

LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL



**Transformasi Gen Resistensi Higromisin (*hph*)
ke Kapang *Monascus purpureus* Mutan Albino
melalui Mediasi *Agrobacterium tumefaciens*.**

Oleh :

**Dr. Marlia Singgih Wibowo
Tiana Milanda, M.Si
Elin Julianti, M.Si.**

**Dibiayai melalui Proyek Penelitian Fundamental DP3M-DIKTI
Surat perjanjian Nomor : 322/SP3/PP/DP2M/II/2006
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional**

**INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
2006**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Transformasi Gen Resistensi Higromisin (*hph*) ke Kapang *Monascus purpureus* Mutan Albino melalui Mediasi *Agrobacterium tumefaciens*
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap : Dr. Marlia Singgih Wibowo
 - b. Jenis kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 131 835 237
 - d. Pangkat/Golongan : III D
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 - f. Sekolah : Farmasi
 - g. Perguruan Tinggi : Institut Teknologi Bandung
 - h. Pusat Penelitian : Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Institut Teknologi Bandung
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Kimia Medisinal/Bioproses, Sekolah Farmasi ITB
5. Kerja Sama dengan Institusi Lain : -
6. Masa Penelitian : 10 bulan
7. Biaya yang Diperlukan : Rp. 15.000.000

Mengetahui,
Dekan Sekolah Farmasi ITB

Bandung, 28 September 2006
Ketua Peneliti,

Dr. Tutus Gusdinar
NIP. 130 675 825

Dr. Marlia Singgih Wibowo
NIP. 131 835 237

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. Emmy Suparka
NIP. 130 515 659

RINGKASAN

Monascus purpureus merupakan jamur berfilamen yang memberikan warna merah kepada beras “angkak”. Jamur ini menghasilkan metabolit sekunder zat warna, monakolin K, sitrinin dan beberapa metabolit sekunder lain. Zat warna yang dihasilkan *Monascus* secara tradisional digunakan sebagai pewarna makanan dan pengawet daging. Monakolin K mempunyai aktivitas antihiperkolesterolemia. Sitrinin merupakan antibakteri terhadap bakteri Gram positif, namun bersifat karsinogen, teratogen dan merusak ginjal, sehingga pembentukannya perlu ditentukan agar beras angkak aman untuk dikonsumsi. Ketiga metabolit sekunder tersebut disintesis melalui alur yang sama yaitu alur biosintesis poliketida dari prekursor tetraketida. Informasi mengenai alur biosintesis poliketida pada kapang *Monascus* sangat terbatas, dikarenakan gen-gen yang terlibat belum diketahui. Jumlah kromosom, ukuran genom maupun kemungkinan mentransformasikan DNA asing ke kapang tersebut juga belum diketahui. Seluruh informasi ini diperlukan untuk memulai studi molekular gen-gen yang terlibat dalam biosintesis zat warna atau sitrinin dalam *Monascus purpureus*. Informasi sistem transformasi yang efisien merupakan informasi penting dalam penelitian awal rekayasa genetik untuk menghilangkan sitrinin. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan sistem transformasi genetik menggunakan marka seleksi gen resistensi higromisin B (*hph*) dalam plasmid pUR5750 ke protoplas, miselium dan spora mutan albino *Monascus purpureus* ITBCC-HD-F002 dengan mediasi *Agrobacterium tumefaciens* LBA 1100.

Penelitian diawali dengan menguji konsentrasi hambat minimum (KHM) higromisin B terhadap *Monascus purpureus* ITBCC-HD-F002. Protoplas dibuat dengan menggunakan enzim pendegradasi dinding sel. Kultur *Agrobacterium tumefaciens* LBA 1100 yang mengandung plasmid disiapkan dari biakan muda dengan cara pengocokan. Transformasi dilakukan dengan kokultur antara protoplas, miselium dan spora *Monascus purpureus* ITBCC-HD-F002 dengan kultur *Agrobacterium tumefaciens* LBA 1100 yang mengandung plasmid pUR5750 dengan volume yang sama, kemudian diinkubasi pada medium LB padat dan medium YMP padat dengan suhu 25⁰C dan 28⁰C. Transforman diseleksi dengan menumbuhkan pada kertas saring diatas medium YMP padat mengandung higromisin B, kertas

saring selanjutnya dipindahkan ke medium seleksi dengan posisi dibalik dan tanpa dibalik. Stabilitas transforman diuji dengan menumbuhkan sampai lima generasi berturut-turut pada medium mengandung higromisin B yang dilanjutkan pada medium yang mengandung higromisin B dengan konsentrasi dua kali lipat. Transforman dikarakterisasi dengan metoda *polimerase chain reaction* (PCR) dengan membandingkan pita-pita transforman dengan plasmid pUR5750 sebagai kontrol positif dan induk mutan albino *Monascus purpureus* sebagai kontrol negatif. DNA transforman dan *Monascus purpureus* ITBCC-HD-F002 diisolasi menggunakan prosedur standar kit pemurnian DNA genom *Wizard*. Proses PCR diawali dengan denaturasi pada suhu 95⁰C selama 4 menit, siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95⁰C selama 45 detik, hibridisasi pada suhu 60⁰C selama 1 menit dan pemanjangan fragmen DNA pada suhu 72⁰C selama 90 detik dan polimerisasi akhir selama 10 menit. Produk PCR dikarakterisasi menggunakan elektroforesis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimum higromisin B terhadap *Monascus purpureus* ITBCC-HD-F002 adalah 10µg/ml medium. Protoplas yang diperoleh sebanyak $2,85 \times 10^7$ protoplas/ml. *Agrobacterium tumefaciens* yang mengandung plasmid tumbuh baik melalui pengocokan. Transforman diperoleh hanya induk *Monascus* berupa protoplas. Transforman yang tumbuh berasal dari pembedahan kertas saring dengan posisi tidak dibalik, frekwensi transformasi yang diperoleh sebesar 350 koloni/10⁷ protoplas dengan stabilitas transforman 53,8 % pada medium YMP padat mengandung higromisin B 50µg/ml. Keberhasilan transformasi terbukti dengan adanya gen *hph* pada transforman yang diperbanyak dengan PCR yang ditunjukkan dengan adanya pita yang identik dengan pita dari plasmid pada elektroforegram.

PRAKATA

Alhamdulillah, kami panjatkan kehadiran Allah SWT atas selesainya penelitian dan penulisan laporan ini, namun hasil yang dilaporkan pada tulisan ini belum sepenuhnya sesuai dengan rencana yang tercantum pada proposal, dikarenakan terjadinya keterlambatan pengiriman pereaksi yang diperlukan untuk proses akhir (*Southen blot*) sehingga tidak dapat dilaporkan sampai pada waktunya. Atas kekurangan ini kami mohon maaf.

Selanjutnya kami berterimakasih pada Direktorat Pendidikan Tinggi melalui Proyek Penelitian Fundamental yang telah memberikan bantuan pada kami untuk melakukan penelitian ini. Kami juga berterimakasih pada LPPM ITB dan pihak Sekolah Farmasi ITB atas dukungan dan bantuan dalam penelitian ini.

