

**TRANSFORMASI *MONASCUS PURPUREUS* MUTAN ALBINO
MENGUNAKAN GEN NITRAT REDUKTASE DARI
*ASPERGILLUS NIDULANS***

Tiana Milanda¹, Triyani Sumiati², Marlia S. Wibowo², Tutus Gusdinar²,
Haryanto Dhanutirto²

¹Jurusan Farmasi, FMIPA, UNPAD, Jatinangor

²Sekolah Farmasi, ITB, Bandung

ABSTRAK

Transformasi heterolog pada kapang *Monascus purpureus* mutan albino telah dikembangkan menggunakan marka gen struktural nitrat reduktase (*niaD*) dari *Aspergillus nidulans*. Auksotrof nitrat reduktase dari mutan albino diperoleh melalui mutasi menggunakan etil metansulfonat (2,5 % v/v) dan klorat (0,4 mM). Auksotrof tersebut diubah menjadi prototrof oleh gen *niaD* dalam plasmid pSTA14 yang ditransformasi ke protoplas melalui mediasi polietilenglikol. Proses transformasi ini menghasilkan frekwensi transformasi sebesar 2-16 transforman per µg DNA plasmid. Studi stabilitas mitotik menunjukkan seluruh transforman stabil sampai generasi kelima. Keberadaan gen *niaD* dalam genom transforman telah dibuktikan melalui PCR.

Kata kunci : *Monascus purpureus*, mutan albino, auksotrof, gen *niaD*, protoplas, transformasi

TRANSFORMATION OF *MONASCUS PURPUREUS* ALBINO'S MUTANT WITH THE NITRATE REDUCTASE GENE OF *ASPERGILLUS NIDULANS*

Tiana Milanda¹, Triyani Sumiati², Marlia S. Wibowo², Tutus Gusdinar²,
Haryanto Dhanutirto²

¹Department of Pharmacy, FMIPA, UNPAD, Jatinangor

²School of Pharmacy, ITB, Bandung

ABSTRACT

A heterologous transformation for *Monascus purpureus* albino's mutant was developed base on the nitrate reductase structural gene (*niaD*) from *Aspergillus nidulans*. An auxotroph of nitrate reductase from the albino's mutant was obtained by mutation using ethyl methanesulphonate (2.5 % v/v) and chlorate (0.4 mM). This auxotroph was transformed to prototroph using *niaD* gene in pSTA14 plasmid, through protoplast treated by polyethyleneglycol. Transformation process yielded transformation frequencies about 2-16 transformants per µg DNA plasmid. Mytotic stability studies demonstrated that all transformants were stabile up to 5 generation. The presence of the *niaD* gene in transformants genome was analysed by PCR.

Key words : *Monascus purpureus*, albino's mutant, auxotroph, *niaD* gene, protoplast, transformation

Pendahuluan

Monascus purpureus adalah kapang berfilamen *ascomycetes* yang membentuk spora aseksual uninukleat. Selama beratus-ratus tahun, kapang ini dikenal sebagai penghasil zat warna alami yang digunakan secara luas di daerah Timur Jauh sebagai pewarna beras (angkak), produk daging olahan, anggur atau sebagai obat tradisional Cina (Hiroi *et al.*, 1979; Jacobson and Wasileski, 1994). Zat warna *Monascus* mempunyai stabilitas yang tinggi terhadap pH dan suhu, sehingga dapat digunakan untuk menggantikan zat warna sintetik pada makanan. Selain itu, *M. purpureus* memproduksi senyawa statin (antara lain

lovastatin), yang menghambat aktivitas 3-hidroksimetilglutaril-KoA reduktase, sehingga dapat digunakan untuk menurunkan tingkat kolesterol dalam darah (Endo, 1985).

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

Berdasarkan beberapa penelitian terakhir, produksi sitrinin dapat dihindarkan melalui detoksifikasi produk *Monascus*, fermentasi menggunakan galur non produksi sitrinin atau memodifikasi kondisi fermentasi. Upaya-upaya tersebut dapat menghilangkan atau menekan jumlah sitrinin, tetapi produksi zat warna dan lovastatin juga menurun secara bermakna. Hal ini disebabkan ketiga metabolit sekunder *Monascus* disintesis melalui alur biosintesis yang sama, yaitu alur biosintesis poliketida. 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, lovastatin atau sitrinin dalam *M. purpureus* (S. Campoy *et al.*, 2003).

