

Penentuan Tipe *Mating* Ragi *Saccharomyces Cerevisiae*

HERMANSYAH

Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

INTISARI: Dalam penelitian genom ragi *S. cerevisiae*, penentuan tipe *mating* berguna terutama dalam konstruksi mutan-mutan melalui metode persilangan. Kami menentukan tipe *mating* sel-sel *strain* hasil persilangan *strain* A dan *strain* B menggunakan *strain tester* SH682 yang memiliki tipe *mating MATa* dan *strain tester* SH683 yang memiliki tipe *mating MAT α* . Hasil menunjukkan dari 11 aski dengan 4 spora menghasilkan 2 spora *MATa* dan 2 spora *MAT α* untuk setiap aski nya. Hal ini mengindikasikan bahwa penentuan tipe *mating* merupakan salah satu fenotip yang penting dalam teknik tetrad analisis sebagai metode konvensional dalam penelitian molekular ragi.

KATA KUNCI: ragi *s. cerevisiae*, tipe *mating*, aski, spora

ABSTRACT: In research of yeast *S. cerevisiae* genome, determination of mating type is useful especially to construct mutants by crossing method. We determined a mating type of strain cells generated from strain A and strain B crossing by using tester strain SH682 which has *MATa* and tester strain SH683 which has *MAT α* . Result showed that each of 11 asci with 4 spores exhibit 2 spores *MATa* and 2 spores *MAT α* . This indicated that determination of mating type is one of essential phenotype in tetrad analysis as a conventional method in molecular work of yeast.

KEYWORDS: yeast *s. cerevisiae*, mating type, asci, spore

Januari 2010

1 PENDAHULUAN

Genom ragi *S. cerevisiae* sebagai model penelitian menjadi pilihan banyak peneliti untuk melakukan penelitian genetik molekular dari sistem eukariot. Sebagai model penelitian, kemudahan dalam manipulasi genom ragi *S. cerevisiae* merupakan hal yang menguntungkan bagi peneliti. Beberapa kelebihan ragi diantaranya pertumbuhannya cepat, pola pertumbuhan 'budding' sel yang tersebar, mudah untuk dilakukan replika *plating*, dan sistem genetik ragi telah diketahui dengan baik. Sebanyak 16 kromosom ragi *S. cerevisiae* yang telah terkarakterisasi, DNA kromosom ini memiliki ukuran total 12.052 kb, sedangkan masing-masing kromosom memiliki ukuran 200 kb hingga 2.200 kb. *S. cerevisiae* memiliki 6.183 *open reading frame*(ORF) dan hanya 5.773 gen mengkode protein, gen-gen ini rata-rata berukuran 1,45 kb atau 483 kodon^[1].

Ciri lain dari ragi *S. cerevisiae* adalah mempunyai sel-sel berbentuk haploid dan diploid yang stabil. Beberapa perbedaan antara sel-sel haploid dan diploid dari *S. cerevisiae* adalah volume sel haploid $70 \mu\text{m}^3$, sel diploid $120 \mu\text{m}^3$, sel haploid memiliki komposisi DNA $0,017 \times 10^{-12}\text{g}$, RNA $1,2 \times 10^{-12}\text{g}$ dan protein $6 \times 10^{-12}\text{g}$, sedangkan sel diploid memiliki komposisi DNA $0,034 \times 10^{-12}\text{g}$, RNA $1,9 \times 10^{-12}\text{g}$ dan protein $8 \times 10^{-12}\text{g}$. Sebenarnya ukuran sel haploid dan diploid bervariasi sesuai dengan *strain* dan fase pertumbuhannya. Sel haploid berbentuk sferoid dengan diameter

berukuran $4 \mu\text{m}$, sedangkan sel diploid berbentuk elips berukuran $5 \times 6 \mu\text{m}$. Selama fase eksponensial pertumbuhan, kultur sel haploid cenderung untuk memiliki jumlah sel yang lebih banyak per *cluster* nya dibandingkan dengan sel diploid. Sel haploid memiliki *budding* yang muncul berbatasan sel diploid sebelumnya, sedangkan sel diploid memiliki *budding* yang muncul pada kutub yang berlawanan^[1].

Perbanyakan atau regenerasi sel ragi *S. cerevisiae* dapat berlangsung melalui proses mitosis atau pembelahan sel dan meiosis melalui perkawinan antara sel-sel yang memiliki tipe *mating* yang berbeda. Pada ragi *S. cerevisiae*, dua tipe *mating* disimbolkan dengan *MATa* dan *MAT α* . Sel haploid memiliki salah satu tipe *mating* yaitu *MATa* atau *MAT α* . Sedangkan sel diploid memiliki kedua tipemating tersebut, yaitu *MATa/ α* . Dengan demikian, sel haploid dapat melakukan berkembang biakan dengan kedua proses mitosis dan meiosis. Sedangkan sel diploid hanya dapat melalui proses mitosis untuk perkembangbiakannya^[2]. Dengan meiosis, kita dapat menghasilkan transforman atau rekombinan pada ragi *S. cerevisiae* melalui proses persilangan antara *strain* yang memiliki jenis *mating* yang berbeda^[3].

