Hayati, Juni 1995, hlm. 17-22
ISSN 0854-8587

Vol. 2, No. 1

Analisis DNA Kromosom *Saccharomyces cerevisiae* dan *Schizosaccharomyces pombe* untuk Standar Ukuran Molekul DNA Linear Berukuran Besar

(Analysis of Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe Molecular DNA as Candidate of Molecular Size Standard for Large Linear DNA)

MADE HESTI LESTARI TATA[+], MUHAMMAD JUSUF, ANTONIUS SUWANTO[*], DAN UTUT WIDYASTUTI

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor, 16144

Diterima 12 Desember 1994Disetujui 23 Mei 1995

***Saccharomyces cerevisiae* Hansen and *Schizosaccharomyces pombe* Lindner genome were isolated by the *in situ* lysist of the cells in an agarose gel. This approach will produce an intact DNA. Chromosome separation by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) was well separated. Based on electrophoregram, *S. cerevisiae* KA311A, KA311B, S and F strains were separated into 13,14,15 and 16 chromosomes, respectively. Total molecular weight chromosomes ranged from 10,649 to 13,185 kilo base pairs. Variation of total genome size and individually separated chromosomes indicated that *S. cerevisiae* had chromosome polymorphysm. This study demonstrasted that individual chromosome size measured without data transformation gave similar results to the electrophoregram in comparison with the data obtained through transformation into their $\log_{10}$values. *Schizosaccharomyces pombe* genome was able to be separated into three individual chromosomes that produced three distinct bands of DNA.**

PENDAHULUAN

Pada saat ini *Saccharomyces cerevisiae* Hansen dan *Schizosaccharomyces pombe* Lindner banyak dipelajari pada tingkat molekul, meskipun pada organisme prokariot, dalam hal ini *Escherichia coli*, studi biologi molekulernya telah sangat berkembang sejak 40 tahun yang lalu. Pengetahuan mengenai struktur organisasi genom *S. cerevisiae* dan *S. pombe* sangat diperlukan untuk dipakai sebagai landasan dalam upaya memahami struktur dan fungsi gen eukariot. Kedua khamir ini dapat ditangani relatif mudah seperti halnya penanganan terhadap bakteri. Hal ini disebabkan karena organisme ini bersifat uniseluler, total genomnya relatif kecil (3.5 sampai 4.0 kali ukuran genom *E. coli*) dan siklus hidupnya yang singkat.

Molekul DNA genom *S. cerevisiae* yang berukuran relatif kecil telah dapat diisolasi secara utuh dan masing-masing kromosomnya berhasil dipisahkan serta ditentukan berat molekulnya. Karakterisasi kariotipe DNA genom *S. cerevisiae* memungkinkannya untuk digunakan sebagai standar ukuran molekul (*marker*), penduga ukuran kromosom atau potongan DNA yang berukuran besar (Watson *et al.*, 1987; Mathew *et al.*, 1988a).

Pada pembuatan standar ukuran molekul berukuran mega (jutaan) pasangan basa diperlukan teknik elektroforesis gel yang dimodifikasi yang disebut *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) dan teknik isolasi DNA secara utuh (Smith dan Cantor, 1987; Sambrook *et al.*, 1989).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi secara utuh DNA *S. cerevisiae* dan *S. pombe*, kemudian memisahkan DNA setiap kromosomnya dengan PFGE, dan mengukur jumlah pasangan basa DNA setiap kromosomnya. Hasil penelitian ini akan digunakan sebagai standar ukuran molekul untuk DNA berukuran molekul besar.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Bahan utama yang digunakan yaitu biakan murni *S. cerevisiae* KA311A dan KA311B, biakan murni *S. pombe* JY240 dan JY274 yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Genetika Terapan PAU IPB, serta isolat ragi roti "Saf Instan" (galur S) dan "Fermipan" (galur F) yang diperoleh dari salah satu pasar swalayan di Bogor. Standar yang digunakan untuk menduga jumlah pasangan basa setiap kromosom *S. cerevisiae* ialah *S. cerevisiae* YNN295 (Bio-Rad Laboratories, USA).

Isolasi DNA Genom. Isolasi DNA genom khamir dilakukan berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989) yang dimodifikasi.

[+]Alamat kini: Balai Penelitian Kehutanan Samarinda, Jalan Pandan Wangi-Sempaja, Kotak Pos 1206, Samarinda 75124

[*]Penulis untuk korespondensi

Koloni tunggal khamir ditumbuhkan dalam 50 ml media YPD dengan pengocokan 250 rpm pada suhu 30°C, hingga jumlah sel mencapai 10^{10} sel/ml (kurang lebih 24 jam). Jumlah sel dihitung dengan hemasitometer. Sel khamir dipanen dengan sentrifugasi berkecepatan 3000 rpm selama lima menit pada suhu 4°C. Endapan dicuci dengan 50 ml larutan penyangga TE (0.05M Na_2EDTA pH 8.0, 0.01M tris HCl pH7.6) dan disentrifugasi kembali pada kondisi yang sama. Endapan sel kemudian disuspensikan dalam larutan 0.05M EDTA pH 8.0 (untuk setiap 10 ml kultur disuspensikan dalam 1.3 sampai 1.5 ml larutan EDTA).

