TRANSFORMASI PLASMID PTRLI DENGAN TEKNIK ELEKTROPORASI PADA *ASPERGILLUS TERREUS* DAN UJI STABILITAS TRANSFORMAN

[1]Dudi Hardianto, [2]Tutus Gusdinar, [3]Marlia Singgih, [4]Amir Musadad, [5]Wahono Sumaryono

Badan Pengkajian Bioteknologi (BPPT)
G.360 Building, Kawasan Puspiptek, Tangerang 15314
Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung
Labtek VII Building, Ganesha 10, Bandung 40132
E-mail : wahono@bppt.go.id

Abstract

Aspergillus terreus is a Saprophyte fungus that produces several secondary metabolites as lovastatin (anti-cholesterol drug) and itaconic acid (a polymer material). Lovastatin is one of the statin class of drugs that have efficacy as antihypercholesterolemic. Plasmid transformation is the introduction and incorporation of exogenous plasmid into cells or protoplast. In this study, pTRLI plasmid (pTRI inserts containing *lovE* gene as a regulator gene in the biosynthesis of lovastatin) will be transformed by electroporation transformation. The purpose of this research is transformation of pTRLI plasmid into protoplasts of *Aspergillus terreus* by electroporation and obtain stable transformants. The research was initiated by isolation of pTRLI plasmid. Then pTRLI plasmid was determined purity and concentration by nanodrop. Furthermore, Protoplasts of *Aspergillus terreus* were isolated enzymatically by adding an enzyme which can degrade the cell wall of *Aspergillus terreus* which contains chitin and cellulose. PTRLI plasmid were transformed into protoplasts of *Aspergillus terreus* by electroporation. These transformants were grown in Czapek-Dox medium containing pyrithiamine agar and the number of transformants μg^{-1} of pTRLI plasmid was calculated. Transformants were selected to grow in Czapek-Dox medium containing piritiamin 1 mg l^{-1}. The number of transformants produced 187 transformants μg^{-1} of PTRLI plasmid. Transformants are stable up to five generations by growing the transformants in Czapek-Dox medium agar containing piritiamin 1 mg l^{-1}. The success of the transformation indicated by *ptrA* gene in transformants that can be amplified by PCR. The size of fragment DNA is 801 bp.

Kata kunci: transformation plasmid, pTRLI plasmid, protoplast, *Aspergillus terreus*

1. PENDAHULUAN

Aspergillus terreus merupakan kapang samprofit yang tumbuh di tanah, kompos, dan dapat juga sebagai kontaminan pada produk jagung dan kacang (Balajee, 2009). *Aspergillus terreus* menghasilkan beberapa metabolit sekunder lovastatin yang digunakan sebagai obat antikolesterol, asam itakonat (*itaconic acid*) yang digunakan sebagai bahan polimer (Lai dkk., 2007).

Transformasi adalah proses masuknya molekul DNA asing dalam protoplas atau sel inang yang mengakibatkan perubahan materi genetika (Gillian dkk., 2010). Transformasi pada kapang dapat dilakukan dengan cara transformasi protoplas dengan penambahan larutan polietilenglikol, elektroporasi, tranformasi dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*, dan *particle bombardment*. Pada Penelitian ini plasmid pTRLI akan ditransformasikan dengan teknik transformasi elektroporasi. Beberapa kapang yang telah berhasil ditransformasi dengan elektroporasi diantaranya: *Neurospora crassa* (Chakraborty dan Kapoor, 1990); *Epichloe typhina* (Dombrowski dkk., 2011) *Tyromyces palustris, coriolus versicolor* (Furuno dkk., 1994); *Thermomyces lanuginosus* (Gangavaram dkk., 2009); *Pleurotus ostreatus* (Jing dkk., 2002); *Lentinula edodes* (Kuo dkk., 2008); *Colletrichum*

Diterima 3 Februari 2012; terima dalam revisi 12 Maret 2012; layak cetak 2 April 2012

trifolii (O'Neill dkk., 1998,); *Stylosanthes guianensis* (Quecini dkk., 2002); *Ganoderma lucidum* (Sun dkk., 2001); *Acrominium Endophyte* (Yunus dkk., 1998). Dari studi literatur diperoleh bahwa sampai saat ini masih belum ada transformasi dengan teknik elektroporasi pada *Aspergillus terreus* dengan menggunakan plasmid pTRLI.

