

OPTIMASI BIOTRANSFORMASI TOTAL STEROL LIMBAH TAHU MENGGUNAKAN *MYCOBACTERIUM PHLEI* DSM 43286 MENJADI 1,4-ANDROSTADIEN-3,17-DION, DENGAN PENGARUH VARIASI KONSENTRASI INHIBITOR α , α' - DIPIRIDIL

Maryati Kurniadi, Usman Sumo Friend Tambunan, Harmita
Departemen Farmasi, FMIPA Universitas Indonesia

ABSTRACT

*Isolation of total sterol from waste product of soy bean cake has been conducted, followed by biotransformation to 1,4-androstadien-3,17-dione (ADD). The waste product consist of; β -sitosterol, stigmasterol, kaemfesterol, which are isolated by column chromatography technique using silica gel as stationary phase and chloroform as mobile phase. Biotransformation was conducted by using *Mycobacterium phlei* DSM 43286 in the present of α , α' - dipiridil as an inhibitor with concentration of 0,5; 1; 1,5; 2,0 mM. The main product of biotransformation were ADD and pregnenolon. The optimum yield of ADD 0,48% is achieved by adding 1,5 mM α , α' - dipiridil are two hours after addition of substrate and 72 hours of incubation time.*

*Key Words: *Mycobacterium phlei* DSM 43286; α , α' - dipiridil concentrations.*

PENDAHULUAN

Masalah peningkatan kesejahteraan keluarga tidak lepas dari masalah pengendalian kelahiran. Meskipun jumlah penduduk terus bertambah, namun dalam kenyataannya angka pertumbuhan penduduk mengalami penurunan yang cukup berarti. Di balik keberhasilan ini adalah peran kontrasepsi oral, yang umumnya mengandung hormon steroid (Anonim 2000).

Fitosterol merupakan materi awal yang potensial untuk sintesis

hormon steroid, yang tersedia dalam jumlah yang banyak dengan harga yang murah. Suatu hasil antara yang penting dalam sintesis hormon steroid dari senyawa sterol alam adalah 1,4-androstadien-3,17-dion (ADD) dan 4-androsten-3,17-dion (AD). ADD dan AD dapat disintesis melalui biotransformasi dari sitosterol, yang didapat dari minyak kacang kedelai atau limbah tahu (Kim 1986). β -sitosterol yang mempunyai rantai samping jenuh tidak dapat dihilangkan secara kimia tanpa fragmentasi

dari cincinnya. Akan tetapi dengan cara biotransformasi rantai samping tersebut dapat dihilangkan. Novcha dan kawan-kawan (Novcha et al; 1978), melaporkan bahan β -sitosterol dapat dibioreformasi dengan *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 menghasilkan ADD dan AD. Knight dan Wovcha juga melaporkan bahwa *Mycobacterium fortuitum* UCC 9778 dapat mendegradasi kolesterol dan sterol lain dari tumbuhan menjadi campuran senyawa fenol (Anonim 2001).

Faktor yang penting pada biotransformasi adalah seleksi bakteri, yang dapat mengkatalisis suatu reaksi dengan hasil semaksimal mungkin. Bakteri yang dapat digunakan untuk biotransformasi kolesterol dan β -sitosterol menjadi ADD dan AD adalah *Mycobacterium phlei* dan *Arthrobacter simplex* (Hockenhul 1971; Martin 1984).

Agar proses biotransformasi dapat berlangsung dengan baik, maka molekul substrat harus dapat berinteraksi sedemikian rupa, sehingga kemampuan katalitik enzim tidak diinaktivasi oleh substrat ataupun produknya. Konsentrasi substrat dan waktu penambahan substrat yang memberikan hasil biotransformasi optimum harus ditentukan secara eksperimen (Leuenberger 1984). Jika substrat sukar larut dalam air, maka dapat diatasi dengan menambahkan suatu surfaktan misalnya tween 80 (Crueger 1984).

Produk yang diinginkan seringkali terurai menjadi senyawa lain.