Suspensi sel diinkubasikan pada suhu 37°C selama 5 sampai 10 menit. Untuk pembentukan sferoplas, satu mililiter suspensi ditambahi enzim litikase (2 mg/ml enzim litikase dalam 0.01M Na-fosfat pH 7.5 mengandung 50% gliserol) dengan konsentrasi akhir 0.3 mg/ml. Kemudian campuran suspensi ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 sampai 1.5 jam dengan penggoyangan lambat (50 rpm). Terbentuknya sferoplas diamati menggunakan mikroskop dan dibandingkan dengan sel tanpa penambahan enzim.

Penyiapan gel sisipan dilakukan dengan mencampurkan sferoplas khamir dengan satu persen agarosa bertitik leleh rendah dalam larutan penyangga L (0.1M Na_2EDTA pH 8.0, 0.01M tris HCl pH 7.6, 0.02M NaCl) sehingga konsentrasi akhirnya menjadi 0.7 persen pada suhu yang sama (37°C). Campuran ini dikocok hingga merata, kemudian dicetak dalam cetakan gel sisipan dan didinginkan dalam lemari pendingin selama sepuluh menit. Setelah memadat, gel sisipan dimasukkan ke dalam larutan lisis TEM (0.01M tris HCl pH 7.6, 0.5M Na_2EDTA pH 8.0, 1% (v/v) ß-merkaptoetanol), sebanyak lima kali volume gel sisipan. Gel sisipan dalam larutan TEM diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan pengocokan 50 rpm.

Proses lisis kemudian dilanjutkan dalam larutan ESP (0.5M Na_2EDTA pH9.0, 1% (b/v) sodium lauril sarkosil, 0.2 mg/ml proteinase-K) dan diinkubasi pada suhu 50°C dengan pengocokan 50 rpm selama 48 jam. Volume ESP adalah tiga kali volume gel sisipan. Setelah proses lisis selesai, gel sisipan disimpan dalam larutan ES (larutan ESP tanpa proteinase-K) pada suhu 4°C sampai penggunaan selanjutnya.

Penyiapan Contoh pada Gel. Pemisahan DNA *S. cerevisiae* menggunakan dua konsentrasi gel agarosa. Pemisahan kromosom *S. cerevisiae* bersama-sama dengan standar YNN295, menggunakan gel agarosa berkonsentrasi 1% (b/v) dalam larutan penyangga TBE 0.5x (0.05 M asam borat, 0.05 M tris, 1 mM Na_2EDTA). Pemisahan kromosom *S. pombe* menggunakan gel agarosa berkonsentrasi 0.6% (b/v) dalam larutan penyangga TBE 0.5x.

Pemisahan DNA dengan PFGE. Kromosom *S. cerevisiae* dipisahkan dengan alat PFGE CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, USA). Larutan penyangga TBE 0.5x sebanyak 1.5 liter dituangkan ke dalam bak elektroforesis dan suhu pendingin diatur pada suhu 131°C. Selanjutnya gel agarosa, diletakkan di dalam bak elektroforesis.

Elektroforesis dilakukan pada dua kondisi waktu pulsa yang berbeda yaitu waktu pulsa bertahap dan tunggal. Kondisi pertama yaitu waktu pulsa (*pulse time*) 60 detik dengan waktu elektroforesis (*run time*) 16 jam kemudian waktu pulsa 100 detik selama 8 jam. Kondisi kedua yaitu waktu pulsa 100 detik dengan waktu elektroforesis 24 jam. Kedua kondisi ini dilakukan pada tegangan listrik 200 V.

Kromosom *S. pombe* dipisahkan dengan alat elektroforesis LKB Pulsaphor (Pharmacia KB Biotechnology). Tegangan listrik yang digunakan ialah 90 V. Kromosom *S. pombe* dipisahkan dengan elektroforesis pada kondisi waktu pulsa bertahap yaitu waktu pulsa I, 50 menit selama 72 jam; waktu pulsa II, 45 menit selama 12 jam; dan waktu pulsa III, 37 menit selama 72 jam. Larutan penyangga TBE 0.5x diganti setiap dua hari.

Setelah proses elektroforesis selesai, gel diwarnai dalam larutan etidium bromida berkonsentrasi 1 g/ml selama 5 sampai 10 menit dengan penggoyangan 50 rpm, kemudian dicuci dengan akuades selama minimum 20 menit. Visualisasi DNA diamati di atas transiluminator UV dan difoto dengan kamera polaroid.

Analisis Data. Berat molekul DNA kromosom ditetapkan dengan metode Sambrook *et al.* (1989), yaitu menggunakan data berat molekul standar yang ditransformasi ke nilai $\log_{10}$-nya (kode l), dan modifikasi metode Sambrook *et al.* (1989) yaitu tanpa transformasi data (kode k).

Pengukuran berat molekul dilakukan terhadap DNA kromosom dari galur KA311A, KA311B, S, F yang yang dipisahkan dengan elektroforesis bersama-sama dengan DNA standar dari galur YNN295. Elektroforesis pada kondisi pertama dilakukan untuk menentukan berat molekul DNA kromosom *S. cerevisiae* yang berukuran kurang dari 1600 kpb, dan kondisi kedua untuk menentukan berat molekul yang berukuran lebih dari 1600 kpb.

