

BIOTRANSFORMASI KOLESTEROL PADA FERMENTOR BIOSTAT VOLUME 10 LITER

Hasnirwan

Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Telah dilakukan biotransformasi senyawa kolesterol oleh bakteri *Arthrobacter simplex* dalam fermentor Biostat volume 10 liter. Inokulum yang berasal dari medium germinasi kedua dimasukkan kedalam fermentor dengan kondisi media produksi optimumnya pada suhu 28°C, pH=7 dengan kecepatan 300 rpm.

Penambahan kolesterol 10 ppm dilakukan pada saat fasa pertumbuhan diperlambat dengan waktu fermentasi 32 jam dan barga OD = 3,666. Selama proses berlangsung, ditentukan kadar glukosa dan kadar fosfatnya yang menunjukkan adanya penurunan kadar tersebut dan sejalan dengan lamanya fermentasi, sedangkan jumlah biomassa meningkat.

Komponen hasil biotransformasi dianalisis dengan kromatografi Lapisan Tipis (KLT), fasa diam plat silka gel GF₂₅₄ dan eluen yang digunakan diklorometan : metanol (93:7) diperoleh empat noda dengan barga Rfnya, yaitu: 0,12, 0,08, 0,06 dan 0,03. Sedangkan dengan eluen kloroform : asetat anhidrida (10:1) diperoleh satu noda yang Rf nya 0,92 dan dibandingkan dengan kolesterol standar.

Untuk hasil kromatografi gas menunjukkan bahwa bakteri *Arthrobacter simplex* mampu mengubah kolesterol menjadi tiga komponen. Komponen-komponen tersebut belum dapat diidentifikasi lebih lanjut mengingat hasil analisis hanya dilakukan dengan alat kromatografi gas saja.

ABSTRACT

It has been conducted biotransformation of cholesterol by *Arthrobacter simplex* bacteria in fermentation Biostat Volume 10 L. Inoculum taken source from the second germination medium that entered to fermentor with condition productive medium maximal at temperature 28°C, pH=7 by speed 300 rpm.

To addition cholesterol 10 ppm that is done at the later growth with fermentation time 32 hours and valuable OD = 3.666. During to do process is determined the percentage of glucose and phosphate that indicate a minus its percentage and the same have time during fermentation, beside that the sum of biomass increase.

The result of biotransformation component is analyzed by Thin Layer Chromatography, the inactive phase, silicagel plate GF₂₅₄ and eluent that used for dichloromethane ; methanol (93:7) that found four spots with R_fs of 0.12, 0.08, 0.06 and 0.03. For chloroform ; acetic anhydride (10:1) eluent showed one spot with R_f 0.92 and if compare with standart cholesterol.

*For the result of gas chromatography indicates that the *Arthrobacter simplex* bacteria can move cholesterol to be three components. Its components haven't more identified to remind of the analyzed result just done with the certain gas chromatography equipment.*

PENDAHULUAN

Steroida yang terdapat dalam banyak memiliki sifat sebagai hormon dalam tubuh manusia, seperti hormon korteks adrenal (glukokortikoida dan mineralokortikoida), androgen, estrogen dan hormon progesteron yang aktif selama kehamilan. Kegunaan hormon estrogen, progesteron dan androgen bisa untuk terapi serta turunan progesteron dan estrogen digunakan sebagai kontraseptik. Disamping bioaktivitasnya sebagai hormon, steroida juga aktif sebagai sedatif pada terapi anti tumor dan sebagai stimulan pada veteriner. Glukokortikoida adalah senyawa yang bermanfaat dalam penggunaan terapi secara luas. Kortison sangat berguna sebagai anti inflamasi dalam kondisi seperti arthritis rematoida dan penyakit kulit^{1,2}.

Dengan banyaknya kebutuhan metabolit sekunder oleh manusia, seperti senyawa steroida maka telah dilakukan konversi steroida secara fermentasi yang menggunakan mikroorganisme. Molekul steroida mengandung beberapa pusat asimetris, sehingga sintesis secara keseluruhan menjadi sangat sulit. Oleh karena itu dilakukaulah proses biotransformasi steroida dengan bantuan mikroorganisme secara komersil. Untuk proses reaksi biotransformasi ini ada beberapa faktor yang mempengaruhi efektifitas reaksi tersebut. Faktor-faktornya itu adalah : seleksi mikroorganisme atau enzim yang terbaik untuk reaksi biotransformasi, kondisi reaksi yang optimum, pengaturan sintesis enzim dengan cara mempertinggi jumlah enzim atau mempertinggi aktivitas enzim, mutasi, permeabilitas, kometabolisme, biotransformasi campuran atau bertahap dan konversi substrat tidak larut^{3,4}.

