

ANALISIS VARIASI GENETIK *Saccharomyces cerevisiae* DI TAHAN ETANOL DENGAN RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)*

[Genetic Variation Analysis of Ethanol Tolerance Yeast,
Saccharomyces cerevisiae DI by Using RAPD]

Heddy Julistiono, Titin Yulineri dan Sukamto Hanjono

Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI, Bogor

ABSTRACT

Genetic variations among 3 cultures, which were treated with or without Mn of *Saccharomyces cerevisiae* D1, were analyzed using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique. The Mn-treatment of three cultures were as follows: the culture KMn was D1 strain, the culture Mn+ was D1 strain colony survived in ethanol 20%, which was previously treated with 0,5 mM MnSO₄ and the culture Mn- was a D1 colony survived in ethanol 20% without MnSO₄ treatment. Polymorphism of total DNA of the three cultures may indicate that mutation may occur in cells which were tolerant to ethanol. The locus or base change was not identified. However, since the oxygen uptake rate of the three cultures at catabolite derepression state were identical, the results suggest that the locus may not be in mitochondrial DNA encoding respiratory chain proteins. The relation between DNA polymorphic and ethanol tolerant cell is still to be clarified.

Kata kunci/keywords: khamir/yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, RAPD, variasi genetik/genetic variation, set tahan ethanol/ethanol tolerance cell.

PENDAHULUAN

Pada penelitian sebelumnya, Julistiono dan Triana (1998) menunjukkan bahwa keberadaan 0,5 mM MnSO₄ dalam media pertumbuhan, dapat menaikkan jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* D2 yang tetap hidup dalam etanol 20% selama satu jam. Naiknya jumlah sel yang selamat ini diduga berkaitan dengan induksi enzim Mn-Superoksid Dismutase (Mn-SOD). Enzim superoksid dismutase (SOD) diyakini berperan dalam proses pertahanan diri sel akibat bahaya molekul oksigen reaktif (O₂[•]) (McCord, *et al.*, 1971; Gregory *et al.*, 1973). Etanol diduga dapat menimbulkan adanya reduksi molekul oksigen dalam sel hati tikus sehingga terbentuk molekul yang reaktif (Valenzuela *et al.*, 1979). Dalam proses fermentasi etanol, khamir mengalami stres oleh etanol yang serupa, terutama pada fase "post-diauxic" (Costa *et al.*, 1993). Etanol yang terbentuk sebagai hasil fermentasi dapat mengakibatkan efek toksik tersebut terhadap sel khamir. Selanjutnya, penelitian Costa *et al.* (1997) menunjukkan adanya

indikasi kuat bahwa molekul oksigen reaktif lebih efektif terbentuk dalam mitokondria yang rantai respirasinya lengkap daripada yang tidak lengkap. Dari dua macam SOD khamir *S. cerevisiae*, yakni SOD 1 (CuZn-SOD) dan SOD 2 (Mn-SOD), SOD 2 lebih berperan sebagai faktor ketahanan sel terhadap etanol. Dengan adanya SOD 2, O₂ akan dikonversi menjadi H₂O₂. Kemudian katalase akan merubahnya menjadi H₂O dan O₂ sehingga kerusakan molekul-molekul penyusun sel akibat radikal bebas dapat dihindari (Chance *et al.*, 1979).

Adanya sel yang masih tahan hidup walau tanpa perlakuan MnSO₄ sebelumnya, menimbulkan pertanyaan tentang kemungkinan adanya variasi genetik pada sel anakan yang tahan etanol, khususnya yang berasal dari DNA mitokondria. Untuk mempelajari hal ini, dianalisis polimorfisme DNA total 3 biak khamir, yakni KMn, Mn+, dan Mn-. Biak KMn adalah *S. cerevisiae* D1. Biak Mn+ adalah biak yang berasal dari koloni yang sebelumnya tumbuh pada media mengandung 0,5 mM MnSO₄ dan masih selamat dalam etanol 20%

* Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Penelitian, Litbang & Peidayagunaan Biota Darat, Tolok Ukur Karakterisasi Enzim Jasad renik.

selama 1 jam. Biak Mn- adalah biak yang berasal dari koloni yang bisa selamat dari etanol 20% selama 1 jam, tanpa perlakuan dengan MnSO₄ sebelumnya.