Untuk membedakan sel yang mengalami transformasi dan yang tidak mengalami transformasi digunakan penanda seleksi (disandi oleh suatu gen dan dibawa oleh vektor atau plasmid). Ada 2 cara mendeteksi keberhasilan transformasi yang digunakan untuk kapang, yaitu (Fincham, 1989; Woloshuk dkk., 1989): dengan penanda resistensi dan penanda konversi mutan auksotrof menjadi prototrof. Penanda resistensi yang digunakan antara lain: resistensi terhadap benomil (gen *benA*), pleomisin (gen *ble*), higromisin (gen *hph*), dan piritiamin (gen *ptrA*) (Woloshuk dkk., 1989). Sedangkan penanda konversi mutan auksotrof menjadi prototroph antara lain: kemampuan mengubah nitrat menjadi nitrit (gen *niaD*), kemampuan untuk mensintesis pirimidin (gen *pyr4*), dan kemampuan untuk mensisntesis arginin (gen *argB*). Pada penelitian ini digunakan penanda resistensi terhadap piritiamin. Piritiamin adalah antagonis tiamin yang menghambat pertumbuhan *A, oryzae, A. niger, A. kawachii, A. shirousamii, A. sojae, A. tumarii, A. flavus, A. parasiticus, A. nidulans, A. terreus, A. fumigates, M. anka, T. reesei* (Kubodera dkk., 2002). Transforman akan timbuh dalam media seleksi Czapek-Dox agar yang mengandung piritiamin karena plasmid pTRI rekombinan mengandung gen *ptrA* yang mampu menggunakan piritiamin sebagai pengganti tiamin.

Tujuan dari penelitian ini adalah mentransformasi plasmid pTRLI dengan teknik elektroporasi ke dalam protoplas *Aspergillus terreus* dan mendapatkan transforman yang stabil.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan

Mikroorganisme yang digunakan adalah *Aspergillus terreus* dan *Echericia coli* DH5α yang mengandung plasmid pTRLI koleksi Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT, ekstrak ragi (Difco), ekstrak malt (Oxoid), pepton (Oxoid), glukosa (Difco), agar (Oxoid), piritiamin (Sigma), air bebas DNAse dan RNAse (MPBio), PDA (Oxoid), CZapex-Dox (Oxoid), ampisilin (Sigma), ladder 1 kb (Fermentas), agarosa (Fermentas), sybersafe (Invitrogen), kalium klorida (Merck), asam klorida (Merck), natrium klorida (Merck), bactotripton (Difco), kitinase (Sigma Chemical), selulase (Yakult Biochemical), maserozim (Yakult Biochemical), Kalsium klorida (Merck), primer (Alpha DNA), asam asetat glacial (Merck), medium YMP (ekstrak ragi 0,3%, ekstrak malt 0,3%, pepton 0,6 %, glukosa 2,0%), medium YMP padat (ekstrak ragi 0,3%, ekstrak malt 0,3%, pepton 0,6 %, glukosa 2,0%, agar 2,0%), medium LB (tripton 1%, NaCl 1%, ekstrak ragi 0,5%), medium LB padat (tripton 1%, NaCl 1%, ekstrak ragi 0,5%, agar 2%), larutan enzim (kitinase 0,1%, selulase 1%, dan maserozim 1%), kit PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara), kit isolasi plasmid (BioBasic), dapar TAE 50X (10 ml = 24,2 g Tris, 5,71 ml asam asetat glasial, 10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0), *Loading Buffer* (1,5 ml bromofenol biru 1%, 100 µl EDTA 0,5 M pH 8, glisreol 30% air sampai 10 ml), dan etanol absolut (Merck).