Untuk mencegah hal tersebut dapat ditambahkan inhibitor enzim yang bekerja dengan mengkhelat ion Fe^{2+} yang terdapat pada Sitokrom P₄₅₀ (Luenberger 1984). Zat penghambat enzim yang sering digunakan adalah α , α' -dipiridil, 8-hidroksi-quinolin yang merupakan senyawa pengkhelat ion Fe^{+2} dan senyawa tersebut relatif lipofilik sehingga dapat menembus membran sel dan mengkhelat ion Fe^{+2} (Arima 1980; Martin 1977).

Dalam proses ini diperlukan juga penambahan inhibitor, yaitu untuk menghambat kerja enzim 9 α -hidroksilase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi yang dapat mengakibatkan pemecahan cincin steroid (Torrey 1984).

Jumlah ADD yang diperoleh pada proses biotransformasi tergantung pada konsentrasi dan waktu penambahan zat penghambat enzim. Bila konsentrasi penghambat enzim terlalu besar atau waktu penambahannya terlalu dini, maka reaksi hidroksilasi C₂₇ juga akan terhambat, sehingga ADD yang berbentuk sedikit. Sebaliknya jika konsentrasi terlalu kecil atau waktu penambahannya terlalu lambat maka 9 α -hidroksilase tidak terhambat secara sempurna, sehingga substrat akan terdegradasi menjadi CO₂ dan H₂O. Kedua hal ini mengakibatkan berkurangnya jumlah ADD pada hasil akhir biotransformasi (Archi 2001). Hasil penelitian terdahulu, menunjukkan waktu penambahan inhibitor enzim terbaik adalah 2 jam setelah substrat

ditambahkan dan waktu inkubasi 72 jam (Kurniadi 2003).

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh ADD optimum dari hasil biotransformasi sterol total limbah tahu menggunakan *Mycobacterium phlei* DSM 43286. Penelitian dititik beratkan pada pengaruh konsentrasi inhibitor α , α' -dipiridil terhadap produksi ADD.

BAHAN DAN CARA KERJA

BAHAN

BIAKAN

Biakan yang digunakan yaitu *Mycobacterium phlei* DSM 43286 diperoleh dari PAU Institute Teknologi Bandung.

MEDIA

Bahan yang digunakan yaitu Nutrient broth (Merck), nutrient agar (oxoid) serta media Lowenstein-Jensen.

BAHAN KIMIA

Bahan kimia yang digunakan yaitu Stigmasterol (Merck), β -Sitosterol (Merck), Metanol (Merck), Etanol (Merck), Etilasetat (Merck), ADD (Sigma), α , α' -dipiridil (Sigma), CHCl_3 (Ridel-de Haen), n-Heksana (Merck).

AMPAS TAHU

Sterol total dari ampas tahu diisolasi dengan cara kromatografi kolom (Skema 1). Sampel diperoleh

dari pabrik tahu di daerah Rawasari, Jakarta pada bulan Februari 2002.

ALAT

Neraca analitis (Shimadzu Libror AEG-225), penggerak putar (Shimadzu), *sentrifuse* (Kubota 5100), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-265), ultrasonik (Branson 3200), KLT-densitometer (Shimadzu CS 9301), kolom kromatografi dengan diameter dalam 2,4 cm dan panjang 30 cm serta GC - MS.

CARA KERJA

Skema dan cara kerja isolasi ekstrak lipid dari ampas tahu dapat dilihat pada Skema 1. Sterol dianalisis secara kuantitatif. menggunakan spektrofotometer visibel dengan pereaksi Lieberman - Burchad sebanyak 6 mL.