DAFTAR TABEL

Tabel

V.1	Hasil Penentuan KHM Higromisin B terhadap <i>M. purpureus</i> ITBCC- HD-F002	15
V.2	Hasil Transformasi Plasmid pUR5750 ke Sel <i>M. purpureus</i> ITBCC- HD-F002 melalui Mediasi <i>A. tumefaciens</i> LBA1100)	17

DAFTAR GAMBAR

Gambar

II.1	Kapang <i>M. purpureus</i> (A) di medium beras (beras angkak) (B) di medium YMP (ekstrak ragi, ekstrak malt, epton, glukosa)	2
II.2	Proses transformasi DNA dari sel donor ke sel penerima	4
II.3	Transformasi T-DNA dari sel <i>A. tumefaciens</i> ke sel tanaman	6
II.4	Skema plasmid Ti dari <i>A. tumefaciens</i> <i>A. tumefaciens</i>	7
II.5	Struktur molekul <i>acetosyringone</i>	7
II.6	Struktur molekul higromisin B.....	10
II.7	Gen resistensi higromisin B (<i>hph</i> , higromisin fosfotranferase) dari <i>E.coli</i>	10
V.1	Hasil uji stabilitas transforman higromisin dari <i>M. purpureus</i> ITBCC-HD-F002	19
V.2	Elektroforegram hasil amplifikasi gen <i>hph</i> dalam sel <i>M. purpureus</i> ITBCC- HD-F002.....	20

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
PRAKATA	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	2
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
IV. METODE PENELITIAN	12
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	20
DAFTAR PUSTAKA	21

I. PENDAHULUAN

Monascus purpureus adalah kapang berfilamen yang digunakan dalam fermentasi beras yang menghasilkan beras angkak. Produk fermentasi ini telah lama digunakan sebagai pewarna makanan, pengawet daging dan obat tradisional, terutama di daerah Cina Selatan, Jepang dan Asia Tenggara (Blanc *et al.* 1998). Dari beras angkak telah diisolasi berbagai metabolit sekunder, antara lain zat warna, zat antihiperkolesterolemia, asam-asam organik dan enzim (Pastrana *et al.*, 1995 ; K. Lakrod *et al.*, 2000).

Pada tahun 1977, Wong dan Bau mengisolasi senyawa antibakteri *Monascus* yang diberi nama monascidin A. Tetapi Blanc *et al.* (1995) menunjukkan senyawa tersebut adalah sitrinin, suatu senyawa karsinogenik, teratogenik dan nefrotoksik. Adanya sitrinin menyebabkan keraguan terhadap keamanan produk fermentasi *Monascus* (Blanc *et al.* 1998).

Berbagai cara dilakukan untuk menghasilkan produk *Monascus* yang bebas sitrinin. Upaya-upaya tersebut dapat menghilangkan atau menekan jumlah sitrinin, tetapi produksi zat warna dan monakolin K juga menurun secara bermakna (Blanc *et al.*, 1998). Hal ini disebabkan ketiga metabolit sekunder tersebut sama-sama disintesis melalui alur biosintesis poliketida, yang dikatalisis oleh multienzim poliketida sintase (PKS). Tetapi enzim-enzim maupun gen-gen pengkode PKS yang terlibat dalam alur biosintesis tersebut belum diketahui (Hajjaj *et al.* 1999).

Untuk memulai studi molekular terhadap enzim-enzim dan gen-gen PKS, diperlukan sistem transformasi genetik yang efisien untuk *M. purpureus*. Transformasi gen atau fragmen DNA dalam suatu vektor ke genom kapang berfilamen dapat dilakukan melalui mediasi bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Selanjutnya sel transforman diseleksi berdasarkan marka seleksi tertentu, baik berupa marka dominan (gen resistensi antibiotik) atau melalui skrining positif terhadap mutan auksotrof yang termutasi pada gen tertentu (S. Campoy *et al.*, 2003).

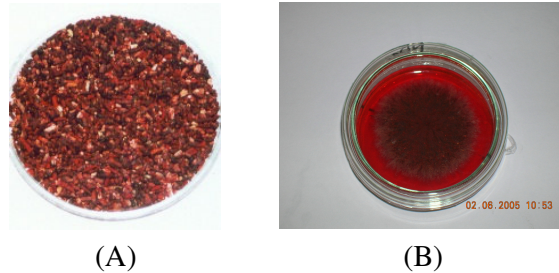
Pada penelitian ini dilakukan pencarian sistem transformasi genetik yang efisien untuk *M. purpureus* mutan albino menggunakan marka gen resistensi higromisin (*hph*) melalui mediasi *A. tumefaciens*. Penggunaan mutan albino sebagai sel penerima dikarenakan kembalinya produksi zat warna dapat digunakan sebagai

marka dalam studi molekuler gen-gen PKS yang terlibat dalam biosintesis zat warna, monakolin K dan sitrinin.

II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kapang *Monascus purpureus*

Monascus sp. adalah kapang berfilamen yang termasuk divisi Ascomycotina, kelas Ascomycetes, sub kelas Plectomycetidae, ordo Eurotiales dan famili Monascaceae. Salah satu spesiesnya, yaitu *M. purpureus* pertama kali diisolasi oleh Went (1895) dari beras angkak yang berasal dari Jawa, Indonesia (Blanc *et al.*, 1998). Dari beras angkak ini telah diisolasi berbagai metabolit sekunder, antara lain zat warna, zat antihiperkolesterolemia, asam-asam organik dan enzim (Pastrana *et al.*, 1995 ; K. Lakrod *et al.*, 2000).



Gambar II.1. Kapang *M. purpureus* (A) di medium beras (beras angkak), (B) di medium YMP (ekstrak ragi, ekstrak malt, pepton, glukosa)

Zat warna *Monascus* terdiri dari *ankaflavine* dan *monascine* (berwarna kuning), *rubropunctatine* dan *monascorubrine* (jingga) serta *rubropunctamine* dan *monascorubramine* (ungu). Seluruh zat warna *Monascus* larut dalam lemak dan pelarut organik, sedangkan bentuk kompleksnya larut dalam air. Zat warna ini sangat stabil terhadap pengaruh suhu, cahaya, oksigen, ion logam dan perubahan pH, sehingga dapat menggantikan zat warna sintetik pada makanan dan kosmetik (L. Pastrana *et al.*, 1995; K. Lakrod *et al.*, 2000).

Monascus juga menghasilkan beberapa zat antihiperkolesterolemia berupa senyawa statin, yang diberi nama monakolin J, K dan L. Senyawa yang paling potensial adalah monakolin K atau mevinolin atau lovastatin, yaitu senyawa

hipolipidemik yang menghambat kerja HMG-KoA reduktase. Enzim ini berperan dalam metabolisme HMG-KoA menjadi asam mevalonat (Blanc *et al.*, 1998; Z. Hai, 1998; Keane, 1999).

Pada tahun 1977, Wong dan Bau mengisolasi zat antibakteri dari *Monascus*, yang diberi nama monascidin A. Penelitian Blanc *et al.* (1995) menunjukkan bahwa monascidin A adalah sitrinin, yaitu suatu senyawa mikotoksin yang bersifat karsinogenik, teratogenik dan nefrotoksik.

Adanya sitrinin dalam produk fermentasi *Monascus* menimbulkan keraguan akan keamanan zat warna *Monascus* dan Monakolin K. Berbagai cara telah dilakukan untuk menghasilkan produk fermentasi yang bebas sitrinin, antara lain fermentasi menggunakan galur alam yang tidak menghasilkan sitrinin, merekayasa kondisi fermentasi atau mendetoksifikasi produk akhir fermentasi. Upaya-upaya tersebut dapat menghilangkan atau menekan jumlah sitrinin, tetapi produksi zat warna dan monakolin K juga menurun secara bermakna (Blanc *et al.*, 1998). Hal ini disebabkan ketiga metabolit sekunder tersebut sama-sama disintesis melalui alur biosintesis poliketida, yang dikatalisis oleh multienzim poliketida sintase (PKS). Tetapi enzim-enzim maupun gen-gen pengkode PKS yang terlibat dalam alur biosintesis tersebut belum diketahui (Hajjaj *et al.* 1999).