Transformasi DNA asing ke berbagai kapang berfilamen dapat dilakukan melalui transformasi protoplas yang dimediasi oleh polietilenglikol Transformasi diseleksi berdasarkan marka seleksi berupa marka seleksi dominan (gen resistensi antibiotik) atau melalui skrining positif terhadap mutan auksotrofik yang termutasi pada gen tertentu (Cantoral *et al.*, 1987; Punt *et al.*, 1987)..

Pada penelitian ini, dilakukan transformasi heterolog gen nitrat reduktase (*niaD*) dari *Aspergillus nidulans* ke dalam protoplas auksotrof nitrat reduktase dari *M. purpureus* mutan albino yang dimediasi oleh polietilenglikol. Sistem transformasi ini merupakan langkah awal untuk mengkloning gen-gen biosintesis sitrinin. Jika gen-gen biosintesis tersebut telah dikarakterisasi, maka satu atau beberapa gen akan dirusak untuk mendapatkan galur *M. purpureus* yang tidak memproduksi sitrinin secara genetik.

Bahan dan Metode

Galur kapang dan kondisi pembiakan

M. purpureus ITBCC-HD-F002, galur yang tidak memproduksi zat warna (albino) and lovastatin, diperoleh melalui mutagenesis etil metansulfonat (EMS) terhadap isolat alam, *M. purpureus* ITBCC-HD-F001. Mutan ini ditumbuhkan pada medium YMP padat (0,3 % ekstrak ragi, 0,3 % ekstrak malt extract, 0,6 % pepton, 2,0 % glukosa dan 1,5 % agar) selama 7-10 hari pada suhu 28°C. Spora dari biakan padat disuspensikan dalam NaCl fisiologis dan digunakan sebagai inokulum untuk biakan cair dalam medium YMP cair.

Plasmid

Plasmid pSTA14 (7 kb), merupakan plasmid integratif yang membawa gen nitrat reduktase (*niaD*) dari *Aspergillus nidulans* (dari S.S. Sandhu, Departement of Biological Science, Rani Durgawati University, India).

Mutagenesis *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 menggunakan EMS dan klorat

Sebanyak 50 mL medium YMP cair diinokulasi oleh 10^5 spora/mL *M. purpureus* ITBCC-HD-F002, lalu diinkubasi selama 62 jam pada suhu 28°C dengan pengocokan 150 rpm. Sekitar 10 mL biakan cair disentrifugasi ($10.000 \times g$, 10 menit, pada suhu 4°C) dan diresuspensi dalam 10 mL dapar penstabil (dapar fosfat 0,2 M pH 7.0). Satu mL suspensi diinkubasi dalam campuran 100 µL glukosa 2 %, 850 µL dapar penstabil dan 50 µL EMS pada suhu 28°C selama 90 menit dengan pengocokan 150 rpm. Proses mutasi dihentikan melalui penambahan 2 mL natrium tiosulfat 5 %, lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu 28°C dengan pengocokan 150 rpm. Seluruh campuran disentrifugasi ($10.000 \times g$, 10 menit, pada suhu 4°C) dan diresuspensi dalam 1 mL dapar penstabil.

Mutan-mutan EMS ditumbuhkan di medium minimal/MM (2,5 % agar potato dekstrosa, 5 % glukosa, 0,15 % NaCl, 0,1 % MgSO₄ dan 0,25 % KH₂PO₄) yang mengandung variasi konsentrasi klorat (0,1, 0,2, 0,3, dan 0,4 mM) serta 5 mM urea. Seluruh biakan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7-14 hari.

Mutan resisten klorat ditumbuhkan pada medium MM yang mengandung variasi sumber nitrogen berupa : 23 mM NaNO₃, 10 mM NaNO₂, 5 mM amonium tartrat dan 0,7 mM glutamat). Seluruh biakan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7-14 hari.

