SoSPS1 berubah menjadi lebih tipis setelah kultur selama 24 jam, sedangkan hal tersebut tidak terjadi pada mutan  $\Delta N$ -SoSPS1. Ekspresi protein mutan  $\Delta N$ -SoSPS1 menunjukkan bahwa keberadaan protein tidak berubah setelah kultur selama 6 jam hingga 24 jam. Oleh karenanya, mutan  $\Delta N$ -SoSPS1 diasumsikan lebih stabil daripada  $\Delta C$  dan  $\Delta NC$ -SoSPS1. Pada mutan  $\Delta C$  dan  $\Delta NC$ -SoSPS1 terlihat bahwa protein terdegradasi setelah kultur selama 24 jam. Hal ini terjadi karena enzim SPS mutan diduga mengalami proses proteolisis pada sel *E. coli* selama kultur.



**Gambar 2.** Ekspresi rekombinan mutan  $\Delta$ N-,  $\Delta$ C-,  $\Delta$ NC-SoSPS1. **(A)** Model konstruksi mutan dan prediksi ukuran protein yang dihasilkan berdasarkan Chua *et al.*, 2008. **(B)** Ekspresi protein yang dihasilkan melalui analisis *western blot*.

Hasil yang ditunjukkan pada **Gambar 2B** telah membuktikan bahwa masing-masing mutan SPS dapat diekspresikan. Namun, fungsi masing-masing harus dikarakterisasi melalui analisis aktivitas enzim, apakah karakter enzimatis mutan SPS berubah atau tidak. Protein rekombinan diekstrak dari *E. coli* yang telah dikultur selama 24 jam, selanjutnya dipurifikasi secara parsial menggunakan resin *anion exchange* untuk memisahkan protein kontaminan yang tercampur dengan protein

rekombinan mutan SoSPS1. Hasil purifikasi parsial tersebut kemudian diuji aktivitas enzimnya dengan mengukur produk yang terbentuk berupa sukrosa. Pada **Gambar 3** terlihat bahwa produk yang terbentuk melalui katalisis enzim pada mutan  $\Delta$ N terlihat lebih tinggi daripada mutan  $\Delta$ C dan  $\Delta$ NC. Produk yang dihasilkan baik pada mutan  $\Delta$ C maupun mutan  $\Delta$ NC ditunjukkan hampir mendekati 0 mM sukrosa per 10 menit.

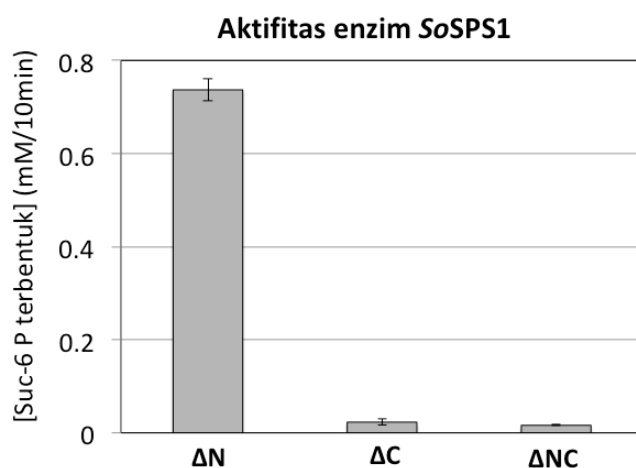
**Tabel 2.** Produk S6P yang terbentuk melalui aktivitas enzim mutan  $\Delta$ N-,  $\Delta$ C-,  $\Delta$ NC-SoSPS1

Nama mutan SoSPS1	Produk S6P yang terbentuk (mM/10 menit) $\pm$ SD*
$\Delta$ N	0.68 $\pm$ 0.022
$\Delta$ C	0.02 $\pm$ 0.006
$\Delta$ NC	0.01 $\pm$ 0.001

\*SD = Standar Deviasi

Pada **Tabel 2** juga menunjukkan bahwa dengan adanya pemotongan di daerah domain C-terminal dapat menurunkan aktivitas enzim hingga hampir 35 kali lipat dibandingkan mutan  $\Delta N$ -SoSPS1. Hal ini dapat diasumsikan bahwa mutan dengan penghilangan bagian domain C-terminal dapat menyebabkan enzim menjadi inaktivasi. Beda halnya rekombinan mutan dengan penghilangan daerah domain N-terminal yang masih menunjukkan aktivitas enzimnya. Melalui pengamatan ekspresi

protein  $\Delta C$  dan  $\Delta NC$ -SoSPS1 dapat diasumsikan bahwa setelah kultur selama 24 jam sedikit demi sedikit protein mengalami degradasi. Hasil ini mengindikasikan domain C-terminal memiliki fungsi yang penting dalam aktivitas enzim. Hal ini dibuktikan dengan adanya delesi domain C-terminal dapat mengakibatkan enzim SPS menjadi tidak stabil dan kehilangan fungsinya sebagai enzim sintesis sukrosa.