Dalam usaha memodifikasi cincin steroida tanpa pemecahan cincin, maka diperlukan metoda serangan selektif terhadap cincin. Beberapa metoda dapat dilakukan untuk menghalangi pemecahan inti steroida, antara lain : reaksi pemecahan dapat dihalangi dengan cara memodifikasi substrat secara kimia, transformasi dapat dilakukan dengan adanya inhibitor yang mencegah dehidrasi C-1(2) atau hidroksilasi C-9, seperti senyawa yang dapat mengkelat Fe²⁺ atau Cu²⁺ dan ion bivalen yang menggantikan Fe²⁺ atau substrat yang menghalangi fungsi sulfidril, seperti Ni²⁺, Co²⁺ dan Pb²⁺, galur yang menginaktifkan C-1(2)-dehidrogenase atau 9-hidroksilase dapat digunakan⁵.

Telah diisolasi galur *Mycobacterium* yang dapat mentransformasi kolesterol, stigmasterol dan sitosterol menjadi produk utama androstendion dan produk

sekunder. Dalam galur ini tidak ada pemecahan lebih lanjut dari senyawa tersebut. Biotransformasi kolesterol oleh beberapa mikroorganisme telah banyak dilaporkan dari hasil penelitian para ahli^{1,2,3}.

Penelitian serupa telah dilakukan sebelum ini yaitu biokonversi kolesterol oleh bakteri *Arthrobacter simplex* oleh : Kei Arima dkk (1969), Wulf Crueger dkk (1989) yang mendapatkan senyawa konversi adalah kolest-4-en-3-on, kolesta-1,4-diena-3-on dan senyawa 1,4-androstadiena-3,17-dion serta Hasnirwan (1996) melakukannya dalam labu kocok^{1,2,3,4,5}

BAHAN DAN METODE

Bahan

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan : *Arthrobacter simplex* dan bahannya Corn Steep Liquor (CSL), Beef extract, glukosa, K_2HPO_4 , FMT, air suling, NaCl, Antron, H_2SO_4 pekat, Ferromolibdat, NaOH, dikloroetan, diklorometan, Na_2SO_4 , kloroform, metanol, gas nitrogen dan plat silika gel GF₂₅₄.

Alat-alat

Alat yang dipakai adalah alat-alat gelas yang umum dilaboratorium kimia serta alat instrumen penunjang, seperti : Spektrofotometer, Shaker Incubator Laminer Air Flow Cabinet, autoklaf, sentrifuge, khromatografi gas, KLT, timbangan analitik, fermentor biostat 10 L dan lampu UV.

Metoda

Pada penelitian ini mulanya dilakukan inokulasi terhadap bakteri *Arthrobacter simplex* dalam medium germinasi pertama dan medium germinasi kedua. Untuk kerja selanjutnya adalah sebagai berikut :

1. Inokulasi bakteri ke medium germinasi biotransformasi fermentor 10 liter 1000 ml suspensi bakteri *Arthrobacter simplex* dari medium germinasi kedua yang telah menunjukkan harga OD = 2,5 dipindahkan kedalam fermentor 10 liter yang telah disterilkan. Kondisi fermentor dipertahankan sebagai berikut : pH = 7, rpm = 300 - 500, suhu 28°C dan aliran udara 0,5 - 1,0 vvm sehingga diperoleh pertumbuhan optimum. Setelah pertumbuhan bakteri *Arthrobacter simplex* dalam fermentor mendekati fasa stasioner, maka kolesterol 10 ppm dimasukkan kedalam fermentor secara aseptis. Selanjutnya hasil biotransformasi kolesterol diekstrak dan hasil ekstraksi dianalisis dengan khromatografi lapisan tipis dan khromatografi gas.

2. Analisis kondisi biotransformasi kolesterol
Selama fermentasi dari biotransformasi kolesterol oleh bakteri *Arthrobacter simplex* berlangsung, dilakukan analisis terhadap :

A. Pengukuran sel hidup dengan mengukur Optical Density (OD) dari sel
10 ml sampel dimasukkan kedalam tabung sentrifuge kemudian dimasukkan dalam alat sentrifuge yang disentrifuge pada 500 rpm selama 15 menit. Filtrat dan endapan dipisahkan. Endapan disuspensikan dengan larutan NaCl 0,9% sebanyak 10 ml dan ukur %T nya dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 670 nm. Sebagai larutan blanko adalah larutan NaCl 0,9%.