Berat molekul DNA contoh ditentukan dari dua persamaan linear, yang berasal dari data awal (tanpa transformasi data) dan data yang ditransformasi. Persamaan linear yang digunakan sebagai berikut: $Y = a + bM$. Peubah M adalah jarak migrasi kromosom (cm), dan nilai Y adalah berat molekul DNA contoh (untuk data awal) dan $\log_{10}$ berat molekul contoh (untuk data yang ditransformasi).

Jarak pita diukur dari batas bawah sumur sampai batas bawah pita. Nomor pita diurut dari jarak pita terjauh.

Perbedaan antar galur ditunjukkan oleh jumlah pita dan jarak migrasinya. Perbedaan tingkat migrasi diuji dengan membandingkan perbedaan rataan berat molekul DNA masing-masing kromosom yang saling berdekatan. Berat molekul DNA tersebut merupakan hasil perhitungan dari persamaan regresi tanpa transformasi data. Kriteria yang digunakan untuk uji tingkat migrasi ialah uji statistik t.

Rumus umum:

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{S_D\sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}},$$

x_1 dan x_2 adalah nilai rataan berat molekul yang dibandingkan, S_D adalah kesalahan baku rata-rata dari beda nilai rataan.

Kesalahan baku dihitung dengan rumus berikut:

$$S_{D2} = \frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2},$$

n_1 dan n_2 adalah banyaknya pengamatan untuk setiap contoh, S_1 dan S_2 adalah ragam percobaan untuk contoh 1 dan contoh 2 (diasumsikan bahwa $_1 = _2$, tetapi tidak diketahui).

Ragam dihitung dengan rumus:

$$S^2 = \frac{(x_i - x_1)^2}{n-1},$$

x_i adalah nilai setiap pengamatan untuk masing-masing contoh.

Untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar galur *S. cerevisiae* dibuat dendogram dari hasil analisis sidik gerombol dengan program komputer SPSS/PC (*Statistical Package for the Social Sciences/Personnal Computer*), SPSS Inc., Illinois USA.

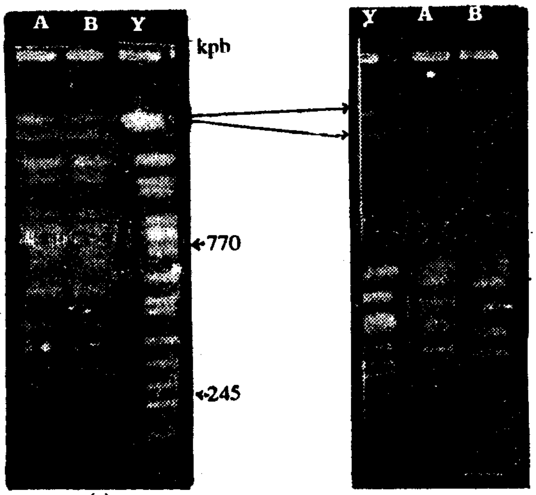
HASIL

Isolasi DNA Genom Secara Utuh. Pembentukan sferoplas yang dilakukan berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989) yang dimodifikasi menghasilkan persentase sferoplas yang berkisar antara 60.93 sampai 90.51 persen (Tabel 1). Rata-rata persentase *S. cerevisiae* diperoleh dari hasil tiga kali isolasi, sedangkan *S. pombe* berasal dari dua kali isolasi.

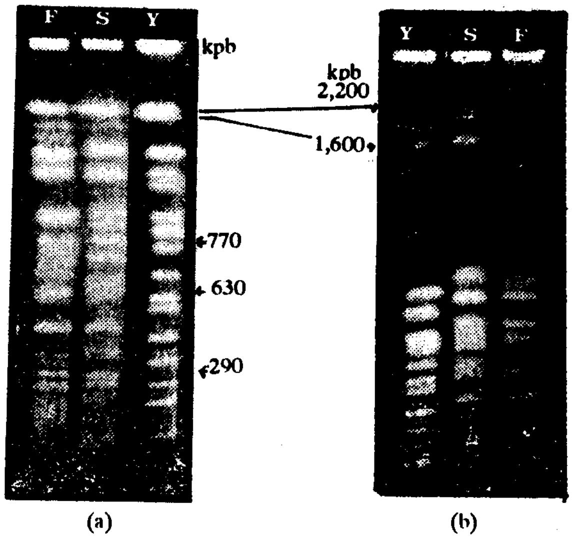
Tabel 1. **Rata-rata Persentase Sferoplas dari *S. cerevisiae* dan *S. pombe* dengan Lama Waktu Inkubasi 1.5 Jam**

Sumber	Galur	Sferoplas (%)
S. cerevisiae	KA311A	84.73
	KA311B	78.23
	S	61.16
	F	60.93
S. pombe	JY240	90.51
	JY274	86.35