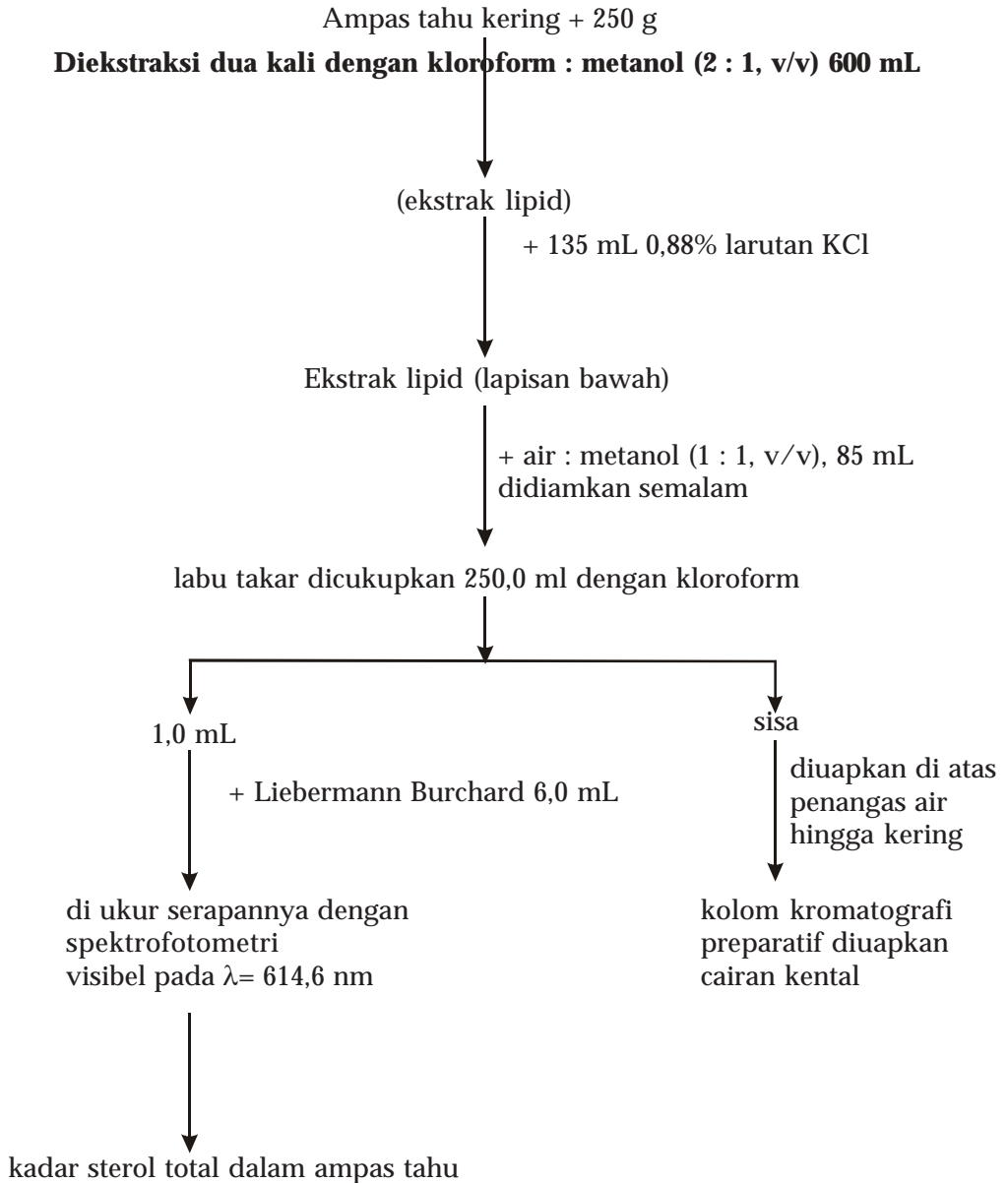
Peremajaan bakteri

Bakteri yang diperoleh dari PAU Bioteknologi ITB Bandung, diremajakan setiap 2 minggu sekali dalam agar miring dengan media Lowenstein-Jensen.

Penyiapan bakteri untuk biotransformasi

Media pembenihan dibuat dengan menimbang 3,75 Nutrien broth oxoid, lalu dimasukkan ke dalam labu 500 mL. Gliserol ditambahkan sebanyak 7,5 mL ke dalam labu 500 mL, air ditambahkan sampai 150 mL, kemudian dimasukkan ke dalam 3 Erlenmeyer, masing-masing 50 mL dan disterilkan dalam autoklaf

Skema 1.
SKEMA CARA KERJA ISOLASI EKSTRAK LIPID
DAN PENETAPAN KADAR STEROL



selama 20 menit dengan pemanasan 121°C.