**Gambar 3.** Hasil aktivitas enzim pada rekombinan mutan  $\Delta N$ -,  $\Delta C$ -,  $\Delta NC$ -SoSPS1 melalui pengukuran spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm.

Partisi karbon merupakan proses penting dalam distribusi energi pada tanaman. Salah satu enzim yang sangat berperan dalam proses partisi karbon adalah SPS (Wang, *et al.*, 2013). Karakterisasi SPS tanaman, utamanya pada masing-masing fungsi domain, masih belum sepenuhnya diketahui. Oleh karenanya, hingga saat ini mekanisme partisi karbon pada tanaman dari organ fotosintetik ke seluruh bagian tanaman (*source* ke *sink*) masih belum jelas.

Salah satu studi yang telah dilakukan sebelumnya untuk mengetahui fungsi domain SPS tanaman adalah dengan penghilangan bagian domain N-terminal. Hilangnya domain N-terminal menyebabkan enzim tidak dapat merespon G6P karena dimungkinkan G6P tidak dapat berikatan dengan daerah N-terminal, meskipun hal ini masih belum dapat dibuktikan. Penghilangan daerah N-terminal justru dapat meningkatkan spesifik aktivitas enzim



hingga 10 kali lipat. Sebaliknya SPS tanaman dapat merespon G6P melalui peningkatan aktivitas enzim ketika domain N-terminal masih utuh. Hal ini dapat diasumsikan bahwa pengikatan G6P pada domain N-terminal menyebabkan afinitas SPS terhadap substrat semakin tinggi sehingga aktivitas enzim mengalami peningkatan (Sawitri, *et al.*, 2016). Informasi mengenai penghilangan daerah domain C-terminal SPS masih belum dilaporkan, seperti halnya pada daerah N-terminal. Oleh karenanya, studi ini merupakan studi yang pertama kali dilakukan pada bagian C-terminal SPS.

Studi ini dapat memberikan informasi bahwa penghilangan C-terminal SPS tidak direkomendasikan untuk aplikasi rekayasa genetik yang berkaitan dengan peningkatan akumulasi sukrosa tanaman. Akan tetapi, mutasi *knock out* pada SPS melalui penghilangan bagian C-terminal dapat dijadikan sebagai target agar enzim menjadi tidak aktif. Pada tanaman, adanya penghilangan bagian C-terminal SPS mungkin dapat mengakibatkan sintesis sukrosa tidak dapat terjadi. Sebaliknya, penghilangan N-terminal pada SPS tanaman memiliki potensi untuk meningkatkan aktivitas sintesis sukrosa melalui *genomic editing*. Peningkatan akumulasi sukrosa tersebut nantinya dapat mengarah ke peningkatan produktivitas tanaman.