Pemisahan DNA Genom *S. cerevisiae*. Asam deoksiribonukleat (DNA) genom *S. cerevisiae* YNN295 terpisah menjadi 14 kromosom pada kondisi elektroforesis waktu pulsa 60 detik selama 16 jam dan waktu pulsa 100 detik selama 8 jam (pertama). Terdapat dua kromosom yang berukuran besar (1,600 dan 2,200 kpb) tidak terpisah. Sehingga dilakukan pemisahan pada kondisi waktu pulsa 100 detik selama 24 jam (kedua) (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Hasil Pemisahan PFGE dari DNA Genom *S. cerevisiae* KA311A dan KA311B: (a) kondisi pertama, waktu pulsa 60 detik selama 16 jam dan 100 detik selama 8 jam, (b) kondisi kedua, waktu pulsa 100 detik selama 24 jam, dengan 1% gel agarosa pada tegangan 200 V. kolom A adalah KA311A, kolom B adalah KA311B, dan kolom Y adalah YNN295



Gambar 2. Hasil Pemisahan PFGE dari DNA Genom Galur S dan F: (a) kondisi pertama, waktu pulsa 60 detik selama 16 jam dan 100 detik selama 8 jam, (b) kondisi kedua, waktu pulsa 100 detik selama 24 jam, dengan 1% gel agarosa pada tegangan 200 V. kolom F adalah galur F, kolom S adalah galur S dan kolom Y adalah YNN295

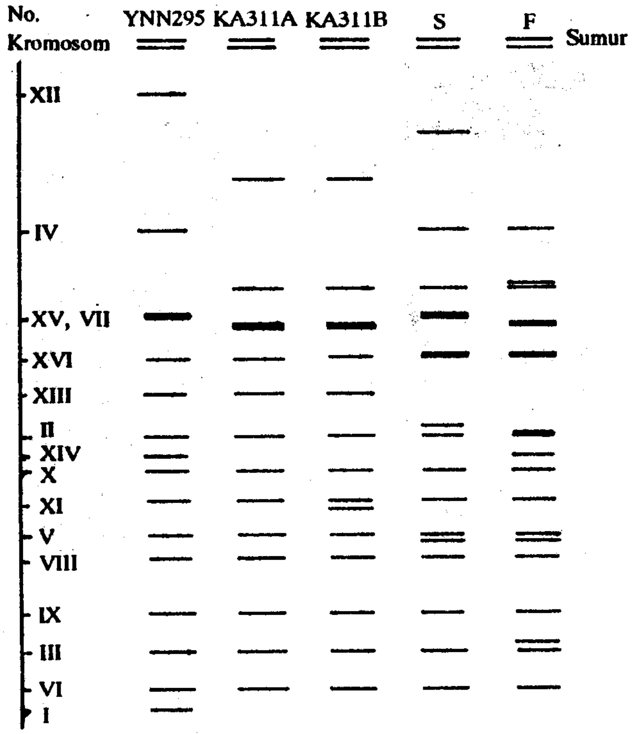
Pada kondisi elektroforesis pertama, genom KA311A terpisah menjadi 13 kromosom. Ada satu pita yang berintensitas tebal yaitu pada pita ke-11. Sedangkan genom KA311B terpisah menjadi 14 kromosom dengan satu pita yang berintensitas lebih tebal, yaitu pita ke-12. Hasil pemisahan kondisi kedua menunjukkan hanya ada satu kromosom yang berukuran sekitar 1600 sampai 2200 kpb (Gambar 2).

Dengan pemisahan kondisi pertama genom galur S terpisah menjadi 14 pita. Ada tiga pita yang berintensitas tebal, yaitu pita nomor 11, 12 dan 14. Ternyata pada kondisi kedua, pita nomor 14 tersebut terpisah menjadi dua kromosom sehingga galur S terpisah menjadi 15 kromosom. Sedangkan genom galur F terpisah menjadi 16 kromosom. Ada tiga pita yang berintensitas lebih tebal, yaitu pita nomor 11, 12 dan 13 (Gambar 2).

Genom KA311A, KA311B, S dan F memiliki pola pemisahan kromosom yang berbeda. Hasil elektroforegram (Gambar 3) menunjukkan pola pemisahan kromosom, terlihat galur KA311A relatif lebih mirip dengan KA311B. Sedangkan pola pemisahan kromosom galur S dan F berbeda dengan galur yang lain. Walaupun jumlah kromosom yang nampak pada KA311A dan KA311B lebih sedikit dibandingkan dengan YNN295, secara keseluruhan pola pemisahannya relatif mirip dengan YNN295.

Pola elektroforegram kromosom galur S dan galur YNN295 relatif mirip untuk pila nomor 1 sampai nomor 10, tetapi berbeda untuk pita nomor 11 sampai 15 (Gambar 3).

Secara keseluruhan, pola pemisahan kromosom galur F terlihat berbeda dengan YNN295, tetapi pada pita nomor 1 sampai nomor 10 galur F relatif mirip dengan pita nomor 2 sampai nomor 10 dari YNN295, walaupun dengan ukuran kromosom yang berbeda. Sedangkan pola pita nomor 11 sampai 16 dari galur F berbeda dengan pola YNN295.