Pada tahun 1985, More *et al.* meneliti alur biosintesis lovastatin (monakolin K) pada kapang *Aspergillus terreus*. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa lovastatin disintesis melalui alur biosintesis poliketida dari prekursor poli- β -ketoasil-KoA. Selanjutnya, Hajjaj *et al.* (1999) melakukan penelitian terhadap alur biosintesis sitrinin pada *M. ruber*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sitrinin dan zat warna juga diproduksi melalui alur biosintesis poliketida dari prekursor tetraketida. Seluruh reaksi dalam alur biosintesis tersebut dikatalisis oleh multienzim poliketida sintase (PKS) (Blanc *et al.*, 1998; Hajjaj *et al.*, 1999).

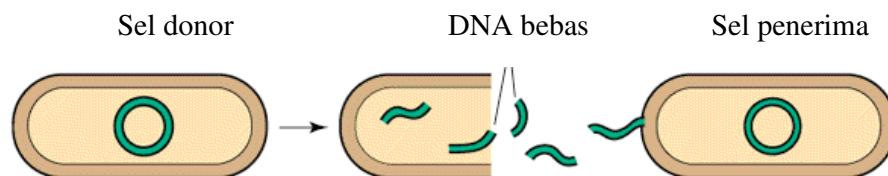
Beberapa spesies *Penicillium* dan *Aspergillus* juga menghasilkan sitrinin, tetapi dari prekursor pentaketida dan tidak memproduksi zat warna (Hajjaj *et al.*, 1999). Informasi tersebut memberikan kemungkinan baru untuk mengembangkan strategi produksi zat warna dan monakolin K yang bebas sitrinin. Produksi sitrinin dapat dikendalikan secara spesifik melalui represi terhadap satu atau beberapa gen biosintesis sitrinin melalui teknik rekayasa genetik. Aplikasi teknik biomolekular ini

memerlukan informasi tentang enzim-enzim maupun gen-gen PKS yang terlibat dalam alur biosintesis zat warna, monakolin K dan sitrinin (Blanc *et al.*, 1998 ; Lakrod *et al.*, 2000).

Untuk memulai studi molekular terhadap enzim-enzim dan gen-gen PKS, diperlukan sistem transformasi genetik yang efisien untuk *M. purpureus*. Transformasi gen atau fragmen DNA dalam suatu vektor ke genom kapang berfilamen dapat dilakukan melalui berbagai metode transformasi, seperti metode protoplas-polietilenglikol (PEG), elektroporasi maupun transformasi DNA yang dimediasi bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Selanjutnya sel transforman diseleksi berdasarkan marka seleksi yang digunakan, baik berupa marka seleksi dominan (gen resistensi antibiotik) atau melalui skrining positif terhadap mutan auksotrof yang termutasi pada gen tertentu (S. Campoy *et al.*, 2003).

II.2. Transformasi dan Kompetensi Sel

Transformasi DNA adalah proses pengambilan DNA asing dari lingkungan oleh sel penerima, yang menghasilkan sel transforman atau sel rekombinan. Ada 2 jenis transformasi, yaitu transformasi alami dan transformasi buatan. Pada transformasi alami, sel mengambil DNA asing dari lingkungan secara alami, karena memiliki sel yang kompeten. Kompetensi atau kemampuan sel mengambil DNA asing ini diregulasi oleh beberapa gen tertentu. Tetapi kebanyakan sel bakteri, mikroorganisme eukariot, sel tanaman dan sel hewan mempunyai sel non kompeten, sehingga harus diberi perlakuan khusus untuk menjadi sel kompeten dan ditransformasi melalui transformasi buatan (L. Snyder & W. Champness, 1997).



Gambar II.2 Proses transformasi DNA dari sel donor ke sel penerima ()

DNA asing yang diambil oleh sel kompeten dapat berupa DNA bebas atau DNA sisipan dalam suatu vektor. Vektor-vektor yang membawa DNA tersebut terdiri dari plasmid, bakteriofaga dan kosmid (L. Snyder & W. Champness, 1997).

Plasmid adalah molekul DNA untai tunggal berbentuk sirkular berukuran 1 kb sampai lebih dari 500 kb, yang merupakan DNA ekstrakromosomal. Setiap plasmid membawa sekuens *origin of replication* (ori), sehingga dapat bereplikasi secara mandiri tanpa tergantung pada kromosom. Kemampuan plasmid bereplikasi secara otonom, membuat molekul DNA ini digunakan sebagai vektor yang membawa DNA sisipan (T.A. Brown, 1995).

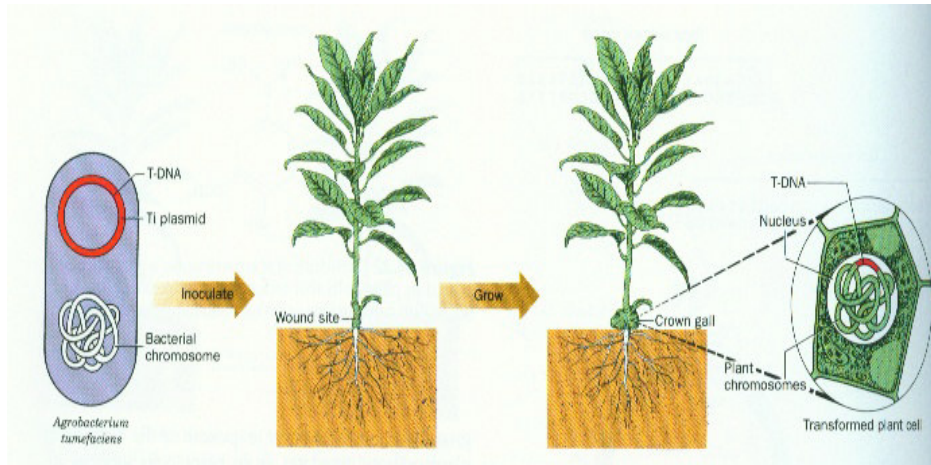
Plasmid yang digunakan dalam proses kloning harus merupakan vektor episomal atau vektor integratif, yaitu vektor yang dapat terintegrasi ke salah satu kromosom sel penerima. Vektor-vektor integratif tersebut tersedia untuk berbagai spesies sel penerima, termasuk jamur berfilamen seperti *Aspergillus nidulans* dan *Neurospora crassa* (T.A. Brown, 1995).

Berbagai bakteri seperti *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Agrobacterium tumefaciens* seringkali digunakan sebagai sel penerima. Plasmid yang digunakan pada transformasi DNA yang dimediasi *A. tumefaciens*, harus mempunyai ori *E. coli* maupun *A. tumefaciens* (*shuttle cloning vector*) (T.A. Brown, 1995).

Pada penelitian ini digunakan plasmid pUR5750 (15 kb), suatu plasmid R yang merupakan vektor biner *E.coli-Agrobacterium* yang membawa gen resistensi higromisin (*hph*) dari *E. coli*, yang diinsersikan diantara promoter *gdp* dan terminator *trpC* dari *Aspergillus nidulans* dan diapit oleh batas kiri dan batas kanan T-DNA.

II.3 Transformasi DNA melalui mediasi *Agrobacterium tumefaciens*

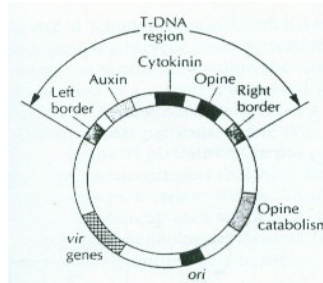
Agrobacterium tumefaciens adalah bakteri berbentuk batang, Gram negatif, tidak berspora dan motil, yang umumnya ditemukan di permukaan akar (rizosfir) tanaman. Bakteri ini dapat menyebabkan *crown gall tumour* (tumor di daerah antara akar dan batang) pada berbagai tanaman dikotil, terutama dari keluarga mawar-mawaran. Tumor ini diinduksi oleh proses transfer dan integrasi fragmen T-DNA (*transferred DNA*) dalam plasmid Ti (*tumour inducing*) dari sel *A. tumefaciens* ke ke genom sel tanaman (J. Deacon *et al.*, 2003).