Ke dalam tiap Erlenmeyer yang berisi media pembenihan diinokulasikan 1 loop ose bakteri *Mycobacterium phlei* DSM 43286 lalu dikocok, diinkubasi di atas rotary shaker (alat penggerak putar dengan kecepatan 100 rpm) pada suhu kamar hingga diperoleh pertumbuhan bakteri sebesar 10^9 /mL. Perkembangan jumlah bakteri diamati secara spektrofotometri pada panjang gelombang, $\lambda = 600$ nm. Suspensi bakteri dalam media biotransformasi yang telah hampir mencapai fase statis dituang ke dalam Erlenmeyer yang berisi substrat yang steril. Inkubasi dilakukan di atas penggerak putar pada suhu kamar. Untuk kontrol hanya digunakan media biotransformasi dan substrat.

Pengaruh variasi konsentrasi inhibitor α , α' -dipiridil yaitu 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mM, 2 jam setelah substrat ditambahkan dengan waktu inkubasi 72 jam. pH diukur sebelum dan sesudah biotransformasi.

Ekstraksi hasil biotransformasi

Sebelum analisis dilakukan, hasil biotransformasi diekstraksi dua kali masing-masing dengan 12,5 mL kloroform. Lapisan kloroform yang membentuk emulsi dikumpulkan dan disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 20 menit. Fase organik diambil dan disaring dengan kertas saring ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan kloroform hingga 25 mL.

Analisis hasil biotransformasi

Analisis kualitatif

Spektrum serapan uv

Untuk mengetahui, apakah selama proses biotransformasi suspensi Stigmasterol dan β -Sitosterol telah diubah menjadi senyawa lain, maka dibuat spektrum serapan dari ekstrak n-heksana yang diperoleh dari hasil biotransformasi dan dibandingkan dengan spektrum serapan Stigmasterol, β -Sitosterol, dan ADD standar.

Harga R_f pada KLT

Kondisi percobaan KLT yang digunakan yaitu :

Fase diam : lapisan tipis ketika silika gel F_{254} tebalnya 0,25 mm

Fase gerak : sikloheksana-etilasetat-air (60:40:0,1).

Analisis kuantitatif

Analisis dengan KLT-densitometer

Hasil elusi yang diperoleh dari hasil analisis kualitatif dianalisis dengan KLT-densitometer. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang maksimum dari baku pembandingan dan hasil biotransformasi. Data yang diperoleh berupa luas puncak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Hasil penetapan kadar terhadap sterol hasil pemurnian dari sampel ampas tahu seberat 18,20 dengan pelarut teknis, menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung sterol

Tabel 1. Data serapan suspensi bakteri pada panjang gelombang $\lambda=600$ nm

No	Konsentrasi bakteri 10^8 sel/mL	Serapan
1	0,17	0,295
2	0,48	0,435
3	0,91	0,549
4	2,00	1,175

Tabel 2. Data hasil kalibrasi ADD standar

No	Berat ADD (ng)	Area (μ v/s)
1	609,6	15,262
2	812,8	18,546
3	1219,2	40,702
4	1422,4	52,729

Keterangan: digunakan untuk perhitungan pengaruh konsentrasi α , α - dipiridil terhadap ADD hasil biotransformasi.

sebesar 0,14% b/b terhadap berat kering sampel.

Kurva kalibrasi

Data hasil kalibrasi suspensi bakteri dengan spektrofotometer uv-vis dapat dilihat pada Tabel 1 berupa garis lurus dengan persamaan garis $y=0,1847+0,4818x$ dengan faktor regresi, $r^2 = 0,9918$. Hasil kalibrasi ADD standar dapat dilihat pada Tabel 2. Kurva berupa garis lurus dengan persamaan garis $y = -16,7353 + 0,0478x$ dengan faktor (koefisien) regresi, $r^2 = 0,9876$

Pengukuran pH

pH media biotransformasi sebelum proses dimulai adalah 7,0 – 8,0 dan setelah proses biotransformasi selesai, pH berkisar antara 5,4 – 5,7.