Gambar 3. Elektroforegram Kromosom Lima Galur *S. cerevisiae*

Masing-masing kromosom contoh yang posisinya relatif sama dengan posisi kromosom standar memiliki ukuran kromosom yang berbeda (Tabel 2). Berdasarkan uji t, ukuran kromosom yang terletak pada wilayah yang sama, umumnya tidak berbeda nyata.

Hubungan kekerabatan antar galur dapat diketahui dari hasil dendogram (Gambar 4). Kekerabatan KA311A dengan KA311B berjarak 2.00. Sedangkan galur S dan F memiliki hubungan kekerabatan yang berjarak 10.00. Galur KA311A dan KA311B memiliki hubungan yang lebih dekat dengan YNN295 (14.00) dari pada dengan galur S dan F (20.00).

Pemisahan DNA Genom *S. pombe*. Pemisahan *S. pombe* dicoba dengan dua tegangan listrik yang berbeda, yaitu 45 V dan 90 V. Pada 45 V, DNA genom *S. pombe* belum terpisah dan kromosom terbesar KA311A masih berada di atas (dekat dengan sumur gel). Hal ini karena tegangan 45 V terlalu rendah sehingga molekul DNA tidak dapat bermigrasi dengan optimum. Sedangkan pada tegangan 90 V, genomnya terpisah menjadi tiga kromosom, dan kromosom terbesar KA311A terletak relatif lebih rendah daripada kromosom terkecil *S. pombe* (Gambar 5).

Ukuran Kromosom *S. cerevisiae*. Hasil perhitungan tanpa transformasi data diperoleh ukuran DNA genom KA311A ialah 10,649 kpb, dengan kisaran ukuran kromosom 289 sampai 1,832 kpb. Ukuran DNA genom KA311B ialah 11,271 kpb dengan kisaran ukuran kromosom 270 sampai 1,832 kpb. Ukuran DNA genom S ialah 13,185 kpb, dengan kisaran ukuran kromosom 313 sampai 2,056 kpb dan ukuran DNA genom F ialah 12,480 kpb dengan kisaran ukuran kromosom 305 sampai 1,646 kpb (Tabel 2).

Menurut hasil perhitungan dengan transformasi data diperoleh nilai yang berbeda dengan nilai tanpa transformasi data. Ukuran DNA genom KA311A ialah 10,909 kpb dengan kisaran ukuran kromosom 319 sampai 1,809 kpb. Ukuran DNA genom KA311B ialah 11,482 kpb dengan kisaran ukuran kromosom 309 sampai 1,809 kpb. Ukuran DNA genom S ialah 13,403 kpb dengan kisaran ukuran kromosom 332 sampai 2,038 kpb dan ukuran DNA genom F ialah 12,877 kpb dengan kisaran ukuran kromosom 328 sampai 1,641 kpb (Tabel 2).

Tabel 2. Ukuran Berat Molekul DNA Genom *S. cerevisiae* KA311A, KA311B, S dan F

No. Pita	YNN295 (kpb)	KA311A (kpb)	KA311B (kpb)	S (kpb)	F (kpb)
Tanpa Transformasi Data					
1	245				
2	290	289 ± 22.81	270 ± 31.53	313 ± 34.22	305 ± 45.63
3	370	356 ± 17.32	348 ± 25.22	343 ± 34.64	348 ± 51.40
					383 ± 45.95
4	460	431 ± 23.44	423 ± 31.36	421 ± 40.02	410 ± 40.73
5	580	509 ± 25.22	496 ± 21.76	504 ± 34.64	496 ± 45.95
				603 ± 29.64	606 ± 45.65
6	630	628 ± 18.92	622 ± 25.22	646 ± 28.64	681 ± 42.13
			711 ± 25.44		
7	700	741 ± 37.83	735 ± 34.17	738 ± 40.42	719 ± 46.88
8	770	781 ± 27.94	770 ± 24.35		765 ± 40.73
9	800			800 ± 46.88	802 ± 64.16
10	850	864 ± 25.22	851 ± 21.76	861 ± 40.73	875 ± 57.29[a]
				899 ± 28.64	
11	945	921 ± 34.17	913 ± 25.44		
12	1,020	1,039 ± 27.94	1,036 ± 21.76	1,023 ± 29.64[a]	1,020 ± 34.64[a]
		1,082 ± 15.68[a]	1,085 ± 12.61[a]		1,082 ± 28.64[a]
13	1,125[a]			1,101 ± 21.76[a]	
					1,152 ± 18.92
		1,176 ± 1,1.41	1,179 ± 17.32	1,192 ± 22.81	1,190 ± 17.32
14	1,600			1,685 ± 77.39	1,646 ± 89.37
		1,832 ± 29.25	1,832 ± 29.25		
15	2,200			2,056 ± 44.68	
	Total	10,649	11,271	13,185	12,480
Transformasi Data					
1	245				
2	290	319 ± 12.33	309 ± 16.69	332 ± 19.27	328 ± 25.35
3	370	357 ± 10.52	353 ± 15.20	349 ± 20.62	353 ± 30.81
					374 ± 29.30
4	460	406 ± 16.21	401 ± 21.46	399 ± 27.11	392 ± 27.25
5	580	463 ± 19.98	453 ± 16.82	459 ± 27.11	453 ± 35.48
				544 ± 27.51	546 ± 42.64
6	630	566 ± 18.27	561 ± 24.19	585 ± 28.45	621 ± 44.85
			652 ± 28.25		
7	700	686 ± 44.55	680 ± 39.82	683 ± 47.44	662 ± 53.11
8	770	734 ± 35.09	721 ± 29.68	758 ± 60 89	715 ± 49.72
9	800				763 ± 84.01
10	850	845 ± 36.45	826 ± 30.68	842 ± 58.58	862 ± 84.11[a]
				897 ± 43.40	
11	945	931 ± 54.52	918 ± 39.75		
12	1,020	1,137 ± 54.34	1,131 ± 42.01	1,106 ± 55.99[a]	1,101 ± 65.00[a]
		1,222 ± 32.61[a]	1,228 ± 26.36[a]		1,223 ± 59.51[a]
13	1,125[a]			1,262 ± 46.86[a]	
					1,376 ± 44.40
		1,434 ± 27.71	1,440 ± 42.39	1,474 ± 56.95	1,467 ± 42.91
14	1,600			1,675 ± 68.13	1,641 ± 78.42
		1,809 ± 28.10	1,809 ± 28.10		
15	2,200			2,038 ± 48.18	
	Total	10,909	11,482	13,403	12,877

