Jurnal Kimia Andalas, ISSN : 0853-8018
Vol. 2, No. 1, 1995 (59-66)

BIOKONVERSI KOLESTEROL OLEH BAKTERI *Arthrobacter simplex* DALAM LABU KOCOK

Hasnirwan

Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Pemakaian bakteri Arthrobacter simplex untuk proses biokonversi/ biotransformasi kolesterol telah dilakukan. Pertama sekali pertumbuhan bakteri Arthrobacter simplex diinokulasikan dalam medium germinasi pertama dan dilanjutkan pada medium germinasi kedua yang diinkubasikan pada Shaker Incubator pada suhu 28°C dengan kecepatan 200 rpm dan pH netral serta dihentikan bila harga Optical Density (OD) = 2,5. Setelah itu suspensi dipindahkan dalam labu kocok dengan kondisi dan alat yang sama. Dari pengamatan yang dilakukan didapatkan pertumbuhan bakteri Arthrobacter simplex dengan kondisi optimumnya pada germinasi pertama dan kedua adalah pada waktu 16,5 jam harga OD=2,300 dan 12,5 jam harga OD=2,290. Hasil analisis pada ekstrak fermentasi dengan menggunakan Khormatografi Lapisan Tipis dan pelarut diklorometan : metanol (93 : 7) didapatkan lima noda yang harga Rf nya : 0,59, 0,09, 0,05, 0,03 dan 0,02. Sedangkan untuk eluen kloroform : asetat anhidrida (10 : 1) didapatkan dua noda dengan Rf : 0,95 dan 0,68. Dari khromatogram Khromatografi Gas, menunjukkan bahwa bakteri Arthrobacter simplex mampu mengubah kolesterol menghasilkan lima komponen. Komponen tersebut belum dapat diidentifikasi lebih lanjut, mengingat hasil analisis hanya dilakukan dengan alat kromatografi gas saja.

ABSTRACT

Utilization of Arthrobacter simplex bacteria for cholesterol bioconversion/ biotransformation process has been done. Arthrobacter simplex bacteria growth was inoculated at the first germination medium followed by the second germination medium that was incubated in Shaker Incubator at a temperature of 28°C, vibration of 200 rpm and pH neutral. The incubation was stopped when an optical density of 2.5 was obtained. The suspension was then transferted to Shaker flash at the same condition. The result showed the optimum condition of Arthrobacter simplex bacteria growth at the first and the second germination were at incubation time of 16.5 hours with optical density of 2.300 and 12.5 hours at optical density of 2.290 respectively. Thin layer chromatography using

dichloroethane : methanol (93:7) eluent showed 5 spots with Rfs of 0.59, 0.09, 0.05, 0.03 and 0.02, and using chloroform : acetic anhydride (10:1) eluent showed 2 spots with Rfs of 0.95 and 0.68. Gas chromatogram showed that Arthrobacter simplex bacteria was able to convert cholesterol giving five components were not yet further identified since the analysis was only performed by gas chromatography.

PENDAHULUAN

Pada beberapa dekade terakhir ini, terlihat adanya perkembangan yang cukup besar dan pesat dari ilmu Biotekno-logi, yaitu suatu teknologi yang mengeksploitasikan potensi dari mikroorganisme. Pengggunaan mikroorganisme untuk mela-kukan suatu reaksi kimia telah banyak dilakukan oleh kelompok Bioteknologi yang merupakan sumber enzim-enzim dalam melakukan reaksi kimia tersebut. Salah satu bagian dari Bioteknologi ini adalah biokonversi/biotansformasi steroid (kolesterol), dimana mikroorganisme dimamfaatkan kemampuannya untuk memodifikasi senyawa-senyawa organik secara biologis [1,2].

Steroid yang mempunyai struktur dasar suatu siklopentanoperhidro fenantrena dan secara alami mempunyai sifat-sifat hormon ini banyak digunakan untuk kepentingan medis. Melihat betapa pentingnya potensi senyawa-senyawa steroid ini, seperti beberapa turunan steroid yang bisa digunakan sebagai bahan kontrasepsi maka biokonversi/biotransformasi steroid sangatlah pantas mendapat perhatian yang besar dari negara-negara di dunia termasuk Indonesia [3].