Gambar II.3 Transformasi T-DNA dari sel *A. tumefaciens* ke sel tanaman (J. Deacon *et al.*, 2003)

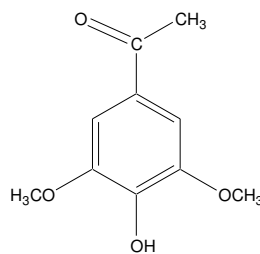
Plasmid Ti merupakan mega plasmid konjugatif berukuran 200-800 kb, yang mengandung daerah T-DNA sepanjang 12-24 kb. Di daerah T-DNA terdapat 2 tipe gen, yaitu gen-gen onkogenik yang mengendalikan biosintesis auksin dan sitokinin serta gen-gen yang mengendalikan biosintesis opin. Pada ujung 5' T-DNA terdapat sekuens batas kanan (*right border*), sedang pada di ujung 3' terdapat sekuens batas kiri (*left border*), yang keduanya tersusun dari unit berulang sepanjang 25 pb. Dalam plasmid Ti, di luar T-DNA, terdapat gen-gen untuk katabolisme opin, gen-gen untuk transfer plasmid Ti dari bakteri ke bakteri dan dari bakteri ke sel tanaman (gen-gen *vir*). Proses transfer T-DNA dimediasi oleh protein yang dikode oleh gen-gen *vir* ini (B.R. Glick & J.J. Pasternak, 1994 ; de la Riva *et al.*, 2004).

Proses transfer dan integrasi T-DNA dari sel *A. tumefaciens* ke sel tanaman berlangsung melalui beberapa tahap, yaitu kolonisasi bakteri, induksi sistem virulensi bakteri, pembentukan kompleks transfer T-DNA, transfer T-DNA dan integrasi T-DNA ke genom sel tanaman (de la Riva *et al.*, 2004).



Gambar II.4 Skema plasmid Ti dari *A. tumefaciens* (B.R. Glick & J.J. Pasternak, 1994).

A. tumefaciens, baik yang memiliki atau kehilangan plasmid Ti, akan bergerak ke situs luka pada jaringan tanaman sebagai respon terhadap senyawa-senyawa fenolik, seperti *acetosyringone* maupun monosakarida tertentu yang dikeluarkan luka tanaman. Tetapi galur yang memiliki plasmid Ti akan merespon lebih kuat, karena adanya protein sensor transmembran dimerik yang spesifik, yaitu VirA (dikode gen *virA*) yang dapat mengenali *acetosyringone* pada konsentrasi sangat rendah (10^{-7} M) (J. Deacon *et al.*, 2003)



Gambar II.5. Struktur molekul *acetosyringone* (B.R. Glick & J.J. Pasternak, 1994).

Proses integrasi T-DNA akan mengaktifkan gen-gen pengkode produksi sitokinin, auksin dan opin. Produksi auksin dan sitokinin akan mengganggu pertumbuhan normal sel tanaman dan menyebabkan terbentuknya *crown gall tumour*. Sedangkan opin merupakan sumber karbon dan sumber energi utama bagi *A. tumefaciens* (J. Deacon *et al.*, ; B.R. Glick & J.J. Pasternak, 1994).

A. tumefaciens sering digunakan dalam pemuliaan tanaman (*plant breeding*), terutama pada tanaman dikotil. Gen asing diinsersikan ke dalam T-DNA pada plasmid Ti, lalu T-DNA dipotong, ditransfer dan berintegrasi ke genom sel tanaman bersama-sama gen sisipannya (J. Deacon *et al.*, 2003). Tetapi untuk digunakan sebagai vektor kloning, plasmid Ti harus melalui beberapa proses rekayasa, yaitu penghilangan gen pengkode auksin, sitokinin, dan segmen-segmen DNA dalam plasmid Ti yang tidak diperlukan (termasuk gen-gen *vir*). Selanjutnya pada plasmid Ti harus memiliki *polylinker* (*multiple cloning site*), *origin of replication* dari *E. coli* dan gen marka seleksi (umumnya gen pengkode neomisin fosfotransferase, yang menyebabkan resistensi kanamisin) (B.R. Glick & J.J. Pasternak, 1994).

Karena gen-gen *vir* dihilangkan, maka plasmid Ti hasil rekayasa tidak mampu mentransfer dan mengintegrasikan daerah T-DNA ke sel penerima. Untuk mengatasi masalah tersebut, maka dilakukan 2 strategi (B.R. Glick & J.J. Pasternak, 1994), yaitu :

1. Strategi vektor biner

Gen asing dan gen marka seleksi disisipkan di daerah antara batas kiri dan batas kanan T-DNA secara *in vitro*, ditransformasi ke sel *E. coli*, lalu ditransfer ke sel *A. tumefaciens* memiliki plasmid Ti defektif (*disarmed*) melalui konjugasi. Plasmid Ti defektif adalah plasmid Ti memiliki gen-gen *vir*, tetapi kehilangan sebagian atau seluruh T-DNA.

2. Strategi vektor kointegratif

Inseri gen asing dan gen marka seleksi dilakukan secara *in vitro* dalam plasmid yang memiliki sebagian kecil T-DNA. Plasmid tersebut ditransformasi ke sel *E. coli*, lalu dikonjugasikan ke sel *A. tumefaciens* yang memiliki plasmid Ti defektif. Proses konjugasi berlangsung dengan bantuan plasmid konjugatif pRK melalui prosedur *triparental mating*.

Prosedur transformasi DNA melalui mediasi *Agrobacterium* dilakukan dengan mengkokulturan sel *A. tumefaciens*, yang membawa vektor-gen sisipan, dengan sel atau protoplas tanaman. Selanjutnya sel transforman diseleksi menggunakan medium pertumbuhan yang mengandung antibiotik tertentu, sedangkan sel bakteri dibunuh menggunakan antibiotik sefotaksim atau moksalamat. Sel transforman akan membentuk kultur jaringan, lalu beregenerasi menjadi tanaman

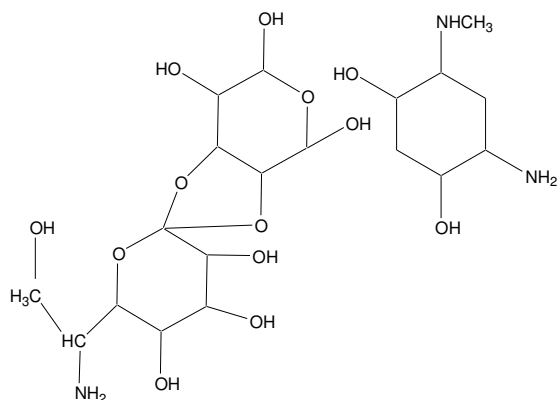
dewasa (B.R. Glick & J.J. Pasternak, 1994; J. Deacon *et al.*, 2003). Kelebihan metode transformasi ini adalah menghasilkan efisiensi transformasi yang tinggi, dengan mengurangi jumlah kopi (*copy number*) transgen (de la Riva *et al.*, 2004).

II.4 Seleksi Sel Transforman

Selain metode transformasi, pencarian suatu sistem transformasi sangat tergantung pada adanya vektor-vektor kloning yang membawa marka seleksi tertentu untuk menyeleksi sel transforman. Ada 2 jenis marka seleksi yang umum digunakan pada kapang berfilamen, yaitu marka dominan (gen resistensi terhadap inhibitor metabolik atau antibiotik) serta marka yang menggunakan konversi mutasi auktotrof pada gen-gen tertentu (M.J. Daboussi *et al.*, 1989; Woloshuk *et al.*, 1989).