[a] Pita berintensitas tebal

PEMBAHASAN

Pada Tabel 1 terlihat persentase sferoplas yang bervariasi. Menurut Vollarth (1992) laju terbentuknya sferoplas sangat bergantung pada galur yang digunakan, kondisi pertumbuhan dan preparasi enzim. Walaupun persentase sferoplas bervariasi, DNA genom masing-masing galur tetap dapat terpisah dengan baik. Hal ini diduga karena pemecahan membran sel tetap terjadi setelah sferoplas disisipkan ke dalam matriks agarosa.

Rata-rata persentase sferoplas *S. pombe* relatif lebih tinggi dibandingkan *S. cerevisiae*. Hal ini diduga berhubungan dengan perbedaan komponen dinding sel *S. cerevisiae* dan *S. pombe*. Menurut Matile *et al.* (1969) komponen dinding sel khamir terdiri dari manan, protein, glukan, kitin dan lipid yang terdapat dalam persentase yang berbeda untuk spesies yang berbeda. Genus *Schizosaccharomyces* tidak mengandung kitin (Matile *et al.,* 1969) sehingga proses pemecahan dinding sel menjadi lebih cepat.

Hasil elektroforesis memperlihatkan adanya pita-pita yang berintensitas tebal. Pita-pita tersebut mungkin merupakan kromosom duplet atau triplet. Kromosom tersebut tidak terpisah, diduga karena ukuran kromosomnya sama atau kondisi pemisahannya belum optimum untuk daerah tersebut.

Menurut Cantor *et al.* (1988); Mathew *et al.* (1988b) waktu pulsa yang optimum untuk pemisahan yang baik akan berbeda untuk berat molekul yang berbeda. Pada umumnya molekul yang lebih besar akan terpisah secara optimum pada waktu pulsa yang lebih lama.

Menurut elektroforegram (Gambar 3) masing-masing galur memiliki pola pemisahan yang berbeda. Namun, dari hasil dendogram (Gambar 4) dapat diketahui hubungan kekerabatan antar galur. Galur-galur yang memiliki pola pemisahan kromosom yang hampir mirip dapat diduga memiliki hubungan kekerabatan yang dekat. Semakin jauh jarak pada dendogram, hubungan antar galur semakin jauh.

Keempat galur yang diteliti ternyata memiliki variasi morfologi. Sel galur KA311A dan KA311B berbentuk bulat, sedangkan galur S dan F berbentuk oval. Diameter sel galur F terlihat relatif paling besar diantara keempat galur.

Pada berbagai galur *Candida albicans* terdapat spektrum yang luas dari berbagai perbedaan penataan kromosom kembali (Rustchenko-Bulgac, 1991). Perubahan kariotipe galur-galur tersebut berhubungan dengan perubahan morfologi koloni dan mungkin saja pada *S. cerevisiae* fenomena tersebut dapat terjadi.

Tuite (1992) menjelaskan bahwa PFGE memberikan kesempatan untuk mempelajari variasi ukuran dan jumlah kromosom dari setiap galur, meskipun data fenomena polimorfisme kromosom secara alami pada *S. cerevisiae* belum dilaporkan secara luas.

Untuk *S. pombe* tidak dilakukan pendugaan ukuran kromosom, karena standar ukuran molekul *S. cerevisiae* tidak dapat digunakan sebagai standar untuk mengukur DNA genom yang berukuran lebih dari dua ribu kpb. Hal ini ditunjukkan oleh posisi kromosom terkecil *S. pombe* yang terletak di atas kromosom terbesar *S. cerevisiae*. Menurut Fan *et al.* (1989) ukuran total DNA genom *S. pombe* kira-kira 14 ribu kpb dengan ukuran masing-masing kromosomnya yaitu 5.7, 4.6-4.7, dan 3.5 ribu kpb.