2.2. METODE

2.2.1. Isolasi DNA Plasmid pTRLI (EZ-10 column dari BioBasic).

Sebanyak 5 ml kultur *E.coli* yang diinkubasi semalam (20 jam) dalam medium LB cair yang mengandung ampisilin 100 µg ml^{-1} kemudian dipanen dengan dimasukkan ke dalam tabung 1.5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 2 menit. Lalu supernantan dibuang dan diresuspensi dalam 100 µl larutan larutan 1 diinkubasi selama 1 menit lalu tambahkan 200 µl larutan larutan , diinversi sebanyak 4 - 6 kali, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Sebanyak 350 µl larutan larutan 3 ditambahkan, diinversi sebanyak 4 - 6 kali, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 5 menit. Supernatan dipindahkan dalam kolom koleksi yang berada tabung dalam 2 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 2 menit. Larutan dalam tabung penampung dibuang. Lalu kolom ditambahkan Larutan pencuci sebanyak 500 µl dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 2 menit. Larutan dalam tabung dibuang. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 1 menit untuk menghilangkan sisa larutan pencuci. Larutan dalam tabung penampung dibuang. Kolom dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml dan ditambah 50 µl air bebas nuklease dan RNAse atau larutan elusi, diinkubasi selama 2 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 2 menit. Sebanyak 5 µl DNA plasmid dicampur dengan 1 µl *Loading Buffer* dan dimasukkan dalam sumur pada 1% gel agarosa yang mengandung sybersafe. Sampel dielektroforesis

Diterima 3 Februari 2012; terima dalam revisi 12 Maret 2012; layak cetak 2 April 2012

selama 20 menit pada 100 volt dan hasil elektroforesis dilihat dengan detektor UV.

2.2.2. Penentuan Kemurnian dan Konsentrasi DNA Plasmid

Isolat DNA plasmid diukur kemurnian dan konsentrasinya dengan menggunakan nanodrop pada λ260 nm dan λ280 nm. (Serapan (Absorbansi) pada λ260 nm = 1 sebanding dengan 50 μg/ml).

2.2.3. Preparasi dan Transformasi dengan Teknik Elektroporasi

Satu koloni *Aspergillus terreus* dalam cawan petri yang berumur 7 hari dihomogenisasi sampai halus dengan potter yang mengandung air steril 50 ml, kemudian disaring dan ditumbuhkan dalam 50 ml medium YMP cair diinkubasi selama 20 jam pada suhu kamar dengan kecepatan putaran 200 rpm di atas pemutar orbital. Setelah itu hifa disentrifugasi selama 5 menit pada 8.000 g. Endapan hifa dicuci air steril kemudian disuspensikan dalam 20 ml larutan enzim. Suspensi diinkubasi selama 3 jam pada suhu kamar dengan kecepatan putaran 100 ppm di atas pemutar orbital. Suspensi protoplas disaring untuk menghilangkan debris dan filtrat disentrifugasi pada 5. 000 g selama 20 menit kemudian endapan dicuci dengan air steril. Endapan protoplas disuspensi dalam air steril ditentukan jumlah protoplas dengan mengunakan hemositometer. Protoplas *Aspergillus terreus* sejumlah 10^7 dalam 400 µl larutan ditambahkan 10 µg plasmid, kemudian diinkubasi selama 20 menit dalam es dan dielektroporasi pada 2,5 kV cm^{-1} dengan menggunakan Gene Pulser Xcell dari BioRad. Hasil transformasi dicampur dengan 500 ul YMP 1 jam dan sebanyak 100 µl hasil transformasi ditumbuhkan dalam medium CZapex dox agar yang mengandung 1 mg l^{-1} piritiamin pada suhu kamar. Diamati pertumbuhan transforman dari hari ke 3 sampai hari ke 10. Setelah 5 hari ditentukan jumlah transformannya. Sebagai kontrol negatif plasmid diganti dengan air steril.

2.2.4. Uji Stabilitas Transforman

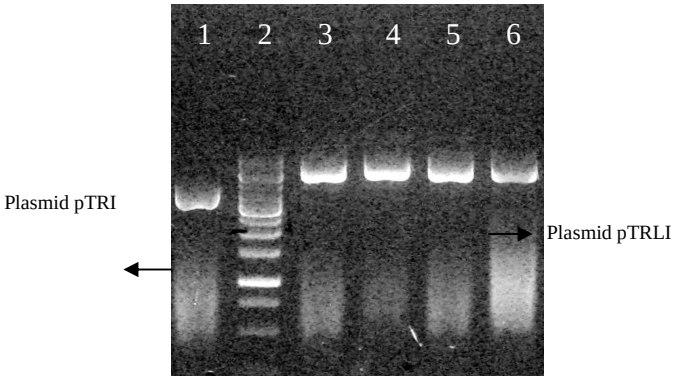
Transforman diuji stabilitasnya dengan cara ditumbuhkan dalam medium YMP padat yang mengandung 1 mg l^{-1} piritiamin sampai generasi ke 5.