Penelitian ini bertujuan menunjukkan tipe *mating* dari ragi dengan menggunakan *strain tester* SH682 dan SH683

2 METODE PENELITIAN

2.1 *Strain* dan kondisi kultur yang digunakan

FY833 = *ura3-52 his3-Δ200 Δlleu2 Δllys2 Δ202 trp1 Δ63* digunakan sebagai *wild type strain* dan *parental strain*. *Strain A*: *ura3-52 his3-Δ 200 leu2 Δ1 lys2 202 trp1 63 ptc1 ::CgHIS3*. *Strain B*: *ura3-52 his3- Δ200 leu2 Δ1lys2 Δ202 trp1 Δ63 ptc1 Δ ::CgHIS3 msg5Δ ::CgLEU2*^[4].

Media agar YPAD terdiri atas *yeast extract* 1%, bakto pepton 2%, dextrosa 2%, bakto agar 2%, adenin 0.4 mg/ml dan air suling (Sigma- Aldrich Co). Media minimum terdiri atas *yeast nitrogen base* tanpa asam amino 0,67%, glukosa 2% dan bakto agar 2%. Jika tidak dijelaskan lebih lanjut pertumbuhan sel di lakukan pada temperatur 30°C.

Media SPM (*sporulation medium*) merupakan media sporulasi terdiri atas kalium asetat 0,3%, rafinosa 0,02%, suplemen-suplemen adenin, arginin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenilalanin, treonin, triptopan, urasil dan valin masing-masing 10 μg/ml.

2.2 Pembentukan aski diploid ragi *S. cerevisiae* dengan penyilangan

Mating dilakukan antara *strain A* yang memiliki tipe *MAT α* disilangkan dengan *strain B* yang memiliki tipe *MATa*. Setelah inkubasi pada 30°C selama semalam, sel diploid di kumpulkan dan ditransfer pada media SPM sebagai media penginduksi sporulasi. Inkubasi selama 4 hari hingga 1 minggu sampai terbentuk jumlah aski yang memiliki 4 spora cukup banyak. Pisahkan spora aski dengan mikromanipulator menggunakan media YPDA. Inkubasi pada 30°C selama 2-3 hari. Kemudian koloni-koloni sel yang tumbuh dipindahkan ke media baru YPDA.

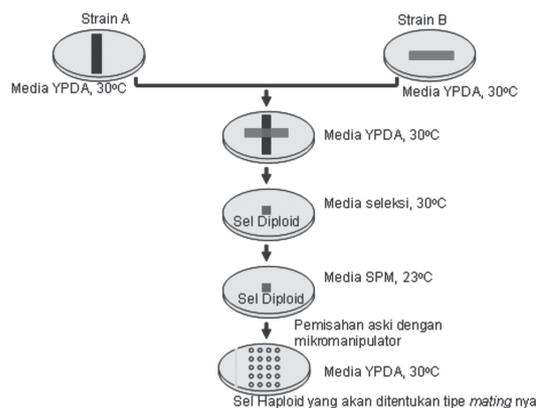
2.3 Pengujian tipe *mating* terhadap koloni-koloni *strain* yang tumbuh menggunakan *strain tester* SH682 dan SH683

Sel-sel yang akan diuji tipe *mating*-nya digoreskan pada media YPDA. Inkubasi semalam pada suhu 30°C. Masing-masing sel *strain tester* SH682 untuk penentuan *strain MAT α* dan SH683 untuk penentuan *strain MATa* diinokulasi dengan menggunakan 5 mL media YPDA broth yang diinkubasi pada suhu 30°C selama semalam. Sebarkan sel-sel tester tersebut ke dalam media agar YPDA dan inkubasi pada 30°C selama semalam. Dengan cara replika silangkan sel-sel *tester* dan sel-sel uji ini menggunakan media YPDA agar, inkubasi pada 30°C selama semalam. Replika *plating* dengan media YPDA baru kemudian inkubasi pada 30°C selama semalam. Replika dengan menggunakan media minimum dan inkubasi pada 30°C selama satu hari.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Strategi untuk menghasilkan koloni baru melalui persilangan

Pada studi ini, penentuan tipe *mating* sel haploid ragi *S. cerevisiae* diawali dengan pembentukan diploid melalui penyilangan antara *strain A* dengan *strain B* kemudian dipisahkan spora-spora dari aski nya untuk membentuk sel haploid hasil penyilangan *strain A* × *strain B* seperti yang terlihat pada Gambar 1.