## KESIMPULAN

Mutan rekombinan SoSPS1 yang terdiri dari  $\Delta N$ -,  $\Delta C$ -, dan  $\Delta NC$  telah berhasil diekspresikan di *E. coli*. Namun, mutan  $\Delta N$ -,  $\Delta C$ -, dan  $\Delta NC$  memiliki karakter aktivitas enzim yang berbeda. Penghilangan bagian N-terminal dapat menyebabkan aktivitas enzim meningkat, akan tetapi penghilangan bagian C-terminal mengakibatkan aktivitas enzim hilang. Hal ini mengindikasikan bahwa bagian C-terminal pada SPS tanaman memiliki fungsi penting dalam proses biosintesis sukrosa.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini mendapat pendanaan dari the *International Collaborative Research Program of Institute for Protein Research, Osaka University*. Selain itu, studi ini didukung oleh UPT. Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (CDAST) Universitas Jember.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afidah, S.N., I.D. Agustien, P. Dewanti, and B. Sugiharto, 2021. Increased activity of sugarcane sucrose-phosphate synthase in transgenic tomato in response to N-terminal truncation. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 27(1), pp.43-50.
- Anur, R.M., N. Mufithah, W.D. Sawitri, H. Sakakibara, and B. Sugiharto. 2020. Overexpression of sucrose phosphate synthase enhanced sucrose content and biomass production in transgenic sugarcane. *Plants*, 9(200), pp.1-11.
- Chua, T.K., J.M. Bujnicki, T.C. Tan, F. Huynh, B.K. Patel, and Sivaraman. 2008. The structure of sucrose phosphate synthase from *Halothermothrix orenii* reveals its mechanism of action and binding mode. *The Plant Cell*, 20, pp.1059-1072.
- Fibriani, S., I.D. Agustien, W.D. Sawitri, dan B. Sugiharto. 2019. Transformasi genetik dan ekspresi mutan sucrose-phosphate synthase pada tanaman tomat. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(1), pp. 130-138.
- Haigler, C.H., B. Singh, D. Zhang, S. Hwang, C. Wu, W.X. Cai, M. Hozain, W. Kang, B. Kiedaisch, R.E. Strauss, E.F. Hequet, B.G. Wyatt, G.M. Jividen, and A.S. Holaday, 2007. Transgenic cotton over-producing spinach sucrose phosphate synthase showed enhanced leaf sucrose synthesis and improved fiber quality under controlled environmental conditions. *Plant Mol Biol*, 63, pp. 815-832.
- Huber, S.C., and J.L. Huber. 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio*, 47, pp. 431-44.
- Ishimaru, K., N. Hirotsu, T. Kashiwagi, Y. Madoka, K. Nagasuga, K. Ono, and R. Ohsugi. 2008. Overexpression of a maize SPS gene improves yield characters of potato under field conditions. *Plant Prod Sci*, 11(1), pp. 104-107.
- Kurniah, N.I., W.D. Sawitri, M.S. Rohman, Y. Nugraha, T. Hase, and B. Sugiharto. 2021. Mutation of UDP-glucose binding motif residues lead to increased affinity for ADP-glucose in sugarcane sucrose phosphate synthase. *Molecular Biology Reports*, 48(2), pp. 1697-1706.
- Lemoine, R., S. La Camera, R. Atanassova, F. Dedaldechamp, T. Allario, N. Pourtau, J.L. Bonnemain, M. Laloi, P. Coutos-Thevenot, L. Maurousset, M. Faucher, C. Girousse, P. Lemonnier, J. Parrilla, and M. Durand. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci*, 272(4), pp. 1-21.
- Li, Y., Y. Yao, G. Yang, J. Tang, G.J. Ayala, X. Li, W. Zhang, Q. Han, T. Yang, H. Wang, K.H. Mayo, and J. Su. 2020. Co-crystal structure of *Thermosynechococcus elongatus* sucrose phosphate synthase with UDP and sucrose-6-phosphate provides insight into its mechanism of action involving and oxocarbenium

- ion and the glycosidic bond. *Front Microbiol*, 1050(11), pp. 1-15.
- Maloney, V.J., J.Y. Park, F. Unda, and S.D. Mansfield. 2015. Sucrose-phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact *in planta* and promote plant growth and biomass accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), pp. 4383-4394.
- Ruan, Y.L., 2012. Signaling role of sucrose metabolism in development. *Molecular plant*, 5(4), pp. 763-765.
- Sawitri, W.D., H. Narita, E. Ishizaka-Ikeda, B. Sugiharto, T. Hase, and A. Nakagawa. 2016. Purification and characterization of recombinant sugarcane sucrose phosphate synthase expressed in *E. coli* and insect Sf9 cells: and importance of the N-terminal domain for an allosteric regulatory property. *J. Biochem*, 159(6), pp. 599-607.
- Sawitri, W.D., S.N. Afidah, A. Nakagawa, T. Hase, and B. Sugiharto. 2018. Identification of UDP-glucose binding site in glycosyltransferase domain of sucrose phosphate synthase from sugarcane (*Saccharum officinarum*) by structure-based site-directed mutagenesis. *Biophysical Reviews*, 10, pp. 293-298.
- Sugiharto, B., H. Sakakibara, Sumadi, and T. Sugiyama. 1997. Differential expression of two genes for sucrose-phosphate synthase sugarcane: molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiol*, 38(8), pp. 961-965.