B. Pengukuran Berat Sel Kering (BSK)

1. Penimbangan tabung kosong

Tabung sentrifuge bersih dicuci dengan air suling, kemudian dibilas dengan alkohol dan dikeringkan dalam oven pada suhu 110°C selama satu jam. Setelah proses pengeringan selesai enam buah tabung masing-masing dimasukkan dalam cawan petri dan di dinginkan dalam desikator sampai suhu tabung sentrifuge sama dengan suhu kamar. Tabung-tabung dalam setiap cawan petri diberi nomor urut 1 sampai 6 kemudian ditimbang satu persatu dengan timbangan analitik. Tabung-tabung yang sudah ditimbang dimasukkan kembali dalam oven selama satu jam dan dinginkan dalam desikator, serta timbang kembali hingga berat konstan.

2. Pengukuran sampel.

Masing-masing 1 ml sampel dimasukkan dalam tabung sentrifuge yang telah konstan (dalam satu cawan petri), kemudian disentrifuge dengan putaran 13.000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan endapan dengan filtrat. Endapan dalam tabung sentrifuge dimasukkan dalam oven pada suhu 110°C selama satu jam. Selanjutnya di dinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali hingga berat konstan.

C. Pengukuran kadar glukosa dengan metoda antron

5 ml filtrat sampel (hasil sentrifuge) yang telah diencerkan (pengenceran 15 kali) dituang kedalam tabung reaksi dan tambahkan 6 ml larutan antron 2% dalam H₂SO₄ pekat. Larutan tersebut dikocok sampai homogen dan di diamkan selama 15 menit. Ukur harga OD dengan Spectronic 20 pada panjang gelombang 550 nm. Sebagai blanko adalah 3 ml air ditambah 6 ml larutan antron 2% dalam H₂SO₄ pekat. Pengukuran dilakukan terhadap standar glukosa (1 mg/ml) yang telah diencerkan 500 kali.

D. Pengukuran kadar fosfat

6 ml filtrat sampel (hasil sentrifuge) yang telah diencerkan (pengenceran 50 kali) dicampur dengan 4 ml reagen ferromolibdat. Kemudian di diamkan selama 5 menit dan ukur %T dengan spectronic 20 pada panjang gelombang 720 nm. Sebagai blanko adalah 6 ml air suling ditambah 4 ml reagen ferromolibdat. Pengukuran ini dilakukan terhadap standar fosfat K₂HPO₄ 0,5 mg/ml yang telah diencerkan menjadi 50 kali.

E. Ekstraksi hasil biotransformasi kolesterol

50 ml sampel hasil fermentasi disonikasikan selama 15 menit untuk memecah sel bakteri. Selanjutnya dilakukan sentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Filtrat dikumpulkan dan endapan dibuang. Filtrat hasil pemisahan dimasukkan dalam corong pisah, kemudian ditambah 75 ml dikloroetan dan dikocok kuat-kuat selama 15 menit. Biarkan sebentar agar terjadi pemisahan fasa dikloroetan. Pisahkan fasa dikloroetannya dan lapisan air diekstrak kembali dengan 75 ml dikloroetan. Setelah proses ekstraksi selesai, inaka fasa dikloroetan dikumpulkan dan selanjutnya ditambahkan Na_2SO_4 . Campuran disaring dengan kertas saring dan filtrat dikumpulkan, pekatkan larutan dengan alat rotary evaporator. Ekstrak yang diperoleh dilarutkan dalam etanol untuk selanjutnya diaalisis dengan KLT dan khromatografi gas.

4. Pengujian kolesterol dan biotransformasi kolesterol

a. Analisis dengan KLT.

Proses KLT dilakukan untuk analisis kolesterol dan senyawa hasil biotransformasi menggunakan fasa diam plat silika gel GF₂₅₄ fasa gerak diklorometan : metanol (93 : 7). Plat silika gel dipotong dengan ukuran 10X10 cm, kemudian diukur 2 cm dari bawah untuk tempat penotolan sampel serta batas akhir eluen 0,5 cm dari atas plat. Sampel yang ditotolkan adalah kolesterol standar dan filtrat hasil ekstraksi dari fermentor 10 liter. Setelah itu plat dimasukkan dalam bejana elusi yang telah jenuh oleh eluen. Elusi dihentikan setelah eluen mencapai batas dan plat diangkat serta keringkan. Selanjutnya disemprot dengan H_2SO_4 10 % dalam etanol, dikeringkan dalam oven kemudian diamati noda yang terjadi dengan lampu UV. Harga Rf dari noda yang terbentuk dihitung.

b. Analisis dengan khromatografi gas.