Dalam proses biokonversi/biotransformasi, substrat dapat dimetabolisme tetapi ada beberapa reaksi konversi berlangsung tanpa menghasilkan energi. Salah satu contoh : reaksi oksidasi etanol menjadi asam asetat oleh bakteri *Acetobacter* dan *Gluconobacter*. Beberapa galur dari spesies ini mengkatalis reaksi oksidasi sebahagian senyawa organik karena tidak mempunyai enzim-enzim Trichloro Acetic Acid (TCA) untuk oksidasi lengkap, oleh karena itu kemampuannya terbatas dalam memecah sumber karbon.

Pada umumnya, reaksi dalam suatu proses industri dapat diperoleh melalui sintesis kimia atau biokonversi, dimana secara biokonversi lebih menguntungkan karena kelebihan-kelebihannya, seperti : reaksinya spesifik, yield tinggi, kondisi reaksi netral, reaksi dapat dilakukan pada salah satu posisi molekul dimana sukar direaksikan dengan reaksi kimia biasa. Reaksi berantai atau bertahap dapat dilakukan oleh mikroorganisme yang mengandung beberapa enzim atau menggunakan beberapa mikroorganisme yang berbeda).

Beberapa jenis reaksi yang dapat terjadi dalam proses biokonversi/ biotransformasi steroid oleh mikroba adalah sebagai berikut : oksidasi, reduksi, hidrolisis, pembentukan ester dan pemecahan rantai samping, diantaranya adalah pemutusan C-27 menjadi C-17 [4].

Dengan banyaknya kebutuhan metabolit sekunder oleh manusia yang mana Memoli dan Verceilone (1937) adalah penemu pertama proses konversi steroid

secara mikrobiologi melalui reaksi hidrogenasi dan dehidrogenasi. Pada mulanya dipergunakan untuk produksi testosteron untuk tujuan komersial. Konversi kolesterol oleh beberapa mikroba telah dilaporkan dari hasil penelitian, diantaranya hasil penelitian Turfitt (1948) yaitu biokonversi kolesterol menjadi 4-dehidroetiokolonat oleh *Nocordia sp.* serta oleh Kramli dan Horvath (1948-1949), yaitu biokonversi kolesterol menjadi 7-hidroksi kolesterol oleh *Nocordia rosens*. Kei Arima dkk. (1969) menunjukkan bahwa *Arhtrobacter simplex* dapat mengubah kolesterol menjadi cholest-4-en-3-one dan cholesta-1,4-dien-3-one,sedangkan Wulf Crueger dkk. (1989) melaporkan bahwa kolesterol dapat pula dikonversikan oleh *Arhtrobacter simplex* menjadi senyawa 1,4-androstadiene-3,17-dione.

Penelitian ini bertujuan untuk dipergunakan dalam produksi senyawa hasil biokonversi/biotransformasi kolesterol oleh bakteri *Arthrobacter simplex*, maka untuk mencari kondisi optimum dari pertumbuhan bakteri tersebut diperlakukan beberapa tahap proses [2,5,7].

BAHAN DAN METODA

Bakteri yang dipergunakan untuk penelitian ini adalah bakteri *Arthrobacter simplex* yang berumur 48 jam dalam botol Roux yang diperoleh dari Laboratorium Teknologi Fermentasi PAU-ITB Bandung.

Bahan yang digunakan untuk medium germinasi pertama terdiri dari 3 g Corn Steep Liquor (CSL), 3 g Beef extract, 0,6 g glukosa, 0,15 g K_2HPO_4, 2 tetes FMT 30 % dan 300 ml air suling. Sedangkan untuk medium germinasi kedua yaitu : 20 g CSL, 20 g Beef extract, 4 g glukosa, 0,5 g K_2HPO_4 dan air suling. Dan untuk medium labu kocok volume 500 ml yaitu: 100 g CSL, 20 g Beef extract, 7,5 g K_2HPO_4 dan air suling.