Preparasi protoplas dan proses transformasi

Proses transformation dilakukan berdasarkan modifikasi metode Herzog *et al.* (1996) untuk *A. nidulans*. Sekitar 50 mL medium YMP cair diinokulasi dengan 10^5 spora/mL auksotrof *niaD*, lalu diinkubasi selama 20 jam pada suhu 28°C dengan pengocokan 150 rpm. Miselium disaring menggunakan kertas Whatman No.1, dicuci dua kali dengan KCl 0,6 M dan diresuspensi dalam 20 mL KCl 0,6 M yang mengandung enzim pelisis. Enzim pelisis yang digunakan adalah : (1) enzim pelisis dari *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) 5 mg/mL (2) campuran enzim pelisis dari *T. harzianum* (Sigma-Aldrich) 5 mg/mL dan selulase (Sigma-Aldrich) 10 mg/mL (3) campuran glucanex (Sigma-Aldrich), selulase (Sigma-Aldrich) dan maserozim (Sigma-Aldrich) masing-masing 10 mg/mL. Seluruh suspensi diinkubasi pada suhu 28°C dengan pengocokan 100 rpm dan pembentukan protoplas diamati di bawah mikroskop selama 3 jam. Protoplas disaring menggunakan kertas Whatman No.1, disentrifugasi (3,000 x g, 20 menit), dan dicuci dua kali dengan 50 mM CaCl₂.

Pada proses transformasi, 100 µL suspensi protoplas (10^7 protoplas/mL), 10 µg plasmid pSTA14 dan 50 µL larutan PEG (60 % PEG 6000, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM CaCl₂) diinkubasi selama 20 menit dalam es. Setelah ditambahkan 1 mL larutan PEG, campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Campuran tersebut ditumbuhkan pada medium seleksi (MM yang mengandung 23 mM NaNO₃), lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 14 hari. Jumlah koloni total dihitung, koloni diseleksi dan dipindahkan pada medium seleksi yang baru sampai generasi kelima (uji stabilitas transforman).

Isolasi dan amplifikasi DNA

DNA transforman diekstraksi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Analisis PCR untuk mendeteksi gen *niaD* dalam genom transforman dilakukan menggunakan sepasang primer *niaDF* (5'GGAGGGCGAGTGTCAAGT3') dan *niaDR* (5'GCCCCAGTTCATTCGTC3'), yang menghasilkan fragmen DNA sepanjang 811 pb (sebagian dari gen *niaD*). Amplifikasi dilakukan melalui tahap denaturasi awal selama 3 menit pada suhu 94°C, diikuti 30 siklus PCR berupa 1 menit denaturasi (94°C), 1 menit hibridisasi (56°C) dan 1,5 min polimerisasi (72°C).

Hasil dan Pembahasan

Pada umumnya, auksotrof nitrat reduktase (*niaD*) diperoleh melalui mutasi spontan pada medium MM yang mengandung berbagai konsentrasi klorat (Dabousi *et al*, 1989). Tetapi auksotrof yang diperoleh melalui mutasi spontan tersebut biasanya kurang stabil (S.S. Sandhu *et al*, 1991). Oleh karena itu, untuk memperoleh auksotrof *niaD* yang stabil dari *M. purpureus*, dilakukan mutagenesis menggunakan EMS (2,5 %, waktu inkubasi 90 menit) dan klorat (0,4 mM). Hasil mutasi berupa 11 mutan resisten klorat diseleksi pada MM yang mengandung variasi sumber nitrogen, termasuk nitrat. Auksotrof *niaD* dapat tumbuh pada semua sumber nitrogen, kecuali nitrat. Dari 11 mutan resisten klorat, diperoleh 2 auksotrof nitrit reduktase (*nii*) dan 1 auksotrof *niaD* (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Seleksi Auksotrof *niaD* dari Mutan Resisten Klorat
M. purpureus ITBCC-HD-F002

No. Koloni	Medium seleksi dengan sumber nitrogen				Keterangan
	Natrium nitrat	Natrium nitrit	Amonium tartrat	Glutamat	
1	+	+	+	+	Non mutan
2	+	+	+	+	Non mutan
3	-	-	+	+	Mutan <i>nii</i>
4	+	+	+	+	Non mutan
5	+	+	+	+	Non mutan
6	+	+	+	+	Non mutan
7	-	+	+	+	Mutan <i>niaD</i>
8	+	+	+	+	Non mutan
9	+	+	+	+	Non mutan
10	-	-	+	+	Mutan <i>nii</i>
11	+	+	+	+	Non mutan