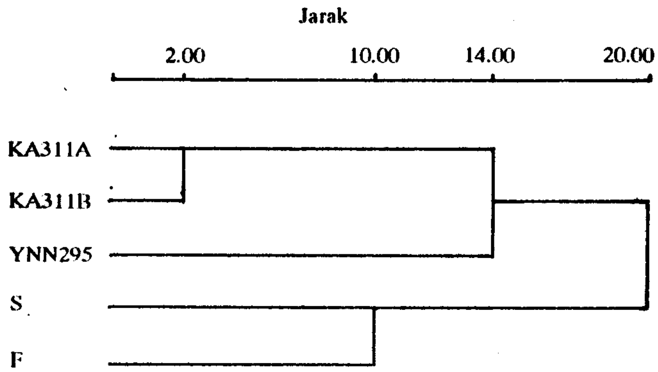
Penghitungan ukuran kromosom *S. cerevisiae* dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan metode Sambrook *et al.* (1989) menggunakan data berat molekul DNA yang ditransformasi ke $\log_{10}$-nya dan yang dimodifikasi yaitu tanpa transformasi data, menghasilkan persamaan regresi yang berbeda. Pada kondisi pertama, persamaan regresi Y_{1k} dapat menjelaskan data sebesar 99%, sedangkan persamaan regresi Y_{1l} dapat menjelaskan data 97.5% (Tabel 3).

Penyebaran data hasil persamaan Y_{1k} dan hasil persamaan Y_{1l} terdapat pada Gambar 6. Terlihat bahwa berat molekul DNA standar tidak tersebar dengan tepat pada garis regresi. Penyimpangan tersebut menyebabkan terjadinya bias. Adanya bias mempengaruhi perhitungan ukuran kromosom contoh. Bila kurva tanpa transformasi data dibandingkan dengan data ditransformasi, terlihat bahwa sebaran data tanpa transformasi lebih mendekati garis regresi daripada data yang ditransformasi.

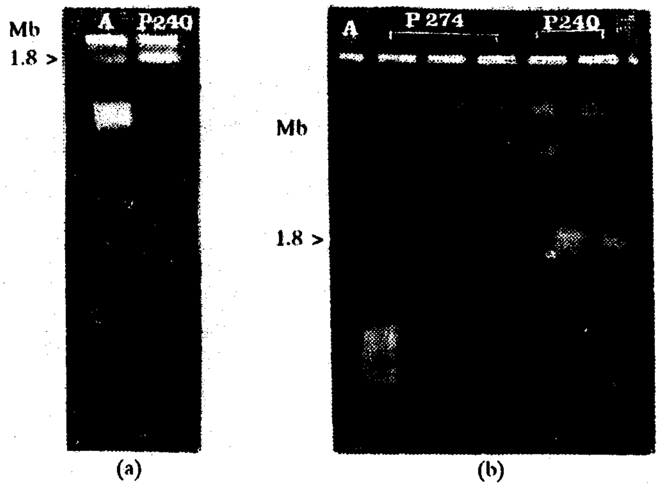
Untuk kondisi elektroforesis kedua, data yang dapat dijelaskan oleh persamaan regresi Y_{2k} dan Y_{2l} sama yaitu 97.5% (Tabel 3). Kurva standar *S. cerevisiae* dari kondisi kedua disajikan pada Gambar 7.

Tabel 3. Persamaan Garis Regresi untuk *S. cerevisiae* YNN295

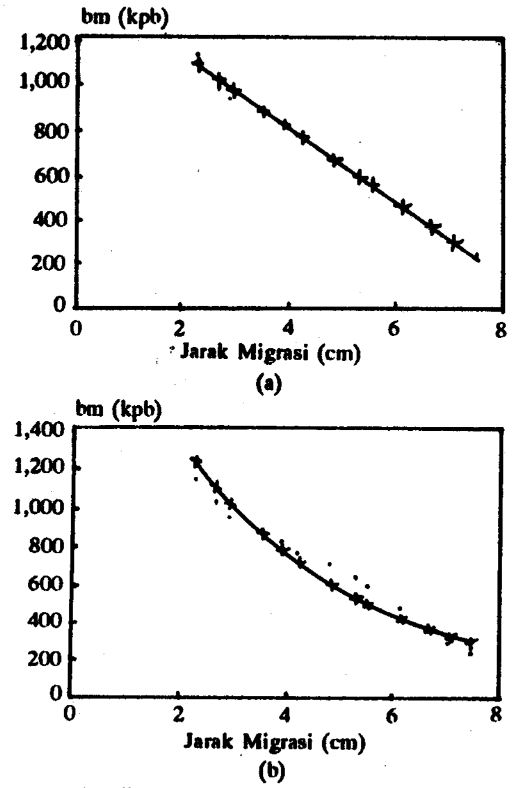
Kondisi	Tanpa Transformasi Data (k)	Transformasi Data (l)
I	$Y = 1450.3326-161.3243X$ $r^2 = 0.9906$	$Y = 3.3582-0.1187X$ $r^2 = 0.9473$
II	$Y = 2797.0748-585.0488X$ $r^2 = 0.9751$	$Y = 3.4801-0.1349X$ $r^2 = 0.9751$