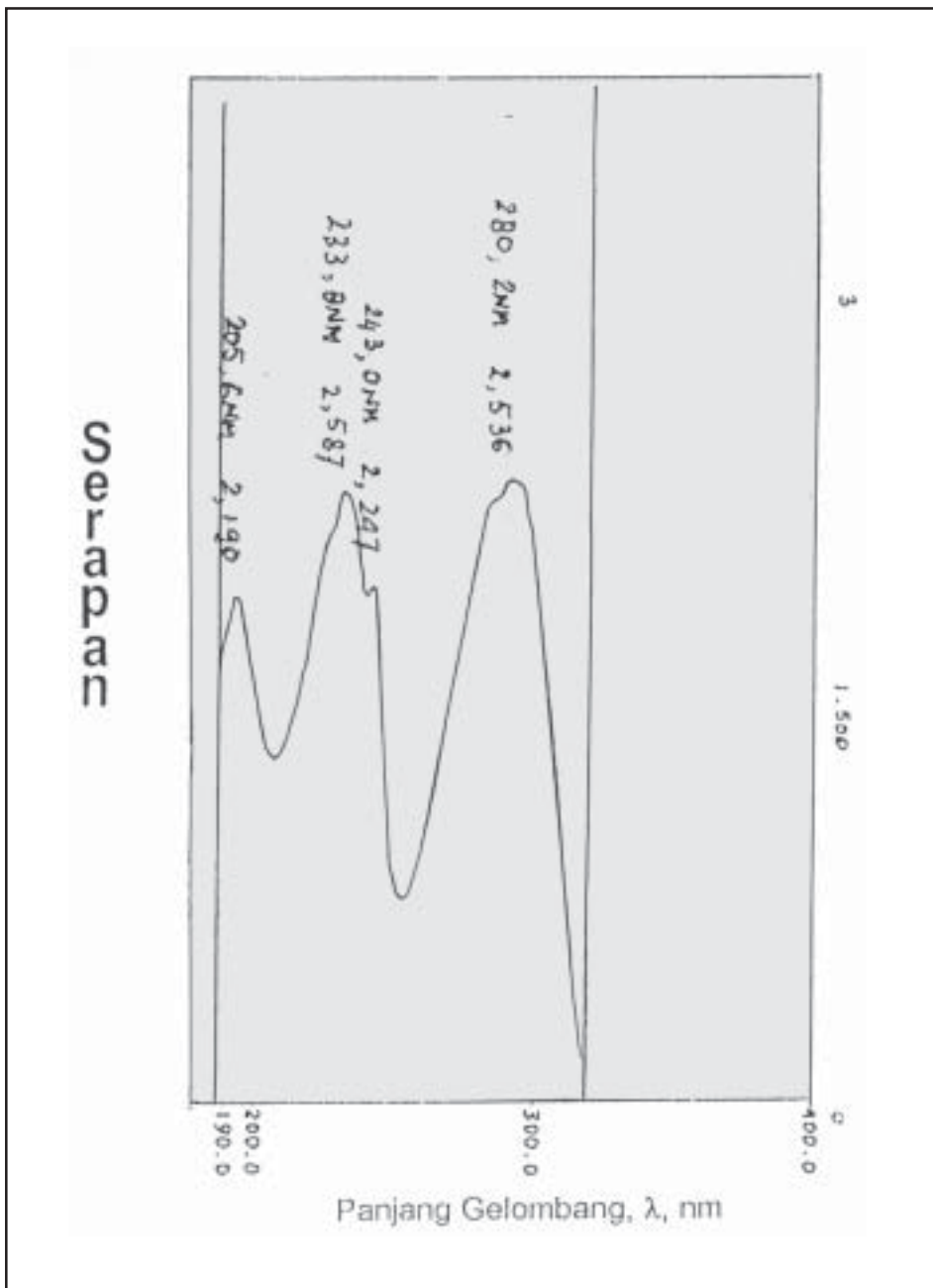
Analisis kualitatif hasil biotransformasi