Keterangan : + terdapat pertumbuhan koloni

- tidak terdapat pertumbuhan koloni

Untuk mengoptimasi pembentukan protoplas, miselium auksotrof *niaD* dari *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 dilisis oleh berbagai enzim pelisis. Penggunaan enzim pelisis dari *T. harzianum* menghasilkan 2.89×10^7 protoplas/mL. Penambahan selulase pada enzim pelisis dapat meningkatkan perolehan protoplas sampai $1,01 \times 10^8$ protoplast/mL. Hasil terbaik (9.8×10^8 protoplast/mL) diperoleh menggunakan campuran enzim pelisis glucanex, selulase and maserozim. Peningkatan perolehan protoplas melalui penambahan

glucanex dan maserozim menunjukkan struktur dinding sel *M. purpureus* tersusun dari polimer kompleks-glukan yang resisten terhadap enzim pelisis dari *T. harzianum*.

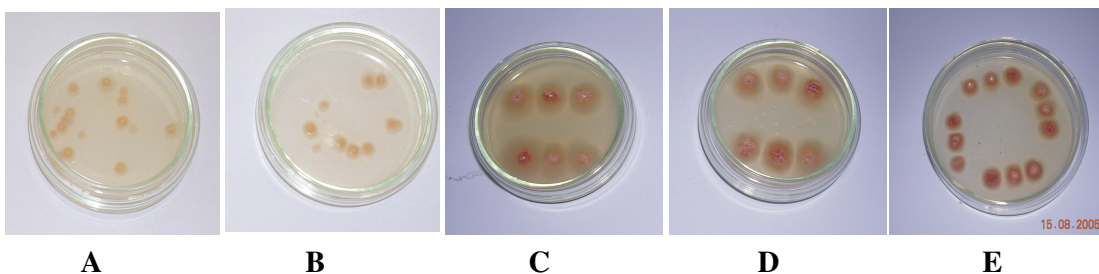
Proses transformasi dilakukan menggunakan campuran 10^7 protoplas dan 10 μg plasmids pSTA14, lalu transforman diseleksi pada MM yang mengandung nitrat. Koloni transforman tumbuh dengan miselium aerial setelah 7-14 hari dan dihasilkan frekwensi transformasi sebesar 2-16 transformants/ μg DNA. Sedangkan kontrol negatif, yaitu protoplas yang diinkubasi bersama air suling steril, tidak menghasilkan koloni transforman. (Tabel 2).

Tabel 2. Frekwensi Transformasi Plasmid pSTA14 ke Sel Auksotrof *niaD* dari *M. purpureus* ITBCC- HD-F002 Dengan Metode Protoplas-PEG

No.	Jumlah protoplas (protoplas/mL)	Konsentrasi plasmid (μg)	Frekwensi transformasi (transforman/ μg plasmid)
1	10^7	0	0
2	10^7	10	10
3	10^7	10	16
4	10^7	10	4
5	10^7	10	8
6	10^7	10	4
7	10^7	10	2
8	10^7	10	2

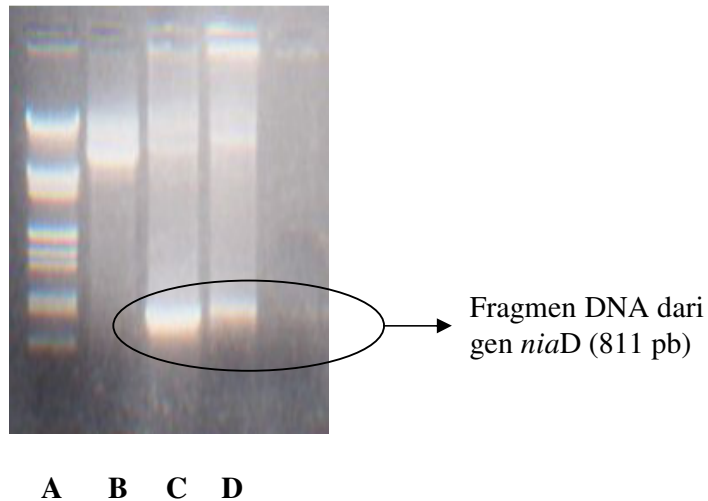
Keterangan : No. percobaan 1 adalah kontrol negatif