Pendekatan biologi molekular untuk identifikasi khamir dapat lebih singkat dan akurat daripada metoda lain (Messner *et al.*, 1994). Salah satu metoda untuk analisis genetika di tingkat molekular adalah RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). William *et al.* (1990) membuktikan bahwa RAPD merupakan metoda penanda genetik yang baik untuk pemetaan genetik; sidik-jari DNA, terutama untuk kajian genetika populasi. Keuntungan dari metoda RAPD antara lain: tidak diperlukannya penelitian awal seperti isolasi DNA probing hasil kloning, penyiapan filter untuk hibridisasi, serta pekerjaannya cukup sederhana. Identifikasi galur atau analisis variasi genetik intraspesifik khamir *Candida zeylanoides* dan *Debaromyces hansenii* dengan RAPD telah ditunjukkan oleh Romano *et al.* (1996). Karena teknik ini mencerminkan polimorfisme DNA total, sedang DNA mitokondria mudah mengalami mutasi, maka biak yang masih selamat dalam etanol 20% dianalisis kemampuan respirasinya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Khamir

Khamir yang diuji adalah biak KMn, Mn+, dan Mn- berasal dari *S. cerevisiae* D1 (biak industri pemberian Pabrik Etanol Madukismo, Yogyakarta). Biak KMn *S. cerevisiae* D1. Biak Mn+ berasal dari biak *S. cerevisiae* D1 yang sebelumnya tumbuh pada media mengandung MnSO₄ 0,5 mM dan tetap hidup setelah diinkubasi pada etanol 20 % selama 1 jam. Sedang biak Mn- berasal dari biak *S. cerevisiae* D1 yang sebelumnya tumbuh pada media tanpa penambah Mn dan tetap hidup setelah diinkubasi pada etanol 20% selama 1 jam.

Pertumbuhan khamir

Khamir ditumbuhkan pada media yang mengandung 15% sukrosa, 0,04% "yeast extract", 0,04% bacto pepton, 9,5 mM KH₂PO₄, 8,3 mM (NH₄)₂SO₄, dan 0,6 mM MgSO₄. Untuk isolasi koloni tahan etanol, biak ditumbuhkan pada medium "Yeast Malt Agar" yang mengandung 3g yeast extract, 3g malt extract, 5g bacto peptone, 10g glukosa, 20g agar dan 1 liter dHbO.

Pengukuran laju konsumsi oksigen

Biak berumur 2 hari disentrifus pada 3000 g selama 5 menit. Setelah pencucian dengan akuades, pelet dibuat suspensi dalam air mengandung 2% etanol. Laju konsumsi oksigen dari suspensi tersebut diukur dengan DO-meter Horriba.

Ekstraksi DNA

Prosedur analisis DNA mengacu pada teknik Fukatsu dan Ishikawa (1996) yang dimodifikasi. Sebanyak 2 ml suspensi biak dimasukkan dalam tabung eppendorf 1,5 ml, kemudian disentrifus dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Pelet dicuci dengan lml Te buffer dan disentrifus selama 1 menit, dengan kecepatan 15.000 rpm. Pelet diberi "Lysis buffer" (0,5% SDS dan 50 mM EDTA, pH 8) dan proteinase K, lalu ditambahkan glass beads dan dikocok selama 2 jam dengan "micro tube mixer" (Tomy MT-360). Setelah itu suspensi dipindahkan ke eppendorf yang baru dan ditambahkan 500 ul fenol dan dikocok perlahan selama 10 menit dengan menggunakan "Labo shaker" (BC-730), lalu disentrifus selama 5 menit, 15.000 rpm. Lapisan atas diambil dan dimasukkan ke eppendorf lalu ditambahkan dengan 500 ul chloroform, dikocok perlahan selama 10 menit dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke eppendorf baru dan ditambah dengan isopropanol 600 ul sehingga terjadi presipitasi DNA. Pencucian DNA dilakukan

dengan penambahan alkohol 80% (dingin) dan disentrifuse dengan kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit. Pelet (DNA) yang diperoleh kemudian dikeringkan. Setelah kering, pelet ditambahkan 20 μ l "Te buffer" (10 mM Tris HCl pH 8.0 dan 1 mM EDTA).