Marka gen resistensi lebih sering digunakan dalam transformasi, karena banyak galur kapang yang sensitif terhadap konsentrasi tertentu inhibitor metabolik atau antibiotik. Gen resistensi tersebut umumnya mengkode suatu enzim yang dapat menginaktivkan suatu antibiotik, sehingga transformasi gen tersebut ke sel kapang yang sensitif akan mengubahnya menjadi sel yang resisten (M.J. Daboussi *et al.*, 1989 ; Woloshuk *et al.*, 1989).

Berbagai penelitian melaporkan penggunaan marka gen resistensi antibiotik higromisin B pada kapang berfilamen. Higromisin B adalah antibiotik golongan aminoglikosida yang dihasilkan oleh *Streptomyces hygroscopicus*. Antibiotik ini dapat menghambat sintesis protein dengan mengganggu proses translasi dan menyebabkan kesalahan translasi (*mistranslation*) pada ribosom 70S (Invivogen, 2004). Higromisin B direkomendasikan sebagai marka seleksi dan pemeliharaan sel transforman (*genetic selection marker*) pada konsentrasi 100-800 µg/mL (Sigma-Aldrich, 2004).



Gambar II.6 Struktur molekul higromisin (Sigma-Aldrich, 2004)

Keterangan : Formula empiris : $C_{20}H_{37}N_3O_{13}$, HCl
 BM = 527,52

Resistensi terhadap higromisin disebabkan oleh adanya gen *hph* (higromisin B fosfotrasferase) dari *E. coli* sepanjang 1026 pb (Invivogen, 2004).

```

181                               atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct
241 gtcgagaagt ttctgatcga aaagttcgac agcgtctccg acctgatgca gctctcggag
301 ggcgagaagt ctcgtgcttt cagcttcgat gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta
361 aatagctgcg ccgatggttt ctacaaagat cgttatgttt atcggcactt tgcacggcc
421 gcgctcccga ttccggaagt gcttgacatt ggggaattca gcgagagcct gacctattgc
481 atctcccgcc gtgcacaggg tgtcacgttg caagacctgc ctgaaaccga actgcccgct
541 gttctgcagc cggtcgcgga ggccatggat gcgatcgctg cggccgatct tagccagacg
601 agcgggttcg gccatttcgg accgcaagga atcgggtcaat aactacatg gcgtgatctc
661 atatgcgcga ttgctgatcc ccatgtgat cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgctc
721 agtgcgtccg tcgcgcaggc tctcgatgag ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa
781 gtccggcacc tcgtgcagcg ggatttcggc tccaacaatg tcctgacgga caatggccgc
841 ataacagcgg tcattgactg gagcgaggcg atgttcgggg attccaata cgaggtcgcc
901 aacatcttct tctggaggcc gtggttggct tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag
961 cggaggcatc cggagcttgc aggatcgccg cggctccggg cgtatatgct ccgcatgggt
1021 cttgaccaac tctatcagag cttggttgac ggcaatttcg atgatgcagc ttgggcgacg
1081 ggtcgatgcg acgcaatcgt ccgatccgga gccgggactg tcgggcgtac acaaatcgcc
1141 cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatggc tgtgtagaag tactcgccga tagtggaaac
1201 cgacgccccca gcaactcgtcc gagggcaaaag gaatag

```

Gambar II.7 Gen resistensi higromisin (*hph*, higromisin fosfotrasferase) dari *E. coli* (Gene Bank, K01193)

Setelah transformasi, dilakukan proses identifikasi sel transforman pada medium yang mengandung higromisin B. Hanya sel yang memiliki konstruksi plasmid-gen *hph* yang dapat tumbuh, sedangkan sel non transforman tidak dapat

tumbuh. Selanjutnya dilakukan deteksi gen tersebut dalam genom sel transforman melalui metode deteksi tertentu (de la Riva *et al*, 2004).

II.5 Deteksi Gen Marka Seleksi dalam Sel Transforman

Deteksi vektor-gen sisipan dalam sel transforman dapat dilakukan dengan mengampifikasi sebagian atau seluruh vektor-gen sisipan secara *in vitro* melalui metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR adalah proses amplifikasi DNA menggunakan sepasang primer yang memiliki urutan basa yang komplementer terhadap urutan basa tertentu pada vektor-gen sisipan. Primer-primer tersebut diperpanjang oleh enzim DNA polimerase, menggunakan monomer-monomer deoksinnukleotida trifosfat (dNTP) (Newton & Graham, 1984).

Melalui metode PCR, amplifikasi fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat, spesifik dan tidak memerlukan jumlah dan kualitas cetakan DNA yang tinggi. Pada kapang berfilamen, cetakan DNA berupa DNA yang diisolasi dari spora atau miselium, baik dari biakan segar, biakan beku atau dari herbarium. Tetapi tidak ada protokol PCR yang dapat diterapkan pada setiap sampel, sehingga setiap aplikasi PCR memerlukan tahap optimasi (Newton & Graham, 1984)

Amplifikasi dilakukan melalui inkubasi komponen-komponen reaksi PCR dalam alat *Thermalcycler* selama beberapa siklus PCR. Setiap siklus terdiri dari tahap denaturasi (pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal), tahap hibridisasi (penempelan primer pada urutan basa yang komplementer) serta tahap elongasi/polimerisasi (perpanjangan rantai DNA). Jumlah siklus PCR ditentukan oleh panjang cetakan DNA yang diamplifikasi. Setelah sejumlah x cetakan DNA diamplifikasi selama n siklus, maka dihasilkan $(2^n - 2n)X$ ampikon (Newton & Graham, 1984).

Siklus PCR biasanya diawali denaturasi awal pada suhu 93°C selama 3 menit, dilanjutkan tahap denaturasi pada suhu $90-95^\circ\text{C}$ selama 30 detik. Pada tahap hibridisasi, primer akan menempel pada urutan DNA komplementer pada suhu $40-46^\circ\text{C}$. Sedangkan tahap elongasi untai DNA berlangsung pada suhu $70-75^\circ\text{C}$, dengan waktu inkubasi yang tergantung pada panjang DNA yang diamplifikasi (Newton & Graham, 1984).

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode transformasi gen resistensi higromisin B (*hph*) dalam plasmid pUR5750 ke genom kapang *M. purpureus* mutan albino melalui mediasi *Agrobacterium tumefaciens* LBA1100, yang menghasilkan sel transforman yang stabil. Hasil penelitian ini merupakan suatu sistem transformasi genetik untuk kapang *M. purpureus*, yang diperlukan untuk mengkaraktisasi gen-gen PKS yang terlibat dalam biosintesis zat warna, Monakolin K dan sitrinin.

Jika gen-gen biosintesis ini telah dikarakterisasi, maka satu atau beberapa gen dapat dinonaktifkan untuk memperoleh galur *M. purpureus* non produksi sitrinin. Dengan menggunakan galur baru tersebut, maka zat warna *Monascus* dapat dikembangkan menjadi zat warna alami yang aman untuk makanan dan kosmetik. Sedangkan Monakolin K dapat dikembangkan sebagai obat antihiperkolesterolemia alternatif bagi para penderita hiperkolesterolemia.

IV. METODE PENELITIAN

Higromisin B dengan variasi konsentrasi 10, 50, 100, 150 dan 200 µg/mL masing-masing ditambahkan ke dalam 5 mL medium YMP padat yang masih cair. Campuran tersebut dihomogenkan, dituang ke cawan-cawan petri, lalu dibiarkan memadat pada suhu kamar. Sebanyak 10^7 spora *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 dalam volume 100 µL diratakan di atas permukaan agar, lalu seluruh cawan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7-14 hari. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pleomisin terletak pada konsentrasi terkecil higromisin B yang masih dapat menghambat pertumbuhan *M. purpureus* ITBCC-HD-F002. Dengan cara yang sama, dilakukan penentuan KHM menggunakan konsentrasi higromisin sebesar 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 µg/mL .