Hasil uji stabilitas dari 50 koloni transforman menunjukkan bahwa 100 % koloni memiliki stabilitas mitotik sampai generasi kelima (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil uji stabilitas transforman *niaD* dari *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 :
A. Generasi 1; B. Generasi 2; C. Generasi 3; D. Generasi 4; E. Generasi 5

Analisis PCR terhadap gen *niaD* pada sel transforman menghasilkan pita DNA sepanjang 811 pb, yang merupakan sebagian dari gen tersebut (Gambar 2)



Gambar 2. Deteksi PCR terhadap gen *niaD* gene dari sel transforman *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 : A. DNA marker λ /*HindIII/EcoRI*; B. DNA auksotrof *niaD* dari *M. purpureus* ITBCC-HD-F002 (kontrol negatif); C. DNA plasmid pSTA14 (kontrol positif); D. DNA sel transforman dari *M. purpureus* ITBCC-HD-F002

Ucapan Terima kasih

Penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian Tim Pascasarjana (HPTP) II, 2004-2006 dari Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional. Ucapan terima kasih juga disampaikan pada S.S. Sandhu untuk pemberian plasmid pSTA14.

Daftar Pustaka

1. Blanc, PJ, H. Hajjaj, MO. Loret, and G. Goma (1998) Control of Production of Citrinin by *Monascus*, **The Symposium on Monascus Culture and Applications**, Toulouse, France.

2. Blanc, PJ., MO. Loret, and G. Goma (1998) Pigments and Citrinin Production during Cultures of *Monascus* in Liquid and Solid Media, In **Advance in Solid State Fermentation**, Toulouse, France, 393-406.
3. Blanc, PJ., MO. Loret, and G. Goma (1995) Production of Citrinin by Various Species of *Monascus*, **Biotech. Let.**, 17(7), 291-294.
4. Campoy, S., F. Perez, JF. Martin, S. Gutierrez, P. Liras (2003) Stable Transformants of *M. purpureus* obtained by Protoplast Transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA Transfer, **Cur. Genet.**, 43 : 447-452.
5. Cantoral, JM, B. Diez, JL. Barredo, E. Alvarez and JF. Martin (1987) High Frequency Transformation of *Penicillium chrysogenum*, **Bio/Technology**, 5:494-497.
6. Daboussi, MJ., JA. Djeballi, C. Gerlinger, PS. Blaiseau, I. Bouvier, M. Cassan, MH. Lebrun, D. Parisot, and Y. Brygoo (1989) Transformation of Seven Species of Filamentous Fungi Using The Nitrate Reductase Gene of *Aspergillus nidulans*, **J.Curr. Genes**, 15, 1989, 453-456.
7. Endo, A. (1985) Compactin (ML-236B) and Related Compounds as Potential Cholesterol-lowering Agent that Inhibit HMG-CoA Reductase, **J. Med. Chem.**, 28 , 401-405.
8. Hiroi T, T. Shima, T. Suzuki, TA. Tsukioki, N. Ogaswara (1979) Hyperpigment Productive Mutant of *Monascus anka* for Solid Culture, **Agro. Biol. Chem.**, 43, 1973-1976.
9. Herzog, RW., H. Daniell, NK. Singh, and PA. Lemke (1996) A Comparative Study on The Transformation 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.

10. Jacobson, G., J. Wasileski (1994) Production of Food Colorants by Fermentation, In : A. Gabelmen (ed) **Bioprocess of Production Flavour, Fragrance and Color Ingredients**, Wiley Interscience, New York, pp. 205-237.
11. Punt, PJ., RP. Oliver, MA Dingemanse, MA Pouwels, CAMJJ van del Hondel (1987) Transformation in *Aspergillus* Based on The Hygromycin B Resistance Marker from *E. coli*, **Gene**, 56, 117-124.
12. Sandhu, SS., JR. Kinghorn, and RC. Rajak (2001) Transformation System of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Using Nitrate Reductase Gene of *Aspergillus nidulans*, **J. Indian Exp. Biol.**, 39(7), 650-653.