Pengukuran konsentrasi DNA

Untuk mengukur konsentrasi DNA sebelum dilakukan amplikasi DNA "PCR", DNA hasil ekstraksi diencerkan sedemikian rupa sehingga mencapai konsentrasi sekitar 20 μ g/ml dengan TE buffer. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer Beckman DU 7400, dengan panjang gelombang 260 nm.

Amplifikasi segmen-segmen DNA dengan "PCR"

PCR dilakukan dalam tabung eppendorf 0.5 ml, dengan "Program Temp Control System" (Quick Thermo Personal) QTP-1. Masing masing eppendorf berisi 4 μ l campuran reaksi yang terdiri dari "LA buffer (Mg⁺⁺ free)" 10x, 25 mM MgCl₂, dNTP 1 mM tiap basa, primer 10 pmol/ml, dH₂O, tag polymerase dan 1 μ l sampel DNA lalu ditambahkan 1 tetes mineral oil. Kondisi PCR diawali dengan tahap denaturasi dengan suhu 94°C selama 2 menit, diikuti dengan 40 siklus terdiri atas 94°C selama 1 menit, 40°C 1 menit, 60°C 3 menit, dan tahap akhir yakni 60° 3 menit.

Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis 2% gel agorose (MUPID, 100 volt), dengan "TAE buffer". Pita-pita DNA ditampakan dengan pengecatan ethidium bromide dan difoto dengan 'transmitted u.v. light and Polaroid film'. Polimorfisme DNA dianalisis dengan analisis "cluster" menggunakan program phylip 3.572 Power Mac Exe.

Primer yang digunakan adalah:

- 5'-AGCAGCGCCTCA-3' (A05),
- 5'-TGC CTC GCA CCA - 3' (A07),
- 5' -GCC CCG TTA GCA - 3' (A08),
- 5'-CCGCAGTTAGAT-3' (A09),

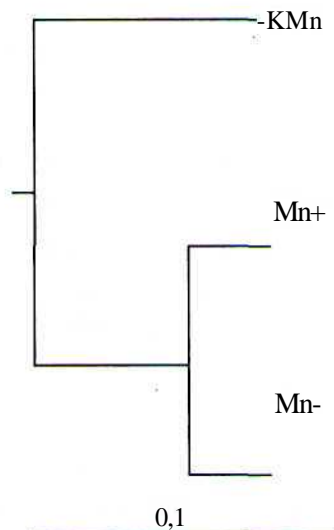
- 5' -GAT GGA TTT GGG-3' (A11),
- 5' -TTC GGA CGA ATA-3' (A12).

HASIL

Tabel 2. Laju konsumsi O₂ pada kondisi derepresi katabolit *)

Biak	Laju konsumsi O ₂ (10 ⁵ mg/menit/10 ⁶ sel)
KMn	9,4
Mn+	7,95
Mn-	8,8

*) Keterangan: media respirasi adalah etanol 2%



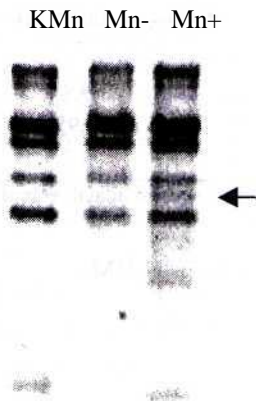
Gambar 2. Dendogram karakter DNA total berdasarkan PCR dari *S.cerevisiae* DI induk (KMn), isolat turunan yang tahan etanol dengan penambahan Mn (Mn+), dan isolat turunan tahan etanol tanpa penambahan Mn (Mn-).