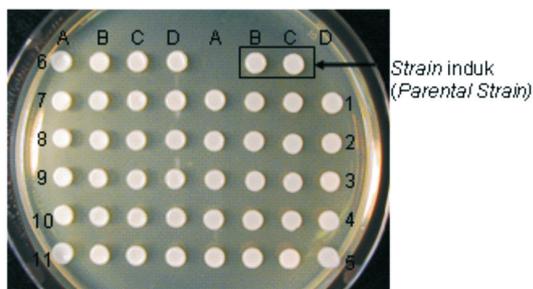
GAMBAR 1: Pembentukan diploid dengan penyilangan antara *strain A* × *strain B*, dan pembentukan sel haploid hasil penyilangan *strain A* × *strain B*

Diploid sel hasil penyilangan A×B dikumpulkan dan dipindahkan ke media SPM yang miskin nutrisi sehingga diharapkan sel akan berspora dengan baik^[5]. Dengan mikromanupulator, kita dapat melakukan pemisahan askospora, zigot dan sel vegetatif. Didalam media agar SPM, dapat kita temukan aski yang terdiri 4 spora, 3 spora, 2 spora, 1 spora dan juga sel vegetatif yang tidak berspora. Kami hanya mengambil sampel aski yang mengandung 4 spora dan dilakukan pemisahan spora-sporanya menggunakan media kaya YPDA. Aski yang memiliki 4 spora memiliki ciri berbentuk tetrahedral. Pemisahan spora dilakukan pada media YPDA sehingga memudahkan pertumbuhan sel. Untuk memudahkan pemisahan spora-spora ini, sebelumnya menggunakan mikromanipulator, dilakukan pengrusakan dinding spora dengan penambahan enzim lisozym dan inkubasi pada suhu 30°C selama 5 menit. Spora-spora yang sudah terpisah diinkubasi pada 30°C selama 2-3 hari. Apabila hasil pemisahan setiap aski menghasilkan 4 *independent* koloni sel mengindikasikan bahwa pekerjaan pemisahan spora-spora aski dilakukan dengan baik. Kemudian koloni-koloni sel yang telah tumbuh ini di *refresh* ke media YPDA baru.

3.2 Menentukan tipe *mating* ragi *S. cerevisiae*

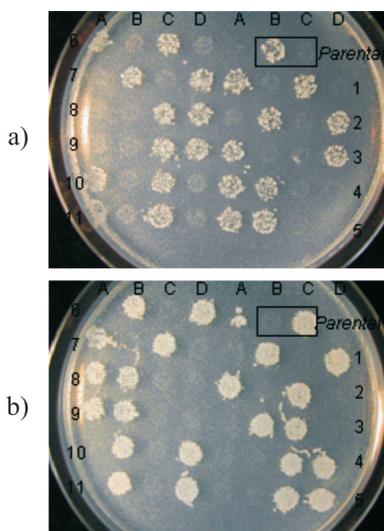
Strain tester yang digunakan untuk menentukan tipe *mating* ragi *S. cerevisiae* adalah SH682 yaitu *strain*

dengan tipe $MATa$ karena sel $MATa$ menghasilkan polipeptida feromon faktor a yang berinteraksi dengan reseptor yang ada pada permukaan sel α . Begitu juga sebaliknya SH683 merupakan strain dengan tipe $MAT\alpha$ karena sel $MAT\alpha$ menghasilkan polipeptida feromon faktor α yang berinteraksi dengan reseptor yang ada pada permukaan sel a .



GAMBAR 2: Koloni-koloni sel yang didapat dari persilangan $strain A \times strain B$. Nomor 1-11 adalah nomor sampel aski, sedangkan A, B, C dan D adalah sel haploid dari spora-spora yang dipisahkan dari aski

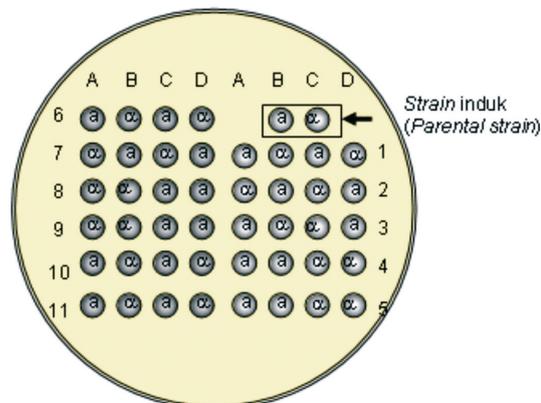
Hasil persilangan antara $strain A$ dan $strain B$ menghasilkan diploid banyak aski. Sebelas aski yang memiliki 4 spora kami pisahkan dan menghasilkan koloni-koloni sel seperti yang terlihat pada Gambar 2.