Kolom yang digunakan untuk analisis kolesterol dan komponen hasil biotransformasi adalah OV-17, Detektor FID. Alat khromatografi gas diatur kondisi operasinya sebagai berikut:

suhu kolom 250°C, suhu injektor 275°, suhu detektor 275°C, gas pembawa N₂ dan laju gas pembawa 50 ml/menit.

Sampel yang di injeksi adalah kolesterol standar 20 mg/ml sebanyak 3 ul dan ekstrak dari fermentor 5 ul. Khromatogram yang terbentuk dari sampel dibandingkan dengan khromatogram standar sehingga dapat diketahui komponen hasil biotransformasi koleste-rol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

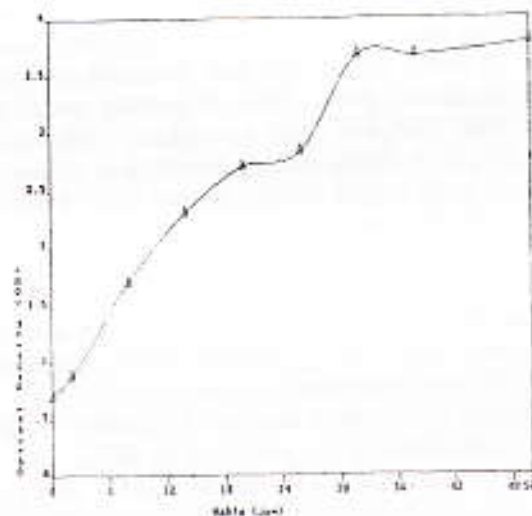
Pengamatan yang dilakukan terhadap hasil fermentasi serta analisisnya dapat dilihat dari data berikut :

Tabel 1 Data pertumbuhan bakteri *Arthrobacter simplex* pada fermentor Biostat 10 L.

No.	waktu (jam)	harga OD (A)
1.	0,0	0,699
2.	2,0	0,870
3.	8,0	1,699
4.	14,0	2,300
5.	20,0	2,699
6.	26,0	2,823
7.	32,0	3,666
8.	38,0	3,666
9.	50,0	3,779

penambahan kolesterol 10 ppm.

Data dari Tabel 1 ini, terlihat bahwa pada waktu pertumbuhan bakteri telah berlangsung 32 jam dan 38 jam memperlihatkan harga OD yang sama, ini berarti bakteri sudah melewati fasa lognya. Maka pada saat tersebut adalah waktu yang terbaik untuk bakteri melakukan biotransformasi, sehingga penambahan senyawa kolesterol perlu dilakukan.



Gambar 1 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Arthrobacter simplex* dalam fermentor Biostat 10 L.

Dari kurva pertumbuhan bakteri tersebut di atas menunjukkan bahwa tidak terdapat fasa log pada pertumbuhan *Arthrobacter simplex* setelah germinasi kedua, hal ini sangat menguntungkan untuk tujuan produksi. Namun pada jam ke 20 dan 26 tampak kenaikan OD yang hampir sama sehingga seolah-olah terjadi fasa pertumbuhan diperlambat, sebenarnya tidak

demikian. Ini disebabkan karena adanya CSL dalam media yang pada saat glukosa menipis maka mikroorganisme akan mengkonsumsi CSL untuk kelangsungan hidupnya, sehingga pada jam ke 32, barga OD naik kembali.

Tabel 2. Data penentuan Berat Sel Kering (BSK).

No.	waktu (jam)	Berat sel kering (mg)
1.	0,0	0,59
2.	2,0	0,90
3.	8,0	1,13
4.	14,0	2,62
5.	20,0	3,50
6.	26,0	3,85
7.	32,0	2,60
8.	38,0	2,90
9.	50,0	2,77

Tabel 3. Data Pengukuran glukosa dengan metoda antron (alat spectronic 20 Bausch & Lomb, panjang gelombang 550 nm).

No.	Waktu (jam)	Harga OD(A)*	Kadar glukosa (mg/ml) #
1.	0,0	1,710	0,5213
2.	2,0	1,830	0,5579
3.	8,0	1,830	0,5579
4.	14,0	1,530	0,4665
5.	20,0	1,455	0,4434
6.	26,0	1,380	0,4207
7.	32,0	0,990	0,3019
8.	38,0	0,990	0,3019
9.	50,0	0,840	0,2561

* pengenceran 15 kali

dihitung dari kadar glukosa standar (1 mg/ml, OD=3,280, pengenceran 500 kali).