A. tumefaciens LBA1100 yang membawa plasmid pUR5750 ditumbuhkan di medium LB padat yang ditambahkan kanamisin 100 µg/mL selama 48 jam pada suhu 28°C. Biakan padat disuspensikan dalam 10 medium LB cair yang mengandung kanamisin 100 µg/mL, lalu dikocok pada kecepatan 200 rpm pada suhu 28°C selama 12 jam. Biakan cair diinokulasikan ke medium induksi bakteri (LB cair yang mengandung *acetosyringone* 200 µM) sampai tercapai kekeruhan pada $OD_{600} = 0,2$,

dan dikocok pada kecepatan 100 rpm selama 5-6 jam atau sampai $OD_{600} = 0,8-1,0$ (10^9 koloni/mL).

Biakan padat *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 berumur 10-12 hari digerus halus dan disuspensikan dalam NaCl fisiologis. Suspensi tersebut disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 1, lalu filtratnya disentrifugasi 5.000 rpm selama 10 menit. Endapan spora diresuspensikan dalam air suling, lalu jumlah sporanya dihitung menggunakan hemasitometer.

Sebanyak 5 mL suspensi spora *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 ditambahkan pada 95 mL medium YMP cair, lalu dikocok dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 28°C selama 20 jam. Biakan cair tersebut disaring dengan kertas Whatman No 1, lalu endapan miseliumnya dicuci dua kali dengan air suling. Sebanyak 1 gram miselium disuspensikan dalam 1 mL air suling ganda, sedangkan sisa miselium digunakan untuk preparasi protoplas.

Untuk mendapatkan protoplas, miselium disuspensikan dalam 20 mL larutan enzim pelisis (enzim pelisis dari *T. harzianum* 5 mg/mL, selulase 10 mg/mL dan maserozim 10 mg/mL) dalam dapar PKM (dapar fosfat 50 mM pH 5,8, KCl 0,5 M dan MgSO₄ 0,1 M), lalu dikocok dengan kecepatan 100 rpm selama 3 jam pada suhu 28°C. Pembentukan protoplas terus diamati di bawah mikroskop. Protoplas difilter melalui kertas Whatman No.1, dipekatkan melalui sentrifugasi 3.000 rpm selama 20 menit. Endapan dicuci dan disuspensikan dalam 1 mL dapar Tris HCl pH 7,0 yang mengandung kalsium klorida 50 mM. Jumlah protoplas yang diperoleh dihitung menggunakan hemasitometer.

Transformasi dilakukan melalui kokultivasi 1 mL suspensi spora, 1 mL (1 gram/mL) miselium dan 1 mL protoplas *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 masing-masing dengan 1 mL biakan cair *A. tumefaciens* LBA1100. Sebanyak 100 µL hasil kokultivasi diratakan di atas kertas Whatman No.1, yang diletakkan di atas di medium YMP padat yang ditambah 200 µM *acetosyringone* (AS +) dan di atas medium YMP padat saja (AS-). Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 22-25°C dan 26-28°C selama 72 jam. Kertas Whatman tersebut ditransfer ke medium seleksi (YMP padat yang mengandung higromisin 50 µg/mL dan sefotaksim 400 µM). Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 28°C sampai tampak pertumbuhan koloni-koloni transforman higromisin (7-14 hari). Kertas Whatman yang ditumbuhi koloni

tersebut ditransfer ke medium seleksi yang baru. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 28°C sampai tampak pertumbuhan koloni-koloni transforman higromisin (7 hari). Koloni-koloni yang tumbuh di masing-masing cawan petri dihitung, lalu ditentukan frekwensi transformasi berupa koloni transforman per 10^7 spora atau per 10^7 protoplas atau per gram miselium *M. purpureus* ITBCC-HD-F002.

Sekitar 50 transforman generasi kedua dipilih secara acak dari beberapa proses transformasi, lalu ditumbuhkan dalam medium seleksi transformasi dan medium non seleksi selama 7 hari pada suhu 28°C. Diameter koloni generasi ketiga pada kedua medium diukur untuk mengetahui efek penambahan higromisin dan sefotaksim terhadap laju pertumbuhan koloni. Koloni-koloni dari medium seleksi ditumbuhkan kembali di medium seleksi baru (generasi keempat). Selanjutnya, koloni-koloni yang bertahan hidup ditumbuhkan pada medium seleksi transformasi yang mengandung higromisin sebanyak 200 µg/mL. Jumlah transforman yang tumbuh pada generasi kelima dihitung, untuk menentukan stabilitas mitotik dari transforman.

Untuk mendeteksi gen higromisin (*hph*) dalam sel transforman higromisin, digunakan sepasang primer *hph122U* (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') dan *hph725L* (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATAACAAG-3') berdasarkan urutan nukleotida gen *hph* dari *E. coli* (1.026 pb) pada Gene Bank. Primer-primer tersebut dapat mengamplifikasi fragmen pada gen *hph* sepanjang 600 pb. Sintesis primer dilakukan oleh Proligo-Sigma, Singapura.

Reaksi PCR dilakukan terhadap DNA genom dari transforman higromisin yang dipilih secara acak, DNA plasmid pUR5750 sebagai kontrol positif dan DNA genom *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 sebagai kontrol negatif. Komponen PCR terdiri dari 5 µL DNA genom, 0,5 µL primer *hph122U* 20 pmol/µL dan 0,5 µL primer *hph725L* 20 pmol/µL, 0,5 µL deoksinukleotida trifosfat 20 mM, 0,2 µL *Taq* DNA polymerase 5U/µL dan 2,5 µL larutan daparnya yang sudah mengandung magnesium klorida serta 0,5 µL dan air suling ganda sampai volume 25 µL. Program PCR diawali denaturasi awal (4 menit, 95°C), 35 siklus PCR yang terdiri dari denaturasi (45 detik, 94°C), hibridisasi (1,5 menit, 60°C) dan elongasi (1 menit 30 detik, 72°C) dan ditutup elongasi akhir (72°C, 10 menit).

Elektroforesis produk PCR dilakukan menggunakan gel agarosa 0,8% (b/v) dalam dapar elektroforesis TAE 1X, selama 50 menit pada tegangan 100 Volt. DNA marka yang digunakan adalah λ /HindIII/EcoRI.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) higromisin terhadap *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 adalah sebesar 4,0 μ g/mL (Tabel V.1).

Tabel V.1 Hasil Penentuan KHM Higromisin B terhadap *M. purpureus* ITBCC-HD-002

No. Cawan	Konsentrasi Higromisin (μ g/mL)					
	0	2,0	4,0	6,0	8,0	10
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-

Keterangan : + ada pertumbuhan koloni
- tidak ada pertumbuhan koloni

Sedangkan hasil penelitian Campoy *et al.* (2003) menunjukkan bahwa *M. purpureus* IBBC1, yang merupakan mutan over produksi zat warna, mempunyai KHM higromisin sebesar 100 μ g/mL. Hal tersebut menunjukkan *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 sangat sensitif terhadap higromisin dibandingkan *M. purpureus* lainnya, sehingga lebih cocok digunakan sebagai sel penerima proses transformasi yang menggunakan marka seleksi gen resistensi higromisin. Konsentrasi higromisin yang digunakan medium seleksi adalah 12,5 kali harga KHM, yaitu 50 μ g/mL. Pertimbangan penggunaan konsentrasi tersebut adalah mengantisipasi jumlah sel kapang yang ditumbuhkan lebih banyak daripada yang digunakan pada saat penentuan KHM.