GAMBAR 3: Koloni diperiksa tipe $mating$ -nya dengan a) disilangkan dengan $strain tester SH683$; b) disilangkan dengan $strain tester SH682$

Selanjutnya koloni-koloni tersebut ditentukan tipe $mating$ -nya menggunakan $strain tester SH682$ dan $strain tester SH683$. Dengan ditumbuhkan pada media minimum dapat koloni-koloni sel tersebut dapat dibedakan seperti terlihat pada Gambar 3. Koloni yang bertipe $MATa$ dapat melakukan persilangan dengan $strain tester SH683$ dan dapat tumbuh dengan baik pada media minimum. Sedangkan koloni yang

bertipe $MAT\alpha$ dapat melakukan persilangan dengan $strain tester SH682$ sehingga dapat tumbuh dengan baik pada media minimum. Pada bagian kanan atas terlihat bahwa tipe $mating$ dari $parental strain$ yaitu $MATa$ dan $MAT\alpha$.



GAMBAR 4: Kesimpulan hasil tipe $mating$ koloni-koloni hasil persilangan $strain A \times strain B$. Simbol a artinya sel memiliki tipe $mating a (MATa)$ dan simbol α artinya sel memiliki tipe $mating \alpha (MAT\alpha)$

Hasil pengujian $mating$ tersebut dapat disimpulkan seperti pada Gambar 4.

Dari kesimpulan hasil terlihat bahwa setiap aski dengan 4 spora akan menghasilkan 2 spora bertipe $mating a$ dan 2 spora bertipe $mating \alpha$. Pengujian jenis $mating$ pada hasil persilangan juga akan membantu teknik $tetrad analysis$ yang merupakan teknik konvensional dalam genetika molekuler ragi. Dalam teknik $tetrad analysis$ kita bandingkan pola pertumbuhan koloni tersebut dengan uji fenotip lainnya, misalnya uji auksotrop terhadap media tanpa suplemen tertentu, media mengandung kation tertentu, atau media yang mengandung zat kimia (obat) tertentu^[6-8].

4 SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Penentuan tipe $mating$ ragi *S. cerevisiae* dapat dilakukan dengan $strain tester SH682$ yang memiliki $MATa$ dan $strain tester SH683$ yang memiliki $MAT\alpha$.
2. Setiap aski sel diploid hasil persilangan antara $strain A$ dan $strain B$ yang mengandung 4 spora, akan menghasilkan 2 sel haploid bertipe $mating a (MATa)$ dan 2 sel haploid bertipe $mating \alpha (MAT\alpha)$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih banyak kepada Prof. Satoshi Harashima di Osaka University yang memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini. Terima kasih juga kepada Dr. Yoshinobu Kaneko dan Dr. Minetaka Sugiyama atas diskusi dan masukan yang diberikan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sherman, F. (2002) Getting started with yeast, *Methods Enzymol*350:3-41
- [2] Lewin, B. (2004) Genes VIII, Pearson Prentice Hall, Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ, 421-422; 843-845
- [3] Hermansyah, M. Sugiyama, Y. Kaneko, S. Harashima (2009) Yeast protein phosphatase Ptp2p and Msg5p are involved in G1-S transition, *CLN2* transcription and vacuole morphogenesis. *Arch Microbiol* 191:721-733
- [4] Kitada, K., E. Yamaguchi, M. Arisawa (1995) *Cloning of the Candida glabrata TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. Gene* 165:203-206
- [5] Sherman, F. dan J. Hicks (1991) Micromanipulation and dissection of Asci. *Methods in Enzymology, Guide to yeast genetics and molecular biology.* 194:21-37
- [6] Hirasaki M., Y. Kaneko, S. Harashima (2008) Protein phosphatase Siw14 controls intracellular localization of Gln3 in cooperation with Npr1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 409:34-43
- [7] Sakumoto, N., Y. Mukai, K. Uchida, T. Kouchi, J. Kuwajima, Y. Nakagawa, S. Sugioka, E. Yamamoto, T. Furuyama, H. Mizubuchi, N. Ohsugi, T. Sakuno, K. Kikuchi, I. Matsuoka, N. Ogawa, Y. Kaneko, S. Harashima (1999) A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:1669-1679
- [8] Sakumoto, N., I. Matsuoka, Y. Mukai, N. Ogawa, Y. Kaneko, S. Harashima (2002) A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis. *Yeast* 19:587-599