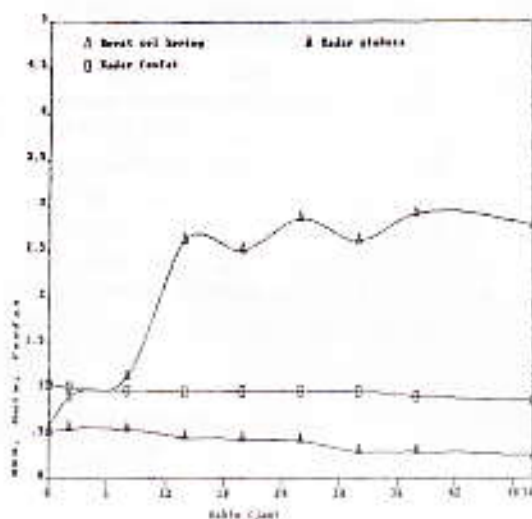
Tabel 4 Pengukuran kadar fosfat (alat spectronic 20 Bausch & Lomb, panjang gelombang 660 nm).

No.	waktu (jam)	Harga OD(A)*	Kadar fosfat (mg/ml) #
1.	0,0	0,297	1,0458
2.	2,0	0,288	1,0141
3.	8,0	0,279	0,9824
4.	14,0	0,277	0,9754
5.	20,0	0,276	0,9718
6.	26,0	0,275	0,9683
7.	32,0	0,274	0,9648
8.	38,0	0,259	0,9119
9.	50,0	0,244	0,8592

* pengenceran sampel 50 kali

fosfat standar 0,5 mg/ml, OD=0,142, pengenceran 50 kali.

Untuk memperlihatkan hubungan dari berat sel kering dengan kadar glukosa dan kadar fosfat, dapat di jelaskan dengan menggunakan grafik dibawah ini.



Gambar 2. Grafik hubungan berat sel kering, kadar glukosa dan kadar fosfat terhadap lamanya fermentasi dalam fermentor Biostat 10 L.

Grafik diatas menunjukkan bahwa dengan bertambahnya waktu fermentasi, menunjukkan jumlah biomassa sel bertambah. Sedangkan untuk kadar glukosa dan kadar fosfatnya akan menjadi turun, ini tentu disebabkan penggunaan glukosa dan fosfat oleh sel sebagai bahan makanan untuk pertumbuhannya. Dengan demikian grafik ini dapat menunjukkan adanya hubungan antara pertumbuhan banyaknya jumlah sel pada waktu tertentu dengan menurunnya kadar glukosa dan fosfat.

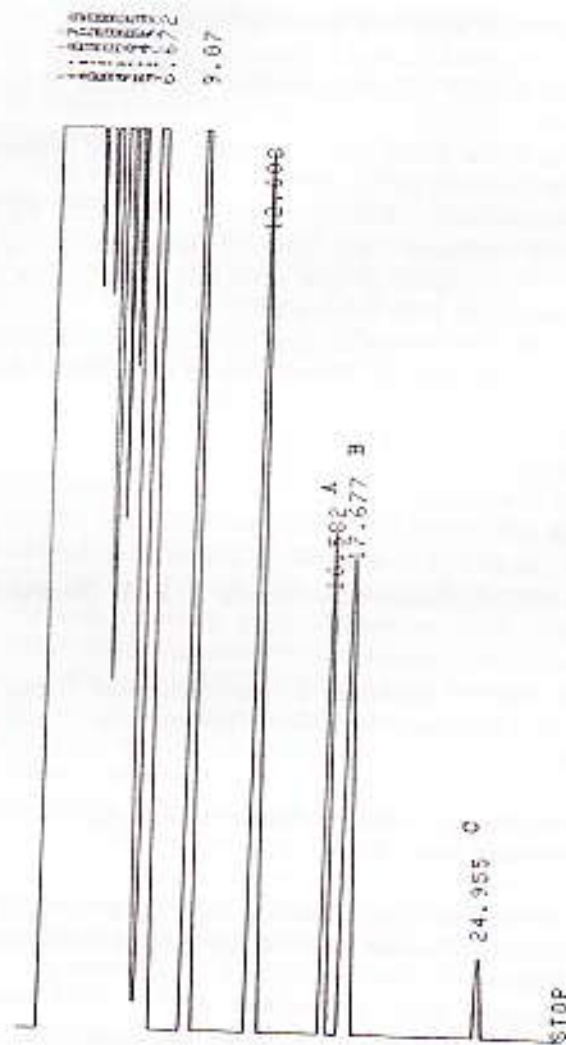
Tabel 5. Data Khromatografi Lapisan Tipis (KLT).