Spektrum serapan uv

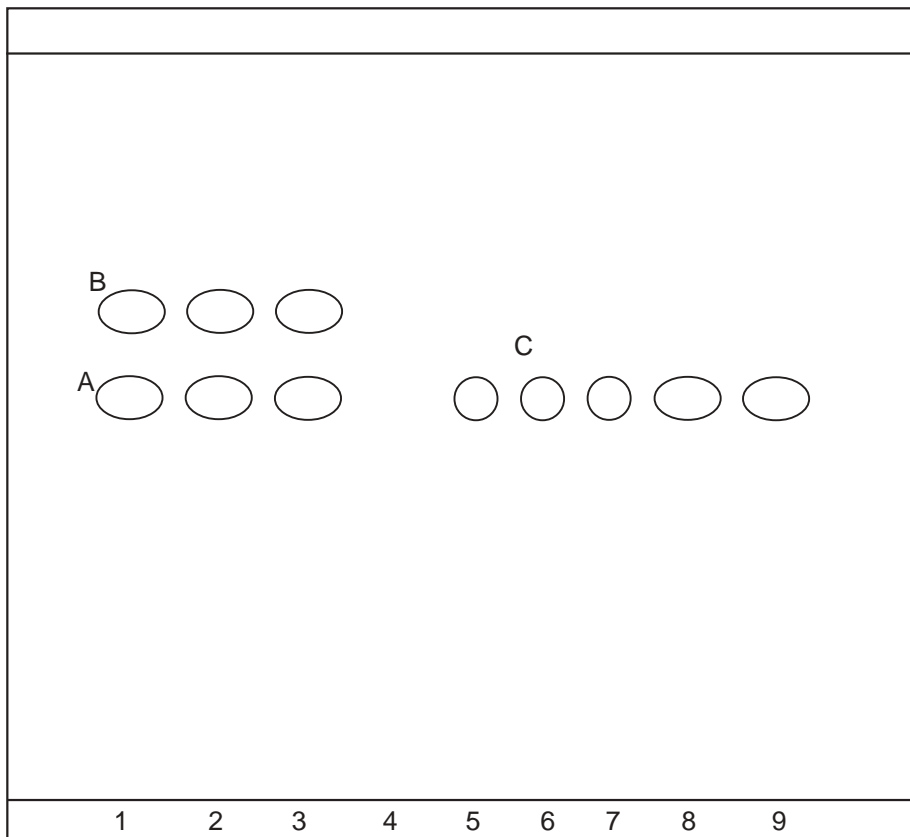
Spektrum serapan ADD memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang, $\lambda = 243,0$ nm, β -sitosterol pada, $\lambda = 201,6$ nm, stigmasterol pada $\lambda = 202$ nm, sedangkan spektrum serapan hasil biotransformasi yang dilakukan dengan spektrofotometer uv dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil biotransformasi memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 205,6 nm, 233,8 nm, 243,0 nm, 280,2 nm.

Harga R_f pada KLT

Kromatogram hasil biotransformasi dan ADD standar yang diperoleh secara KLT dapat dilihat pada Gambar 2. ADD standar memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang, $\lambda = 251$ nm dengan nilai R_f sebesar 0,32 sedangkan hasil biotransformasi bercak b



Gambar 1: Spektrum serapan hasil biotransformasi dengan pelarut n-heksana.



Gambar 2 : Kromatogram hasil biotransformasi dengan fase gerak sikloheksan etilasetat air (60 : 40 : 0,1). Bercak dilihat pada UV dengan $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Keterangan: bercak 1-3 hasil biotransformasi, kondisi optimum, konsentrasi α, α' -dipiridil 1,0 mM 2 jam. Setelah substrat ditambahkan, t inkubasi 72 jam; bercak 4 = kontrol; bercak 5 = ADD 6 μL ; bercak 6 = ADD 8 μL ; bercak 7 = ADD 10 μL ; bercak 8 = ADD 12 μL ; bercak 9 = ADD 14 μL . A = ADD hasil biotranformasi; B = senyawa yang diduga pregnenolon; C = ADD standar.

dengan nilai R_f sebesar 0,38 mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang, $\lambda = 246 \text{ nm}$.

Pengaruh variasi konsentrasi inhibitor terhadap hasil biotransformasi

Konsentrasi inhibitor dicoba dengan 4 variasi konsentrasi yaitu 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mM. Hasil biotransformasi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3 Penambahan inhibitor pada jam kedua setelah substrat dimasukkan dengan waktu inkubasi

72 jam menghasilkan ADD yang optimum dengan rendemen 1,85%.