Penelitian ini bertujuan untuk dipergunakan dalam produksi senyawa hasil biokonversi/biotransformasi kolesterol oleh bakteri *Arthrobacter simplex*, maka untuk mencari kondisi optimum dari pertumbuhan bakteri tersebut diperlakukan beberapa tahap proses.

Tahap Kerja

Bakteri *Arthrobacter simplex* diinokulasikan pada medium germinasi pertama, dimana bakteri yang berumur 48 jam disuspensikan dengan larutan Tween 80 0,01 % sebanyak 35 ml. Suspensi ini dipipet sebanyak 5 ml dimasukkan dalam tiap-tiap erlenmeyer (5 buah) yang berisi medium germinasi pertama. Selanjutnya ditambahkan 10 ml larutan glukosa dan pada erlenmeyer keenam (sebagai blanko),pH medium dibuat netral dengan menambahkan larutan NaOH 1 N sebanyak 0,6 ml. Kelima erlenmeyer diinkubasikan pada Shaker incubator Laminer Air Flow Cabinet pada suhu 28°C, 200 rpm dan inkubasi dihentikan bila harga OD mencapai 2,5.

Kemudian suspensi bakteri *Arthrobacter simplex* dalam germinasi pertama dipindahkan sebanyak 100 ml kedalam ma-sing-masing medium germinasi kedua dan tambahkan 100 ml larutan glukosa pada masing-masing erlenmeyer tersebut. Proses ini dilakukan secara aseptis. Lakukan inkubasi pada Shaker incubator pada suhu 28°C, 200 rpm dan inkubasi dihentikan bila harga OD mencapai 2,5.

Pertumbuhan bakteri pada germinasi pertama dan kedua diamati dengan cara menentukan harga OD nya mendekati atau sama dengan 2,5 yang mana pada harga OD tersebut menunjukkan waktu yang optimumnya.

Saat suspensi bakteri *Arthrobacter simplex* pada germi-nasi kedua mencapai pertumbuhan yang optimum, maka suspensi dipindahkan kedalam labu kocok 500 ml yang telah disterilkan dan berisi media Corn Steep Liquor (CSL), beef extract, K_2HPO_4 dan glukosa. Lakukan incubasi dalam Shaker Incubator dengan kondisi : suhu 28°C, pH=7 dan 300-500 rpm . Sewaktu pertumbuhan bakteri mendekati fasa stasioner, maka dimasukkan kolesterol secara aseptis dan amati hasil biokonversi.

Begitu pada saat proses biokonversi mendekati fasa stasioner kembali, ambil 50 ml larutan pada labu kocok dan tambahkan solasodin pada labu serta lanjutkan inkubasi.

50 ml larutan hasil biokonversi kolesterol diekstrak dengan dikloroetan dan hasil ekstrak dipekatkan dengan alat rotary epavorator, selanjutnya dilakukan Khromatografi Lapisan Tipis dan Khromatografi gas.

Hasil ekstrak ditentukan jumlah komponennya dengan plat TLC silika gel GF_{254} ukuran 10X10 cm dan bejana elusi yang telah dijenuhkan oleh fasa gerak (eluent). Fasa gerak nya : diklorometan : metanol (93:7) dan kloroform : asetat anhidrida (10:1). Sampel dan kolesterol standar ditotolkan pada plat TLC dan kemudian dimasukkan kedalam Chamber (bejana elusi). Setelah elusi dihentikan, plat dikeringkan selanjutnya disemprot dengan H_2SO_4 50% dalam metanol. Keringkan dalam oven dan amati noda dengan lampu UV serta hitung noda yang terbentuk dan Rf-nya.