2.2.5. Amplifikasi Fragmen *Gen ptrA* dengan PCR

Amplifikasi gen *ptrA* dengan menggunakan pTRLI (control positif) dan genom transforman sebagai *template*. Pada 1 tabung Eppendorf ditambahkan masing-masing 30,5 µl air bides, 10 µl dapar 5X, 4 µl dNTP (2,5 mM), 1 µl Primer Forward (10 pm), 1 µl Primer Reverse (10 pm), 0,5 µl Taq DNA polimerase. Selanjutnya pada tabung Eppendrof 1 ditambahkan 1 µl plasmid pTRI (kontrol positif), tabung Eppendrof 2 ditambahkan 1 µl sampel genom DNA (transforman berumur 20 jam), PraPCR 98^0C selama 3 menit. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus (satu siklus terdiri dari: Denaturasi 98^0C selama 10 detik, Hibridisasi (Annealing) 58^0C selama 10 detik, dan pemanjangan (polimerasi) fragmen DNA 72^0C selama 1 menit) dan pascaPCR 72^0C selama 10 menit. Produk PCR Sebanyak 5 µl dicampur dengan 1 µl *Loading Buffer* dan dimasukkan dalam sumur pada 1% gel agarosa yang mengandung sybersafe . Dielektroforesis selama 20 menit pada 100 volt dan hasil elektroforesis dilihat dengan detektor UV.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil elektroforesis plasmid pTRLI menunjukkan bahwa plasmid pTRLI berhasil diisolasi dapat dilihat dari elektroforegram. Sebagai pembanding digunakan plasmid pTRI (tanpa sisipan) yang mempunyai ukuran lebih kecil (Gambar 1.). Hasil penentuan kemurnian plasmid pTRLI dengan menggunan nanodrop diperoleh perbandingan absorbansi antara 260 nm/280 nm adalah 1,88. Dari literatur disebutkan bahwa kemurnian DNA yang memenuhi persyaratan antara 1,8 sampai 2,0. Hal ini menunjukkan bahwa purifikasi DNA plasmid pTRLI memenuhi persyaratan. Sedangkan konsentrasi plasmid pTRLI 98,8 ng μl^{-1} (pada percobaan ini diisolasi sebanyak 200 ul plasmid pTRLI). Konsentrasi plasmid pTRLI ini mencukupi untuk transformasi protoplas *Aspergillus terreus* yang memerlukan 10 µg plasmid (Herzog dkk., 1996).

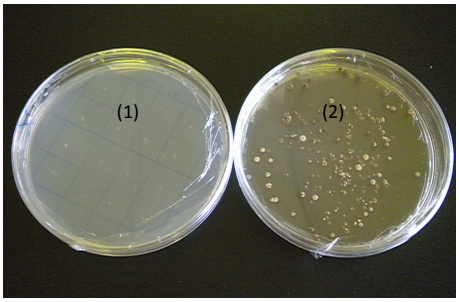


Diterima 3 Februari 2012; terima dalam revisi 12 Maret 2012; layak cetak 2 April 2012

Gambar 1. Elektroforegram hasil isolasi plasmid, sumuran 1 plasmid pTRI, sumuran 2 Ladder 1 kb, sumuran 3-6 plasmid pTRLI

Isolasi protoplas secara enzimatik dilakukan dengan menggunakan enzim yang dapat mendegradasi dinding sel *Aspergillus terreus* yang disusun dari selulosa dan kitin. Pada penelitian ini digunakan campuran kitinase, selulase, dan maserozim. Setelah diinkubasi selama 4 jam diperoleh protoplas sebanyak 1,6 X 10^7 protoplas ml^{-1} Isolasi protoplas, selain secara enzimatik dapat dilakukan juga secara mekanik. Cara mekanik ini tidak dilakukan karena protoplas yang dihasilkan sedikit (banyak protoplas yang pecah saat isolasi protoplas). Sebagai Penstabil osmatik pada protoplas digunakan KCl 0,6 M (Li, dkk.,2010). Pemilihan KCl 0,6 M ini berdasarkan penelitian Li dkk. (2010) pada tahun 2010 yang menyebutkan bahwa larutan KCl 0,6 M menghasilkan protoplas terbanyak yaitu 8,9 X 10^6 protoplas ml^{-1}, sedangkan manitol 0,6 M menghasilkan 7,8 X 10^6 protoplas ml^{-1}.