Contoh dari polimorfisme disajikan dalam Gambar 1. Ketidaksamaan pola DNA atau adanya polimorfisme DNA ini ditunjukkan oleh adanya "Alel spesifik" (ditunjukkan oleh simbol panah), yaitu pita yang terdapat pada satu strain tapi tidak pada strain yang lain. Matriks keberadaan alel spesifik pada masing-masing biak tersaji pada Tabel 1.

Dari dendogram yang tersaji pada Gambar 2 terlihat bahwa isolat-isolat turunan yang tahan

terhadap etanol (Mn⁺ dan Mn⁻) mempunyai sifat genetik yang berbeda dengan induknya (KMn). Kedua isolat yang tahan terhadap etanol terletak dalam satu "clade".

Laju konsumsi O₂ oleh biak KMn, Mn⁺, atau Mn⁻ disajikan pada Tabel 2.



Gambar 1. Polimorfisme DNA total biak induk (KMn), biak asal koloni tahan etanol setelah penambahan Mn (Mn⁺), dan biak asal koloni tahan etanol tanpa penambahan Mn (Mn⁻). Tanda panah menunjukkan alel spesifik.

PEMBAHASAN

Alel spesifik timbul akibat adanya mutasi pada suatu urutan yang tidak diketahui sehingga proses "annealing" dari primer tidak terjadi pada segmen DNA dari strain yang tidak memiliki alel spesifik. Atau mungkin juga sebaliknya, yakni mutasi terjadi pada strain yang memiliki alel spesifik sehingga proses "annealing" justru dapat terjadi. Meskipun posisi serta jenis basa yang bermutasi tidak diketahui, adanya alel spesifik ini dapat menunjukkan adanya polimorfisme DNA dari masing-masing strain. Sumber lain penyebab polimorfisme ini antara lain adalah delesi dan insersi basa pada segmen tersebut (Williams *et al.*, 1990). Polimorfisme DNA diragukan jika hasil amplifikasi tidak jelas.

Analisis genetik dengan RAPD ini tidak dapat menunjukkan hubungan filogenetik dari biak-biak tersebut, tetapi dari dendrogram ini terlihat

bahwa biak-biak yang bisa selamat dari stres etanol, memiliki karakter genetik yang mirip. Kemungkinan adanya variasi genetik yang terjadi ketika segregasi selama pembelahan sel dapat berhubungan dengan adanya galur-galur tersebut. Fungsi Mn terhadap munculnya sel yang dapat selamat dalam etanol 20% mungkin berhubungan dengan karakter fisiologi, terutama pada induksi aktivitas Mn-SOD seperti yang diduga pada sel *S. cerevisiae* D2 dan khamir TKHM1E3 (Julistiono dan Triana, 1998).

Seperti disinggung di atas, bahwa salah satu penyebab kematian oleh etanol adalah akibat timbulnya oksigen radikal bebas yang sangat reaktif. Sel dengan rantai respirasi sempurna lebih rentan terhadap etanol daripada sel yang tidak dapat melakukan respirasi. Karena khamir mudah mengalami mutasi pada DNA mitokondrianya, maka ada kemungkinan bahwa Mn⁺ dan Mn⁻ adalah galur yang satu atau lebih gen mitokondrianya mengalami mutasi sehingga kehilangan kemampuan respirasinya. Untuk menganalisis fenomena ini, kemampuan respirasi dari masing-masing galur diharapkan dapat merefleksikan keutuhan rantai respirasi tersebut. Laju konsumsi O₂ oleh sel khamir yang diinkubasikan pada media mengandung etanol sebagai sumber karbon tunggal adalah kondisi "derepresi katabolit", yakni kondisi ketika enzim-enzim yang dibutuhkan untuk respirasi disintesis atau diinduksi aktivitasnya, sedang aktivitas atau sintesis kelompok enzim untuk fermentasi terhambat (de Winde *et al.*, 1977) sehingga laju konsumsi O₂ benar-benar mencerminkan aktivitas respirasi dari mitokondria. Dari Tabel 2, terlihat bahwa laju konsumsi O₂ ketiga biak tersebut adalah identik. Data ini menunjukkan bahwa kemampuan respirasi galur Mn⁺ dan Mn⁻ masih tinggi. Dengan demikian, mutasi pada DNA mitokondria (rantai respirasi) tidak bisa ditunjukkan. Namun demikian untuk memastikan hal ini, perlu dilakukan analisis DNA mitokondria.