Kadar ADD hasil biotransformasi dengan kondisi optimum, yaitu konsentrasi inhibitor enzim 1,5 mM α , α' -dipiridil, 2 jam setelah substrat ditambahkan dan waktu inkubasi 72 jam dapat dilihat pada Tabel 4.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan ampas tahu sebagai sampel sumber sterol. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Archic masih mengandung sterol 0,1334+ 0,003% (b/b) dihitung terhadap sampel kering.

Untuk memperoleh senyawa ADD dipilih cara biotransformasi dengan menggunakan *Mycobacterium phlei* DSM 43286. Dasar pemilihan cara biotransformasi adalah sulitnya memperoleh ADD secara sintesis karena substrat yang digunakan memiliki atom C asimetrik 6 buah, sehingga akan diperoleh isomer dengan jumlah sangat besar dan pemisahan isomer-isomer yang terbentuk juga relatif sulit.

Sterol yang terdapat pada limbah tahu tidak dilakukan pemisahan, karena β -sitosterol, kampesterol, dan stigmasterol mempunyai struktur

Tabel 3. Data pengaruh variasi konsentrasi inhibitor α , α' -dipiridil terhadap kadar ADD. Analisis dilakukan dengan TLC Scanner

NO	KONSENTRASI α , α' -dipiridil (mM)	AREA (μ v/s)	KADAR ADD hasil biotransformasi (% b/b)
1.	0,5	0,473	0,72
2.	1,0	6,920	0,99
3.	1,5	27,479	1,85
4.	2,0	8,121	1,04

Tabel 4. Kadar ADD hasil biotransformasi dengan kondisi terbaik. Analisis dilakukan dengan TLC Scanner

NO	KONSENTRASI α , α' -dipiridil (mM)	AREA (μ v/s)	WAKTU PENAMBAHAN SUBSTRAT (jam)	INKUBASI (jam)	KADAR (%b/b)
1.	1,5	27,474	2	72	1,85
2.	1,5	27,394	2	72	1,85
3.	1,5	26,994	2	72	1,83
4.	1,5	15,950	2	72	0,48
5.	1,5	14,960	2	72	0,48

Keterangan : No.1 sampai 3 —substrat terdiri dari 12,5 mg β -sitosterol + 12,5 mg stigmasterol. No.4, 5 —substrat sterol dari ampas tahu.

yang hampir sama, hanya beda satu ikatan rangkap. Stigmasterol mempunyai ikatan rangkap pada posisi C_{22} , sedangkan β -sitosterol dan kampesterol tidak, dan oleh karena itu polaritas dan besar molekul hampir sama.

Proses biotransformasi sterol total pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi inhibitor enzim terhadap ADD yang dihasilkan.

Untuk mencari kondisi yang paling optimum dilakukan penelitian menggunakan sterol campur, yaitu β -sitosterol 12,5 mg dan stigmasterol 12,5 mg. Pada penelitian ini tidak digunakan kampesterol karena kesulitan untuk memperoleh kampesterol standar. Bakteri yang digunakan untuk biotransformasi ditumbuhkan pada media pembenihan yang sesuai, yakni nutrisi broth-gliserol. Pada media ini *Mycobacterium phlei* dapat tumbuh cepat yaitu mencapai fase statis ($+10^9$ sel/mL) setelah 24 jam. Untuk menghitung konsentrasi bakteri diukur dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang, $\lambda = 600$ nm. Metode ini dapat digunakan, karena dari hasil percobaan diketahui bahwa kekeruhan suatu cairan kultur berbanding lurus dengan jumlah mikroba dalam kultur. Serapan suspensi bakteri pada panjang gelombang $\lambda = 600$ nm berkisar antara 0,870 sampai 1,050 yang ekuivalen dengan konsentrasi bakteri $1,4152 \cdot 10^9$ sampai $1,7849 \cdot 10^9$ sel/mL. Konsentrasi bakteri ini perlu diketahui sebelum

menambahkan substrat, karena bakteri harus ditambahkan ke dalam substrat sebelum mencapai fase statis.