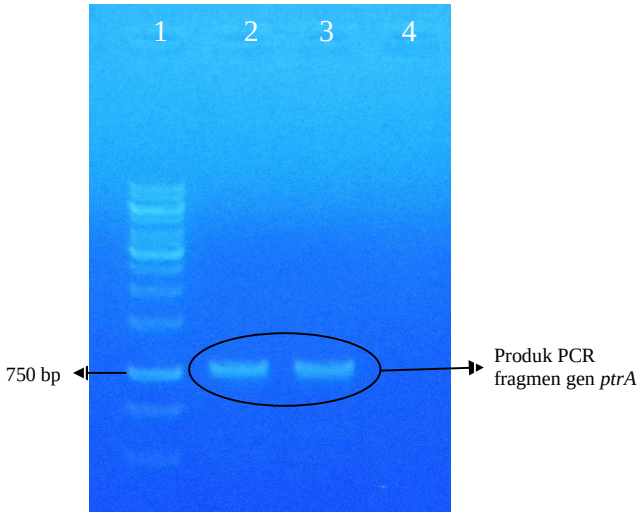
Hasil studi literatur diperoleh bahwa yang mempengaruhi jumlah tansforman pada transformasi dengan teknik elektroporasi adalah jumlah transforman, jumlah plasmid, dan arus listrik yang digunakan. Berikut ini adalah data beberapa penelitian: Kuo dkk. (2008) menggunakan 10^7 protoplas, 10 µg plasmid, 10 kV cm^{-1} , dan jumlah transforman yang dihasilkan 30 – 50 transforman; O'Neill dkk (1998). menggunakan 1,5 X 10^6 protoplas, 5 µg plasmid, 2,5 kV cm^{-1} dan transforman yang dihasilkan 180 transforman; Yunus dkk. (1998) menggunakan 1,8 X 10^7 protoplas, 5 µg plasmid, 2,0 kV cm^{-1} dan transforman yang dihasilkan 37 transforman. Dari 3 data studi literatur di atas ditetapkan untuk jumlah protoplas 1,6 X 10^7 protoplas, 10 µg plasmid, dan arus listrik 2,5 kV cm^{-1}. Hasil transformasi pada hari ke 5 diperoleh transforman sebanyak 187 koloni μg^{-1} DNA plasmid. Jumlah transforman yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan data literatur karena jumlah protoplas yang digunakan 1,6 X 10^7 protoplas dengan tegangan 2,5 kV cm^{-1}.



Gambar 2. *A. terreus* dalam medium seleksi Czapex-dox agar yang mengandung piritiamin, (1) *A. terreus* induk tidak dapat tumbuh dalam medium Czapex-dox agar yang mengandung piritiamin, (2) Transforman *A. terreus* dapat tumbuh dalam medium Czapex-dox agar yang mengandung piritiamin

Transforman diuji stabilitasnya dengan menumbuhkannya dalam medium CZapek-dox padat yang mengandung piritiamin 1 mg l^{-1} sampai generasi ke 5. Transforman generasi ke 1 sampai ke 5 dapat tumbuh pada medium CZapek-dox padat yang mengandung piritiamin 1 mg l^{-1}. Dari hasil pengamatan diperoleh bahwa bentuk, warna, dan diameter koloni antara 0,5 sampai 1,4 cm relatif sama (Woloshuk dkk., 1989),hal ini menunjukkan bahwa transforman bersifat stabil sampai generasi ke 5.

Untuk mendeteksi secara genetik dilakukan amplifikasi gen *ptrA* (gen risistensi terhadap piritiamin). Gen ini terdapat dalam plasmid pTRLI. Pada transforman *A. terreus* fragmen gen *ptrA* dapat teramplifikasi sedangkan kontrol digunakan *A. terreus* induk tidak mengandung gen *ptrA* sehingga gen ini tidak teramplifikasi. Hasil karakterisasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Elektroforegram produk ampifikasi gen *ptrA,* sumuran 1 Ladder 1kb, sumuran 2-3 fragmen gen *ptrA* dari transforman *A. terreus*, sumuran 4 tidak terbentuk pita fragmen gen *ptrA* dari *A. terreus* induk

Diterima 3 Februari 2012; terima dalam revisi 12 Maret 2012; layak cetak 2 April 2012

4. KESIMPULAN

Jumlah transforman yang dihasilkan dengan teknik elektroporasi sebanyak 187 koloni μg^{-1} plasmid. Transforman *Aspergillus terreus* dapat tumbuh stabil dalam media seleksi sampai generasi ke 5.