KESIMPULAN

Dengan teknik RAPD ini, dapat ditunjukkan sel-sel yang secara genetik heterogen meski berasal dari satu biak. Data ini menunjukkan terjadinya mutasi pada koloni khamir jenis *S. cerevisiae* galur industri D1 yang sebelumnya ditumbuhkan pada media mengandung 0,5 mM MnSO₄ dan tahan dalam etanol 20% selama 1 jam (galur Mn⁺) dan yang tahan etanol tanpa perlakuan dengan MnSC₄ (galur Mn⁻). Walaupun demikian, lokus terjadinya mutasi serta perubahan basa DNA pada kedua galur tersebut tidak dapat ditunjukkan. Karena aktivitas enzim-enzim respirasi, yang ditunjukkan oleh laju konsumsi O₂ pada kondisi derepresi katabolit pada biak-biak yang tahan etanol serta biak induknya adalah identik, maka diduga bahwa mutasi mungkin tidak terjadi pada gen-gen pengkode protein rantai respirasi. Mengingat DNA mitokondria lebih mudah bermutasi daripada DNA khromosom, maka untuk mengetahui kemungkinan terjadinya mutasi pada DNA mitokondria, telaah lebih jauh dengan target DNA mitokondria masih diperlukan. Hubungan antara polimorfisme genetik dan ketahanan etanol juga masih perlu dipelajari. Kehadiran Mn yang dapat mengaktifkan kerja Mn-SOD dalam sistem perlindungan terhadap bahaya superoksid mungkin mempunyai efek sinergik terhadap sel yang secara genetik tahan terhadap etanol.

UCAPAN TERIMA KASIH

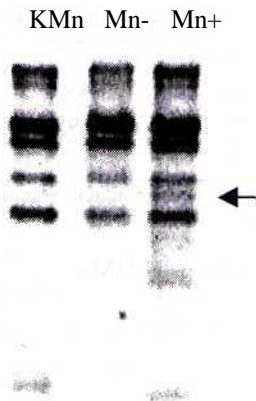
Tolok Ukur No 01.6316. Karakterisasi Enzim-Jasad Renik. Galur khamir diperoleh atas jasa baik rekan-rekan dari Pabrik Spiritus Madukismo, Yogyakarta. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Takema Fukatsu dari NIBH, Jepang atas bantuan teknik dalam analisis RAPD.

DAFTAR PUSTAKA

- Costa V, Reis E, Quintanilha A and Moradas-Ferreira P. 1993.** Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**, 608-614.
- Costa V, Amorim MA, Reis E, Quintanilha A and Moradas-Ferreira P. 1997.** Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143**, 1649-1656.
- Chance B, Sies H and Boveris A. 1979.** Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organ. *Physiological Review* **59**, 527-605.
- De Winde JH, Thevelein JM, and Winderick J. 1997.** From Feast to Famine: Adaptation to Nutrient Depletion in Yeast. In S. Hofmann and W.H. Mager : *Yeast Stress Respons.* Landes Bioscience USA, 7-52p.
- Fukatsu T and Ishikawa H. 1996.** Phylogenetic Position of Yeast-like Symbiont of *Hemiteles styaci* (Homoptera, Aphididae) Based on 18S rDNA Sequence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 383-388
- Gregory EM, Yost Jr FJ and Fridovich I. 1973.** Superoxide Dismutase of *Escherichia coli*: Intracellular Localization and Functions. *Journal of Bacteriology* **115**, 987-991.
- Julistiono H dan Triana E. 1998.** Peran Mn dalam proses fermentasi etanol pada khamir *Saccharomyces cerevisiae* D2 dan isolat indigenus T.K.H.M1.E3. *Prosiding Seminar Nasional VI Persada Cabang Bogor*, 15 Desember (in press).
- McCord JM, Keele Jr BB and Fridovich I. 1971.** An enzyme based theory of obligate anaerobiosis; the physiological role of superoxide dismutase. *Proceeding of*

terhadap etanol (Mn⁺ dan Mn⁻) mempunyai sifat genetik yang berbeda dengan induknya (KMn). Kedua isolat yang tahan terhadap etanol terletak dalam satu "clade".