No.	Sampel	Harga Rf eluen a		Harga Rf eluen b		warna noda
		p.n.c	p.n.d	p.n.c	p.n.d	
1.	kolesterol standar	-	0,60	-	0,68	ungu
2.	fermentor	-	0,58	-	0,65	ungu
		0,12	0,12	0,92	0,92	ungu
		0,08	-	-	-	ungu
		0,06	-	-	-	ungu
		0,03	-	-	-	ungu

Keterangan : eluen a : diklorometan : metanol (93 : 7)
 eluen b : kloroform : asetat anhidrida (10 : 1)
 p.n.c : penampak noda lampu UV
 p.n.d : penampak noda larutan H₂SO₄ 10%/etanol

Untuk Tabel 5, memperlihatkan analisis KLT untuk senyawa kolesterol standar dengan eluen diklorometan : metanol (93:7) dibandingkan dengan eluen kloroform : asetat anhidrida (10:1), harga Rf nya lebih kecil. Sebagai penampak noda yang baik menggunakan larutan H_2SO_4 10% / etanol karena dapat memperlihatkan noda yang ada sedangkan dengan penampak noda lampu UV tidak memperlihatkan noda yang jelas.

Untuk analisis hasil biotransformasi kolesterol dengan KLT lebih baik menggunakan eluen diklorometan : metanol (93:7) diperoleh empat komponen senyawa. Jika dilakukan dengan memakai eluen kloroform : asetat anhidrida (10:1) hanya satu komponen berarti eluen ini kurang baik untuk pemisahan komponen senyawa tersebut.



Gambar 3. Khromatogram dari hasil biotransformasi kolesterol pada fermentor Biostat 10 L.

Bila dilihat dari khromatogram hasil khromatografi gas, maka di duga bahwa 1,4-androstadiena-3,17-dion tidak dihasilkan, hal ini dapat dilihat dengan tidak adanya puncak yang keluar dimana RT (Retention Time) nya lebih kecil dari RT senyawa kolesterol yang seharusnya senyawa 1,4-androstadiena-3,17-dion muncul.

KESIMPULAN

Pada proses biotransformasi kolesterol dalam fermentor Biostat 10 liter yang telah dilakukan dapat diambil beberapa kesimpulan diantaranya, adalah :

1. Fasa pertumbuhan bakteri mulai diperlambat pada waktu 32 jam dengan harga OD = 3,666.
2. Kadar glukosa dan kadar fosfat menurun sejalan dengan lamanya waktu fermentasi dimana biomassa sel bertambah.
3. Hasil analisis biotransformasi kolesterol menggunakan alat KLT dengan eluen diklorometan : metanol (93:7) diperoleh empat noda yang Rf nya : 0,12, 0,08, 0,06, 0,03, sedangkan dengan eluen kloroform : asetat anhidrida (10:1) diperoleh satu noda yang Rf nya 0,92.
4. Analisis hasil dengan khromatografi gas, diperoleh tiga komponen yaitu senyawa A, B dan C (komponen belum dapat diidentifikasi lebih lanjut).

DAFTAR PUSTAKA

1. Ponis Tarigan, 1991, " Biokonversi Steroid ", PAU Bioteknologi-ITB, Bandung, 24-26.
2. Arima.K. at-all, 1969, " Microbial Transformation of Sterol ", Part-1, Decomposition of Cholesterol by Microorganism, Agr. Biol. Chem., 33.11, 1636-1643.
3. Charney.W and H.Herzog, 1980, " Microbial Transformation of Steroid ", 2nd Editions, Academic Press, New York.
4. Ibid, 1970, " Microbial Transformation of Sterol ", Part.IV., C19 Intermediate in the Graduation of Cholesterol by *Arthrobacter simplex*, Ibid, 34 : 5, 80.804.
5. Hasnirwan, 1996, " Biokonversi Kolesterol oleh Bakteri *Arthrobacter simplex* dalam labu kocok ", Vol.II no.1, *J.Kimia Andalas* , Jurusan Kimia FMIPA Unand, Padang, 59-66.
6. Srikandi.F., " Fisiologi Fermentasi ", PAU-IPB, Bogor.