A. tumefaciens LBA 1100 yang membawa plasmid pUR5750 harus ditanam pada medium LB yang mengandung kanamisin 100 μ g/mL, karena marka seleksi plasmid tersebut dalam sel bakteri adalah kanamisin. Bakteri tersebut ditanam dalam LB cair selama 12 jam untuk mendapatkan biakan muda, dilanjutkan pengocokan selama 4-6 jam untuk mendapatkan biakan fase logaritmik tanpa penambahan

kanamisin, karena dikhawatirkan mengganggu proses transformasi. Pada preparasi biakan fase logaritmik ditambahkan *asetosyringone*, dengan tujuan untuk memulai proses aktivasi gen *vir* pada *Agrobacterium*.

Preparasi protoplas dilakukan melalui pelisisan dinding sel menggunakan enzim pelisis dari *T. harzianum*, selulase dan maserozim. Penggunaan campuran enzim dilakukan untuk memperkuat kerja enzim pelisis dari *T. harzianum*, karena sebagian besar komponen dinding sel jamur tersusun dari selulosa. Pada tahap preparasi spora, miselium dan protoplas sel kapang, diperoleh spora sebanyak $1,2 \times 10^8$ spora/mL, miselium sebanyak 5,67 gram berat basah dan protoplas sebanyak $2,89 \times 10^7$ protoplas/mL.

Transformasi dilakukan dengan mengkokultivasi spora, miselium dan protoplas kapang dengan biakan bakteri fase logaritmik dalam kertas saring di atas media induksi, yaitu medium YMP yang mengandung *asetosyringone* (AS+). Tujuan penambahan *asetosyringone* disini adalah untuk meningkatkan aktivasi gen *vir* pada sel bakteri, sehingga berlangsung proses infeksi dan integrasi T-DNA pada plasmid Ti dari sel bakteri ke genom sel kapang. Interaksi tersebut memerlukan medium pelantara padat, sehingga kokultivasi dilakukan di atas menggunakan kertas saring Whatman No.1. Hal ini berdasarkan beberapa penelitian pada kapang berfilamen lainnya yang menggunakan medium pelantara padat berupa membran nilon, membran nitroselulosa dan membran selulosa (kertas saring Whatman).

Proses kokultivasi berlangsung pada 2 variasi waktu, yaitu 22-25°C dan 25-28°C dengan waktu inkubasi selama 72 jam. Hal ini berdasarkan literatur bahwa waktu inkubasi terbaik untuk kokultivasi kapang berfilamen adalah 72 jam pada suhu 24°C, karena pada suhu di atas 26°C mulai terjadi penurunan frekuensi transformasi, bahkan di atas suhu 30°C tidak diperoleh koloni transforman. Hal ini disebabkan pada suhu di atas 30°C terjadi perubahan konformasi protein VirA sehingga protein tersebut tidak aktif dan tidak dapat menginduksi aktivitas gen-gen *vir* lainnya.

Selanjutnya kertas saring tersebut dipindahkan ke medium seleksi padat yang mengandung higromisin 50 µg/mL dan sefotaksim 400 µM. Penambahan sefotaksim bertujuan untuk membunuh sel *Agrobacterium* yang telah mentransfer dan mengintegrasikan gen *hph* dalam T-DNA ke genom sel kapang. Setelah terlihat pertumbuhan koloni, kertas saring tersebut ditransfer dalam posisi tidak dibalik ke

medium seleksi baru sebagai generasi kedua. Koloni yang tumbuh di medium seleksi kedua dihitung untuk menentukan frekwensi transformasi, karena koloni yang tumbuh pada generasi pertama sebagian merupakan koloni non transforman yang sempat tumbuh di medium induksi. Hasil tranformasi plasmid pUR5750 ke sel *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 melalui mediasi *A. tumefaciens* LBA 1100 dapat dilihat pada Tabel V.2.

Tabel V.2 Hasil Transformasi Plasmid pUR5750 ke Sel *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 melalui Mediasi *Agrobacterium tumefaciens* LBA1100

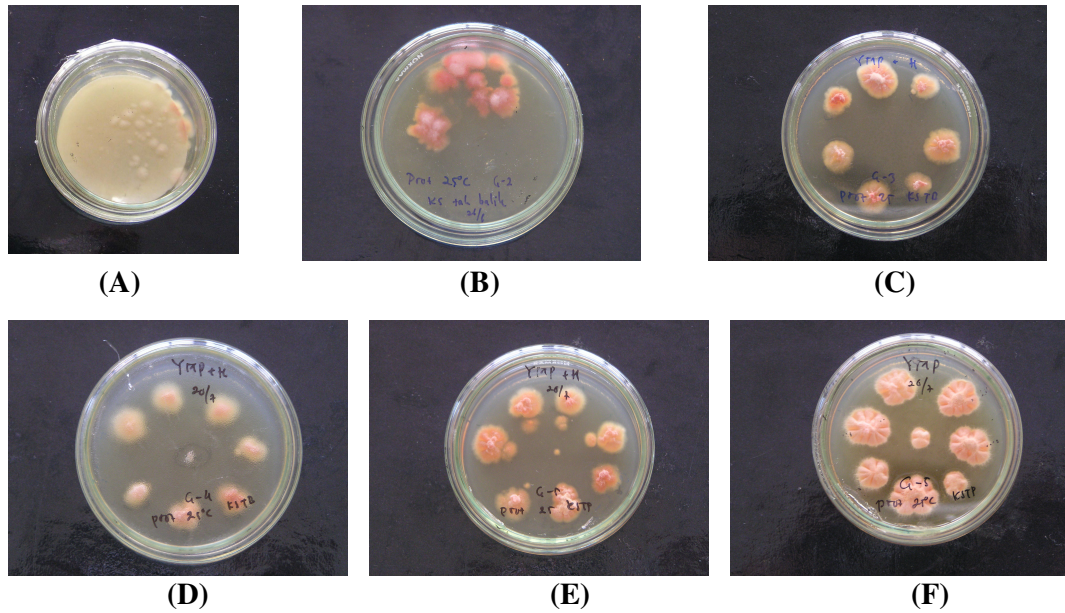
Jenis sel <i>M. purpureus</i> ITBCC-HD-F002	<i>Acetosyringone</i>		Suhu kokultur (°C)		Jumlah koloni
	AS (+)	AS (-)	22-25	25-28	
Spora	+		+		0
	+		+		0
	+			+	0
	+			+	0
		+	+		0
		+	+		0
		+		+	0
		+		+	0
Miselium	+		+		0
	+		+		0
	+			+	0
	+			+	0
		+	+		0
		+	+		0
		+		+	0
		+		+	0
Spora	+		+		0
	+		+		0
	+			+	26
	+			+	0
		+	+		0
		+	+		0
		+		+	0
		+		+	0

Keterangan : (+) adalah kondisi transformasi yang dipilih

Dari Tabel V.2 dapat dilihat bahwa kondisi optimum untuk melakukan transformasi gen resistensi higromisin (*hph*) ke sel *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 dengan mediasi *Agrobacterium tumefaciens* LBA100 adalah jenis sel protoplas, kokultur dengan penambahan *asetosyringone* 200 µM pada suhu inkubasi 25-28°C.

Pada kondisi optimum tersebut diperoleh 26 koloni, dengan frekwensi transformasi $350 \text{ transforman}/10^7$ protoplas. Tidak diperolehnya transforman dari sel penerima berbentuk spora dan miselium disebabkan oleh ukuran plasmid pUR5750 sebesar 15 kb, sehingga menyulitkan proses integrasi plasmid ke dalam genom sel transforman. Sebagai kontrol negatif, sel bakteri dan sel kapang ditumbuhkan dalam medium YMP tanpa penambahan *asetosyringone* (AS-).