Laju konsumsi O₂ oleh biak KMn, Mn⁺, atau Mn⁻ disajikan pada Tabel 2.



Gambar 1. Polimorfisme DNA total biak induk (KMn), biak asal koloni tahan etanol setelah penambahan Mn (Mn⁺), dan biak asal koloni tahan etanol tanpa penambahan Mn (Mn⁻). Tanda panah menunjukkan alel spesifik.

PEMBAHASAN

Alel spesifik timbul akibat adanya mutasi pada suatu urutan yang tidak diketahui sehingga proses "annealing" dari primer tidak terjadi pada segmen DNA dari strain yang tidak memiliki alel spesifik. Atau mungkin juga sebaliknya, yakni mutasi terjadi pada strain yang memiliki alel spesifik sehingga proses "annealing" justru dapat terjadi. Meskipun posisi serta jenis basa yang bermutasi tidak diketahui, adanya alel spesifik ini dapat menunjukkan adanya polimorfisme DNA dari masing-masing strain. Sumber lain penyebab polimorfisme ini antara lain adalah delesi dan insersi basa pada segmen tersebut (Williams *et al.*, 1990). Polimorfisme DNA diragukan jika hasil amplifikasi tidak jelas.

Analisis genetik dengan RAPD ini tidak dapat menunjukkan hubungan filogenetik dari biak-biak tersebut, tetapi dari dendrogram ini terlihat

bahwa biak-biak yang bisa selamat dari stres etanol, memiliki karakter genetik yang mirip. Kemungkinan adanya variasi genetik yang terjadi ketika segregasi selama pembelahan sel dapat berhubungan dengan adanya galur-galur tersebut. Fungsi Mn terhadap munculnya sel yang dapat selamat dalam etanol 20% mungkin berhubungan dengan karakter fisiologi, terutama pada induksi aktivitas Mn-SOD seperti yang diduga pada sel *S. cerevisiae* D2 dan khamir TKHM1E3 (Julistiono dan Triana, 1998).

Seperti disinggung di atas, bahwa salah satu penyebab kematian oleh etanol adalah akibat timbulnya oksigen radikal bebas yang sangat reaktif. Sel dengan rantai respirasi sempurna lebih rentan terhadap etanol daripada sel yang tidak dapat melakukan respirasi. Karena khamir mudah mengalami mutasi pada DNA mitokondrianya, maka ada kemungkinan bahwa Mn⁺ dan Mn⁻ adalah galur yang satu atau lebih gen mitokondrianya mengalami mutasi sehingga kehilangan kemampuan respirasinya. Untuk menganalisis fenomena ini, kemampuan respirasi dari masing-masing galur diharapkan dapat merefleksikan keutuhan rantai respirasi tersebut. Laju konsumsi O₂ oleh sel khamir yang diinkubasikan pada media mengandung etanol sebagai sumber karbon tunggal adalah kondisi "derepresi katabolit", yakni kondisi ketika enzim-enzim yang dibutuhkan untuk respirasi disintesis atau diinduksi aktivitasnya, sedang aktivitas atau sintesis kelompok enzim untuk fermentasi terhambat (de Winde *et al.*, 1977) sehingga laju konsumsi O₂ benar-benar mencerminkan aktivitas respirasi dari mitokondria. Dari Tabel 2, terlihat bahwa laju konsumsi O₂ ketiga biak tersebut adalah identik. Data ini menunjukkan bahwa kemampuan respirasi galur Mn⁺ dan Mn⁻ masih tinggi. Dengan demikian, mutasi pada DNA mitokondria (rantai respirasi) tidak bisa ditunjukkan. Namun demikian untuk memastikan hal ini, perlu dilakukan analisis DNA mitokondria.