Untuk analisis dengan alat Khromatografi Gas menggunakan GC Shimadzu 14-A dengan kolom OV-17. Kondisi operasi diatur : suhu 275°C, detektor FID, gas pembawa nitrogen dan laju gas pembawa 60 ml/menit. Larutan kolesterol 20 mg/ml diinjeksikan sebanyak 3 ul kemudian dilanjutkan injeksi ekstrak fermentasi sebanyak 4 ul. Khormatogram yang dihasilkan dibandingkan dengan khromatogram standar, sehingga dapat diketahui komponen hasil biokonversi kolesterol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari pengamatan yang dilakukan pada pertumbuhan bakteri *Arthrobacter simplex* tersebut didapatkan data hasil pengamatan dari proses fermentasi, sebagai berikut

Tabel 1. Pertumbuhan bakteri *Arthrobacter simplex* pada medium germinasi pertama

No.	Waktu (jam)	Harga OD (A)
1.	6,5	0,357
2.	9,0	0,699
3.	12,0	1,545
4.	15,0	1,900
5.	16,5	2,300

Tabel 2. Pertumbuhan bakteri *Arthrobacter simplex* pada medium germinasi kedua

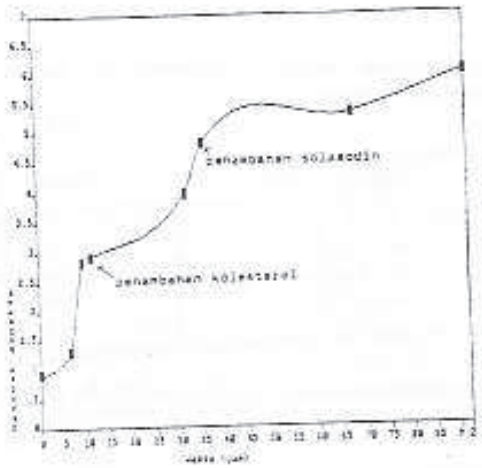
No.	Waktu (jam)	Harga OD (A)
1.	4,0	1,801
2.	9,0	1,940
3.	11,0	2,150
4.	12,5	2,290

Tabel 3. Pertumbuhan bakteri *Arthrobacter simplex* pada labu kocok 500 ml

No.	Waktu (Jam)	Harga OD (A)	
1.	0,0	0,321	
2.	6,5	1,301	
3.	9,5	2,940	
4.	11,5	3,920	induksi kolesterol 10 ppm
5.	32,0	3,360	
6.	56,0	4,920	penambahan solasodin 50 ppm
7.	68,0	5,320	
8.	92,0	6,020	

Pola pertumbuhan bakteri *Arhtrobacter simplex* setelah germinasi kedua pada labu kocok 500 ml dapat dilihat pada Gambar 1.

Pertumbuhan bakteri dari kurva diatas menunjukkan tidak terdapatnya fasa log, hal ini berarti pemindahan kelabu kocok dari germinasi kedua sangat tepat. Penambahan kolesterol dan solasodin diberikan pada saat fasa pertumbuhan diperlambat, jumlah sel bakteri optimum dan persediaan nutrisi menipis, sehingga bakteri akan segera mengkonsumsi kolesterol maupun solasodin untuk diubah menjadi senyawa hasil biokonversinya. Namun hasil biokonversi solasodin belum dapat diketahui, karena analisisnya belum dilakukan.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan bakteri *Arthrobacter simplex* dalam labu kocok 500 ml.

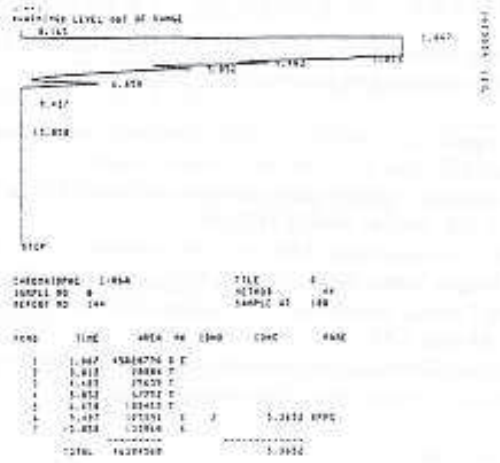
Tabel 4. Hasil kromatografi Lapisan Tipis (KLT)