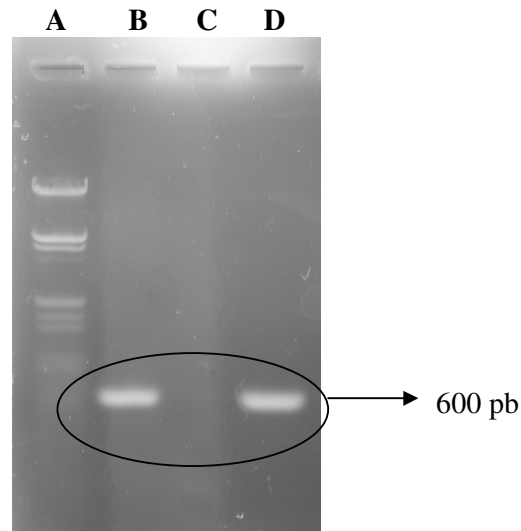
Uji stabilitas terhadap transforman higromisin dilakukan dengan menumbuhkan 50 koloni transforman yang dipilih secara acak pada medium seleksi transformasi dan medium non seleksi. Diameter koloni generasi ketiga pada kedua medium tidak menunjukkan adanya perbedaan ukuran koloni (rata-rata diameter koloni sebesar 1,2-1,7 cm). Koloni-koloni dari medium seleksi ditumbuhkan kembali di medium seleksi baru (generasi keempat). Selanjutnya, koloni-koloni yang bertahan hidup ditumbuhkan pada medium seleksi transformasi yang mengandung higromisin sebesar $200 \mu\text{g/mL}$, yaitu 4 kali dari konsentrasi higromisin pada medium seleksi. Uji stabilitas mitotik transforman menunjukkan bahwa 100 % koloni transforman dapat tumbuh sampai generasi kelima. Bahkan generasi kelima tetap tumbuh pada konsentrasi higromisin $200 \mu\text{g/mL}$ (Gambar V.1)



Gambar V.1 Hasil uji stabilitas transforman higromisin dari *M. purpureus* ITBCC-HD-F002

- Keterangan :
- A. Generasi 1
 - B. Generasi 2
 - C. Generasi 3, di medium seleksi (1) dan non seleksi (2)
 - D. Generasi 4
 - E. Generasi 5

Untuk mendeteksi keberadaan gen resistensi higromisin secara molekular, dilakukan amplifikasi sebagian gen *hph* yang diisolasi dari beberapa transforman higromisin. Hasil deteksi menunjukkan adanya pita berukuran 600 pb yang juga terdeteksi pada kontrol positif berupa DNA plasmid pUR5750. Sedangkan pada kontrol negatif yaitu DNA dari *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 tidak terdapat pita tersebut. Hasil ini menunjukkan gen resistensi higromisin terdapat dalam genom sel transforman higromisin (Gambar V.2).



Gambar V.3 Elektroforegram hasil amplifikasi gen *hph* dalam sel transforman higromisin dari *M. purpureus* ITBCC-HD-F002

Keterangan : A. DNA marka λ HindIII/EcoRI
 B. DNA plasmid pUR5750 (kontrol positif)
 C. DNA *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 (kontrol negatif)
 D. DNA transforman higromisin B dari *M. purpureus* ITBCC-HD-F002

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

Transformasi gen *hph* dari plasmid pUR5750 ke dalam protoplas *Monascus purpureus* ITBCC-HD-F002 melalui mediasi *Agrobacterium tumefaciens* LBA1100 dapat menghasilkan frekwensi transformasi sebesar $350 \text{ transforman}/10^7$ protoplas dengan stabilitas transforman 100 % selama 5 generasi. Bahkan generasi kelima tetap stabil pada medium seleksi dengan konsentrasi higromisin sebesar 4 kali KHM.

VI.2 Saran

Untuk mengetahui keberadaan gen *hph* dalam genom sel transforman, disarankan untuk melakukan analisis Southern Blot. Sedangkan untuk memperoleh transforman stabil dari spora dan miselium, perlu dilakukan transformasi gen *hph* melalui plasmid dengan ukuran yang lebih kecil.

DAFTAR PUSTAKA

- Blanc, P. J., Loret, M. O., and Goma, G. (1998), Pigment and Citrinin Production During Cultures of *Monascus* in Liquid and Solid Media, **Advance in Solid State Fermentation**, Departement Genie Biochimique et Alimentaire, France, 393-399.
- Blanc, P. J., Loret, M. O., Santerre, A. L., Pareilleux, A., Prome, D., Laussac, J. P. and Goma, G. (1994), Pigments of *Monascus*, **Journal of Food Science**, 59 (4), 862-865.
- Bloom, M.V., G.A. Freyer, and D.A. Micklos (1995), **Laboratory DNA Science**, Benjamin Publ. Co. Press., New York, 281-288.
- Brown, T. A. (1991), **Pengantar Kloning Gena**, Yayasan Essentia Medica, Yogyakarta.
- Campoy, S., F. Perez, J.F. Martin, S. Gutierrez, P. Liras (2003) Stable Transforms of *A. Nidulans* obtained by Protoplast Transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA Transfer, **Cur. Genet.**, 43 : 447-452.
- Deden, I . D. (2004), Mutasi Kapang *Monascus sp.* Dengan Etil Metana Sulfonat dan Analisis Kadar Sirtinin Hasil Fermentasi cair Galur Induk dan Mutannya, **Tesis Magister Jurusan Farmasi ITB**, Bandung.
- Deacon, J. W., (1997), **Modern Mycology**, Blackwell Science, London, 37-39
- Fincham, R.S. (1989) Transformation in Fungi, **J. Microbiol. Rev.**, 53 (1), 148-170.
- Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J., Beijersbergen, A.G.M., 1998, *agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of Filamentous fungi, **Nat Biotechnology** 16, 839-842.
- Hajjaj, H., A. Klabe, M.O. Loret, G. Goma, P.J. Blanc, and J. Francois (1999) Biosynthesis Pathway of Citrinin in The Filamentous Fungi *Monascus ruber* as Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance, **Appl. And Environ. Microbiol.**, 65(1), 311-314.
- Herzog, R.W., H. Daniell, N.K. Singh, and P.A. Lemke (1996) A Comparative Study on The Trnasformation of *Aspergillus nidulans* by Microprojectile Bombardment of Conidia and a More Conventional Procedure Using Protoplast Treated with Polyethylenglycol, **J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 45, 333-337.
- Keane, M. (1999) **The Red Yeast Rice Cholesterol Solution**, Adams Media Corp., Massachusetts, 1-90.

Lakrod, K., Chairisook, C., and Skinner, D.Z. (2003), Tanasformation of *Monascus purpureus* to hygromycin B resistance with cosmid pMOcosX reduces fertility, **Molecular Biology and Genetics**, 6(2).

Malonek, S., F. Meinhardt (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Gene Transformation of The Phytopathogenic Ascomycete *Calonectria morganii*, **Curr. Genet.** 40:152-156.

Pastrana, L., P.J. Blanc, A.L. Santerre, M.O. Loret, and G. Goma (1995) Production of Red Pigments by *Monascus ruber* in Synthetic Media with a Strictly Controlled Nitrogen Source, **Process Biochem.**, 30(4):333-341.

Riva, G.A., Cabrera, J.G., Padron, R.V., and Pardo, C.A., 2006, The *Agrobacterium tumefaciens* gene Transfer to Plant Cell, www.ejbiotechnology.info, Juni 2006.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989), **Molecular Cloning a Laboratory Manual 2nd Ed.**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Snyder L, and W. Champness, (1997) **Molecular Genetics of Bacteria**, 2nd Edition, ASM Press, Washington, 49-158.