DAFTAR PUSTAKA

Balajee, M.S., 2009, *Aspergillus terreus* complex, Medical Mycology, 47: S42 – S46.

Chakraborty B.N. and M. Kapoor, 1990, Transformation of Filamentpus Fungi by Electroporation, Nucleic Acids Research, 18 (22): 6737.

Dombrowski, J. E., J.C. Baldwin, S.C. Alderman, and R.C. Martin, 2011, Transformation of *Epichloe typhina* by Electroporation of Conidia, BMC Research Notes, 4:46 1-7.

Fincham, J.R.S., 1989, Transformation fungi, Microbiol. Rev., 148 – 170.

Furuno, T., Kenta Shimada, Tsuyoshi Nakagawa, Hideyuki Matsuda, and Tohru Uehara, 1994, Preliminary Study on the Transfer of Plasmid DNA to Basidiomycetes and its Expression, Bull. Fac. Agr. Shimane Univ., 28: 83 – 92.

Gangavaram, L.P., N. Mchunu, P. Ramakrishnan, S. Singh, and K. Permaul, 2009, Improved Electroporation-Mediated Non-Integrative Transformation of *Thermomyces lanuginosus*, J. Microbiol. Methods, 77: 159-164.

Gillian B.T., Bradford Condon, Jinyuan Liu, and Ning Zhang, 2010, Protoplast Transformation of Filamentous Fungi. In:Amir Sharon, editors. Molecular and Cell Biology Method for Fungi. London: Humana Press, 3-19.

Herzog R.W, Daniell, H., Sigh, N.K., dan P.A. Lemke, 1996, A Comparative Study on the Transformation of *Aspergillus nidulans* by Microprojectile Bombardment of Conidia and a More Conventional Procedur Using Protoplast Treated with Polyethylenglycol, Appl. Microbiol. Biotechnol., 45: 333 – 337.

Jing Z., nie Si-Wei, Shan Long, and RU Bing-Gen, 2002, Transformaqtion of Metallothionein Gene into Mushroom Protoplasts by Application of Electroporation, Acta Biotanica Sinica, 44 (12): 1445 – 1449.

Kubodera, T., Nobuo Yamashita, Akira Nishimura, 2002, Transformation of *Aspergillus sp.* and *Trichoderma reeesei* using the pyrithiamine resistence gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 66 (2) 404 – 406.

Kuo C., Ching-Tsan Huang, 2008, A reliable Transformation Method and Heterologous Expression of β-glucuronidase in *Lentinula edodes*, J. Microbiol. Methods, 72: 111 – 115.

Lai, L.T., Chih-Sheng Hung, and Chi-Chu Lo., 2007, Effect of Lactose and Glucose on Production of Itaconic Acid and Lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542, *J Biosience and Bioengineering*, 104 (1): 9 -13.

Li L., Qingyu Yin, Xiaohong Liu, and Hong Yang, 2010, An Efficient Protoplast Isolation and Regeneration System in Coprinus Comatus, Afr. J. Microbiol. Res., 4(6) 459-465.

O'Neill N.R., Nancy B., John L., dan James A.S., 1998, Transformation of *Colletrichum trifolii* Protoplast by Electroporation and PEG Mediated DNA Uptake, Pecent Res. Devel. In Plant Pathology, 2: 1-16.

Quecini, V.M., C.A. de Oliveira, A.C. Alves, and M.L.C. Vieira, 2002, Factor Influencing Electroporation-mediated Gene Transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts, Genetics and Molecular Biology. 25 (1): 73 – 80.

Sun L., Huaquing Cai, Weihong Xu, Yuan lei Hu, Yin Gao, and Zhongping Lin, 2001, Efficient Transformatio of the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*, Plant Molecular Biology Reporter, 19: 383a - 383j.

Yunus A., Yuki Ichinose, Tomori Shiraishi, and Tetsuji Yamada, 1998, Transformation of Mutualistic Fungal Acrominium Endophyte, Scientific Reports of the Faculty of Agricuture Okayama Univ., 87 : 99 – 107.

Woloshuk, C.P., Seip, E.R., Payne, G.A. and Adkins, C.R., 1989, Genetic Transformation System for the Alflatoxin-Producing Fungus *Aspergillus flavus*. Applied and Enviromental Microbiology, 55: 86 – 90.

Diterima 3 Februari 2012; terima dalam revisi 12 Maret 2012; layak cetak 2 April 2012