No.	Sampel	Harga Rf eluen a		Harga Rf eluen b	
		p.n.c	p.n.d	p.n.d	p.n.d
1.	Kolesterol standar	-	0,60	-	0,68
2.	sampel labu kocok	-	0,59	-	0,68
		0,09	-	0,95	0,95
		0,05	-		
		0,03	-		
		0,02	-		

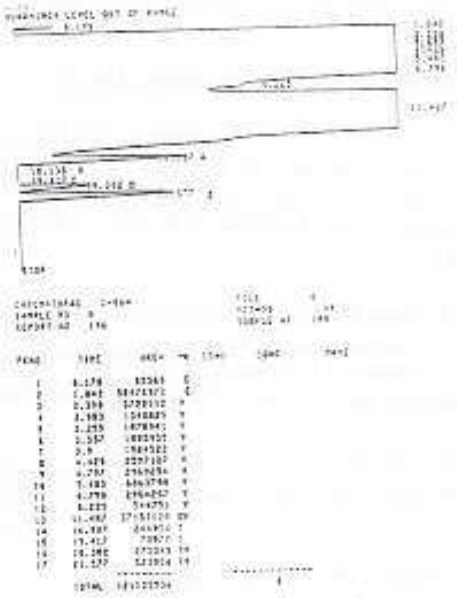
Keterangan : a= eluen diklorometan : metanol (93:7)
b= eluen kloroform : asetat anhidrida (10:1)
c= penampak noda lampu UV
d= penampak noda larutan H_2SO_4 10% dalam etanol

Khromatogram dari khromatografi gas untuk biokonversi kolesterol, dapat dilihat dari Gambar 2.

Bila dilihat dari khromatogram hasil khromatografi gas (Gambar 3), maka diduga bahwa 1,4-androsteadiene-3,17-dione tidak dihasilkan dalam labu kocok. Hal ini dapat dilihat bahwa tidak ada puncak pada waktu retensi (RT) yang lebih kecil dari RT kolesterol dimana seharusnya senyawa tersebut muncul.



Gambar 2 : Khromatogram dari kolesterol standar



Gambar 3 : Khromatogram dari sampel labu kocok 500 ml

KESIMPULAN

Dari pengamatan yang dilakukan terhadap pertumbuhan bakteri *Arthrobacter simplex* yang optimum didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Pertumbuhan optimum bakteri pada medium germinasi pertama didapatkan harga OD nya 2,300 dengan waktu 16 jam.
2. Pertumbuhan optimum bakteri pada medium germinasi kedua didapatkan harga OD nya 2,290 dengan waktu 12,5 jam.
3. Hasil analisis KLT dengan eluen diklorometan : metanol (93:7) didapatkan lima senyawa dengan harga Rf 0,59, 0,09, 0,05, 0,03 dan 0,02 dan untuk eluen kloroform : asetat anhidrida (10:1) didapatkan dua senyawa dengan harga Rf nya 0,68 dan 0,95.
4. Dari khromatogram kromatografi gas didapatkan lima komponen, namun struktur senyawanya belum dapat diketahui dengan pasti.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ponis Tarigan, 1988, Petunjuk Praktikum Teknologi Fermentasi, PAU Bioteknologi-ITB, Bandung.

2. Ponis Tarigan, 1991, Biokonversi Steroid, PAU Bioteknologi -ITB, Bandung, hal. 24-26, 121-134.

3. Syamsul.A.A.1985, Kimia Organik Bahan Alam , Hal. 52-80.

4. Paolo.M, 1981, Biosynthesis of Natural Products, Ello Horwood Limited, John Willy & Sons, New York, pp. 314-343.

5. Stadtman.T.C, Cherkes, A and Anfinsen, C.B, 1969, J.Biol Chem. Vol.33 No.11, pp.1636-1643.

6. Srikandi,F, 1988, Fisiologi Fermentasi, PAU-IPB, Bogor.

7. Crueger, W and Crueger, A., 1989, Biotechnology, A Text Book of Industrial Microbiology, Sec. Ed, Sinauer Ass. Inc. Sunderland, USA.