Konsentrasi α , α' -dipiridil dengan menggunakan 4 macam variasi konsentrasi yaitu 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mM, waktu inkubasi dan waktu penambahan inhibitor enzim dibuat tetap, yaitu 72 jam untuk waktu inkubasi dengan waktu penambahan 2 jam setelah penambahan substrat. Dari percobaan ini diperoleh konsentrasi α , α' -dipiridil yang memberikan hasil ADD yang optimum, yaitu pada konsentrasi 1,5 mM dapat menghasilkan ADD sebesar 1,85%. Setelah diperoleh hasil ADD yang optimum dicoba pada sterol dari hasil isolasi ampas tahu dengan kondisi sebagai berikut, penambahan inhibitor enzim α , α' -dipiridil dengan konsentrasi 1,5 mM, 2 jam setelah penambahan substrat dan waktu inkubasi 72 jam, diperoleh rendemen 0,48%. Hasil biotransformasi yang diperoleh sangat kecil baik dari sterol murni maupun sterol dari ampas tahu. Ini disebabkan mungkin proses biotransformasinya terjadi di dalam badan sel bakteri. Untuk biotransformasi yang terjadi di dalam sel harus diekstraksi dengan jalan merusak sel bakteri tersebut yaitu dengan jalan menggerus, pendinginan secara mendadak.

KESIMPULAN

Sterol total dari ampas tahu dapat diubah menjadi ADD dengan cara biotransformasi menggunakan

bakteri *Mycobacterium phlei* DSM 43286 dengan inhibitor enzim α , α' -dipiridil. Konsentrasi inhibitor yang menghasilkan ADD optimum dari percobaan yang telah dilakukan adalah pada konsentrasi α , α' -dipiridil 1,5 mM dengan rendemen 0,48% dari ampas tahu.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, (2000); Statistik Indonesia tahun, Katalog BPS, 1401; h 39,43.
- Arima, K, (1980). *Microbiological Production of Steroids Hormones from Cholesterol*, Prix Roussel; 27-35.
- Crueger, W. & A Crueger. (1984)., *Biotechnology, A Text Book of Industrial Microbiology*, English ed., Science Tech, Madison, p 258.
- Http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=PubMed, 8/2/2001, pk.11.51.
- Hockenul, D.J.D., (1971), *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 10, Churchill, Livingstone, Edinburgh, p 72 – 77.
- Kim, H.K. (1986); Synthesis of Steroid Oral Contraceptives Available in The United States of America, *Workshop on Biotechnology of Steroid Compound as Contraceptives and Drugs*, Jakarta, p 13 – 15.
- Kurniadi Maryati, (2003), “Optimasi Biokonversi Total sterol Limbah Tahu menjadi 1,4-Androstadien-3, 17-dion Menggunakan *Mycobacterium Phlei* DSM 43286” dalam Tesis Magister Ilmu Kefarmasian FMIPA-UI Makalah I hal 21 (inpress).
- Leuenberger, H. G. W, (1984)., Methodology dalam; Rehm, H.J., & G. Reed, (Eds) *Biotechnology*, Valvia, Verlag Chemie, Weinheim, 5 – 29.
- Martin, C.K.A, (1984)., Sterol, dalam, Kieslich K (Ed.) *Biotechnology, Biotransformations*, vol. 6a, Verlag Chemie, Weinheim, p 80 – 95.
- Martin, C.K.A., (1977)., Microbial Cleavage of Sterol Side Chains dalam; D. Perlman (Ed.) *Advances in Applied Microbiology*, vol.22, Academic Press, New York, 29 – 54.
- Novcha, M.G., F.J. Antosz, J.C. Knight, Kominek, (1978); *Biochim Biophys Acta*, Dec 22; 531 (3); p308-21.
- Thesiani Archi, *Analisis Sterol dari Fraksi Hasil Isolasi Skala Preparatif Ampas Tahu*, UI, Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Depok, Skripsi Sarjana 2001.
- Torrey, S; (1984), Microbial Synthesis, Recent Advanced, Noyes Data CO., Park Ridge, New Jersey, USA., 81-85.