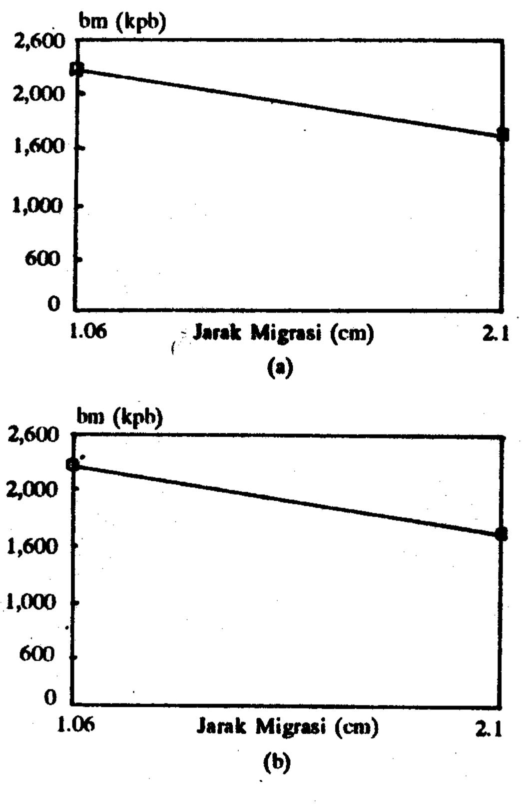
Gambar 4. Dendogram Lima Galur *S. cerevisiae*



Gambar 5. Hasil Pemisahan PFGE dari *S. pombe* JY240 dan JY274 pada Kondisi Waktu Pulsa Tahap I 50 Menit Selama 72 Jam, Tahap II 45 Menit Selama 12 Jam dan Tahap III 37 Menit Selama 72 Jam, dengan 0.6% Gel Agarosa dalam 0.5x TBE: (a) Pada tegangan 45 V, (b) tegangan 90 V. Kolom A adalah *S. cerevisiae* KA311A, Kolom P240 adalah *S. pombe* JY240, Kolom P274 adalah JY274



Gambar 6. Perbandingan Kurva Standar *S. cerevisiae* YNN295 pada Kondisi Elektroforesis I: (a) Tanpa Transformasi Data dan (b) Dengan Transformasi Data



Gambar 7. Perbandingan Kurva Standar *S. cerevisiae* YNN295 pada Kondisi Elektroforesis II: (a) Tanpa Transformasi Data dan (b) Dengan Transformasi Data

Pendugaan ukuran kromosom dengan menggunakan data berat molekul DNA tanpa ditransformasi ke nilai $\log_{10}$-nya ternyata lebih sesuai dengan elektroforegramnya. Hal ini disebabkan karena ukuran masing-masing kromosom *S. cerevisiae* relatif besar, sehingga kurva standar untuk data tanpa transformasi berupa garis lurus.

DAFTAR PUSTAKA

Cantor, C.R., C.L. Smith, and M.K. Mathew. 1988. Pulsed Field Gel Electrophoresis of Very Large DNA Molecules. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 17:287-304.

Fan, J.B., Y. Chikashige, C.L. Smith, O. Niwa, M. Yanagida, and C.R. Cantor. 1989. Construction of a *NotI* Restriction Map of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Genome. *Nucleic. Acid. Res.* 17(7):2801-2818.

Mathew, M.K., C.L. Smith, and C.R. Cantor. 1988a. High-resolution Separation and Accurate Size Determination in Pulsed Field Gel Electrophoresis of DNA: 1. DNA Size Standards and the Effect of Agarose and Temperature. *Biochemiistry* 27:9204-9210.

Mathew, M.K., C.L. Smith, and C.R. Cantor. 1988b. High Resolution Separation and Accurate Size Determination in Pulsed Field Gel Electrophoresis DNA: 2. Effect of Pulse Time and Electric Field Strength and Implications for Models of the Separation Process. *Biochemistry* 27:9210-9216.

Matile, P.H., H. Moor, and C.F. Robinow. 1969. Yeast Cytology, p. 220-297. *In* A.H. Rose and J.S. Harrison *(ed.), The Yeast,* Vol. I. N.Y.: Academic Press.

Rustchenko-Bulgac, E.P. 1991. Variations of *Candida albicans* Electrophoretic Karyotypes. *J. Bacteriol.* 173(20):6586-6596.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Smith, C.L. and C.R. Cantor. 1987. Purification, Spesific Fragmentation, and Separation of Large DNA Molecules, p.449-467. *In* R. Wu *(ed.), Methods in Enzimology,* Vol. 155, Recombinant DNA (Part F). N.Y.: Academic Press.

Tuite, M.F. 1992. Strategies for the Genetic Manipulation of *Saccharomyces cerevisiae. Critic. Rev. Biotech.* 12(1/2):157- 188.

Vollarth, D. 1992. Resolving Multimegabase DNA Molecules Using Contour-Clamped Homogenous Electric Fields (CHEF), p. 19-30. *In* M. Burmeister and L. Ulanovsky *(ed.), Pulsed Field Gel Electrophoresis: Protocols, Methods and Theories.* New Jersey: Humana Press.

Watson, D.J., N.H. Hopkins, J.W. Roberts, J.A. Steitz, and A.M. Weiner. 1987. *Molecular Biology of the Gene.* 4th ed. California: The Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc.