

BIOKONVERSI β -SITOSTEROL MENJADI ANDROSTADIENEDIONE (ADD)**III. Konversi β -sitosterol oleh *Mycobacterium* sp. DSM 2967.**

Oleh :

T. Basuki, Reni R. Samsedin, S. Nuswantara, Lydia,
S. Saono dan P. Citoreksoko

Pendahuluan

Hasil penelitian tahun lalu (Laporan Teknik 1988-1990) menunjukkan diantara biak-biak bakteri yang diuji kemampuannya merombak β -sitosterol menjadi Androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD), biak *Mycobacterium* sp. DSM 2967 adalah yang paling kuat daya konversinya. Dalam tahun 1990-1991 perhatian difokuskan pada lanjutan pencarian metoda ekstraksi dan purifikasi sitosterol dari blotong (limbah pabrik gula) dan mempelajari lebih lanjut kemampuan biokonversi biak *Mycobacterium* DSM 2967 dalam menghasilkan ADD dari β -sitosterol. Hasil kegiatan tersebut sebagaimana disampaikan dalam laporan ini.

Bahan dan Cara Kerja**Ekstraksi dan Purifikasi sitosterol blotong**

Tiga macam metoda ekstraksi dan purifikasi sitosterol dibandingkan. Ketiga metoda tersebut adalah : 1) Metoda saponifikasi langsung (Goswani dkk., 1983), 2) Metoda Yokota (Yokota dkk., 1987) dan 3) Metoda Lubis (modifikasi metoda Srivastava, 1986). Ekstrak kasar dan sitosterol murni yang didapatkan dianalisis dengan metoda Liebermann-Burchard untuk penentuan senyawa sterol, metoda Khromatografi Lapis Tipis (TLC) untuk identifikasi senyawa sitosterol dan nilai rf-nya, serta penentuan titik leleh. Rincian metoda analisis sitosterol tersebut sebagaimana dikemukakan dalam laporan tahun lalu.

Dinamika biokonversi β -sitosterol

Untuk mengetahui waktu optimal pembentukan ADD oleh biak *Mycobacterium* sp. DSM 2967 dilakukan percobaan di dalam media Nihira dan Srivastava, masing-masing sebanyak 1 L, yang mengandung 0,5% β -sitosterol (SIGMA S-5753), pH 7,1. Setelah diinokulasi, media kemudian dieramkan selama 12 hari pada suhu 30 C di atas alat pengocok dengan kecepatan putar 250 rpm. Selanjutnya percobaan diulangi dalam tiga macam media yaitu medium Nihira, Srivastava dan medium Marsheck (Marsheck dkk., 1972). Medium diinokulasi dengan 10% (v/v) suspensi biak *Mycobacterium* sp. DSM 2967 (O.D. 0,35), kemudian dieramkan pada suhu kamar dengan aerasi 100 ml/menit. Analisis produk fermentasi dilakukan setiap 24 jam dengan menggunakan alat gas khromatografi.

Pengaruh glukosa dan corn steep liquor (CSL)

Percobaan dilakukan dalam labu erlenmeyer ukuran 250 ml. Setiap labu berisi 50 ml medium Srivastava mengandung 0.1% (w/v) β -sitosterol. Glukosa maupun CSL ditambahkan sebanyak 0,5%. Setelah diinokulasi dengan biak *Mycobacterium* sp. DSM 2967, labu erlenmeyer kemudian dieramkan di atas pengocok dengan kecepatan putar 250 rpm pada suhu kamar selama 10 hari. Produk yang dihasilkan dianalisis setiap 24 jam.

Determinasi produk biokonversi sitosterol

Determinasi produk biokonversi dilakukan secara gas khromatografi yang dilengkapi dengan detektor FID dan kolom OV-17 (3%), pada suhu 300 C (detektor) dan 275 C (oven dan injektor) serta aliran gas N_2 dengan kecepatan 20 ml/menit. Preparasi produk biokonversi dilakukan mengikuti cara Srivastava (1986), sebelum sebanyak 1 μ l produk hasil preparasi tersebut diinjeksikan ke dalam alat GC.

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi dan Purifikasi sitosterol blotong

Hasil ekstraksi dan purifikasi seperti dipertelakan dalam Tabel I. Hasil pengujian secara metoda Liebermann-Burchard menunjukkan bahwa senyawa yang dihasilkan adalah sterol. Terlihat metoda Yokota merupakan

metoda yang paling baik diantara ketiga metoda yang diuji. Selain memberikan hasil recovery yang tinggi (dari 250 gr blotong), senyawa yang didapatkan mempunyai kemurnian yang mendekati sitosterol standar, dengan titik leleh 100 C. Titik leleh sitosterol standar adalah 120 C. Bila dibandingkan dengan sterol standar, besar kemungkinan ketiga puncak senyawa yang ditemukan dari analisis GC adalah campesterol, β -sitosterol dan stigmaterol. Sitosterol standar (SIGMA S-5753) diketahui berisi dua senyawa yaitu campesterol dan β -sitosterol.

Tabel I. Hasil isolasi dan purifikasi sitosterol blotong

Analisis	YOKOTA	GOSWANI	LUBIS
Ekstrak kasar	977 mg	611 mg	820 mg
Sitosterol murni	215 mg	311 mg	233 mg
TLC, rf	0,79	0,79	0,76
Liebermann-Burchard	sterol	sterol	sterol
Titik leleh	100 C	68,6 C	72,1 C
GC	2-3 puncak	2-3 puncak	banyak puncak

Dinamika biokonversi β -sitosterol

Seperti pertelaan di Tabel II, pembentukkan ADD meningkat sejalan dengan kenaikan jumlah ekstrak kasar yang terbentuk. Jelas kelihatan pula bahwa ADD yang terbentuk dalam medium Srivastava lebih banyak bila dibandingkan dengan yang diperoleh dari medium Nihira. Hasil analisis GC memperlihatkan bahwa pembentukkan ADD dalam medium Srivastava dimulai sejak hari pertama (Gambar 1). Pengujian dalam media Nihira dan Marscheck tidak menunjukkan hasil memuaskan.

Tabel II. Pembentukan ekstrak kasar dan ADD dari β -sitosterol oleh *Mycobacterium* sp. DSM 2967

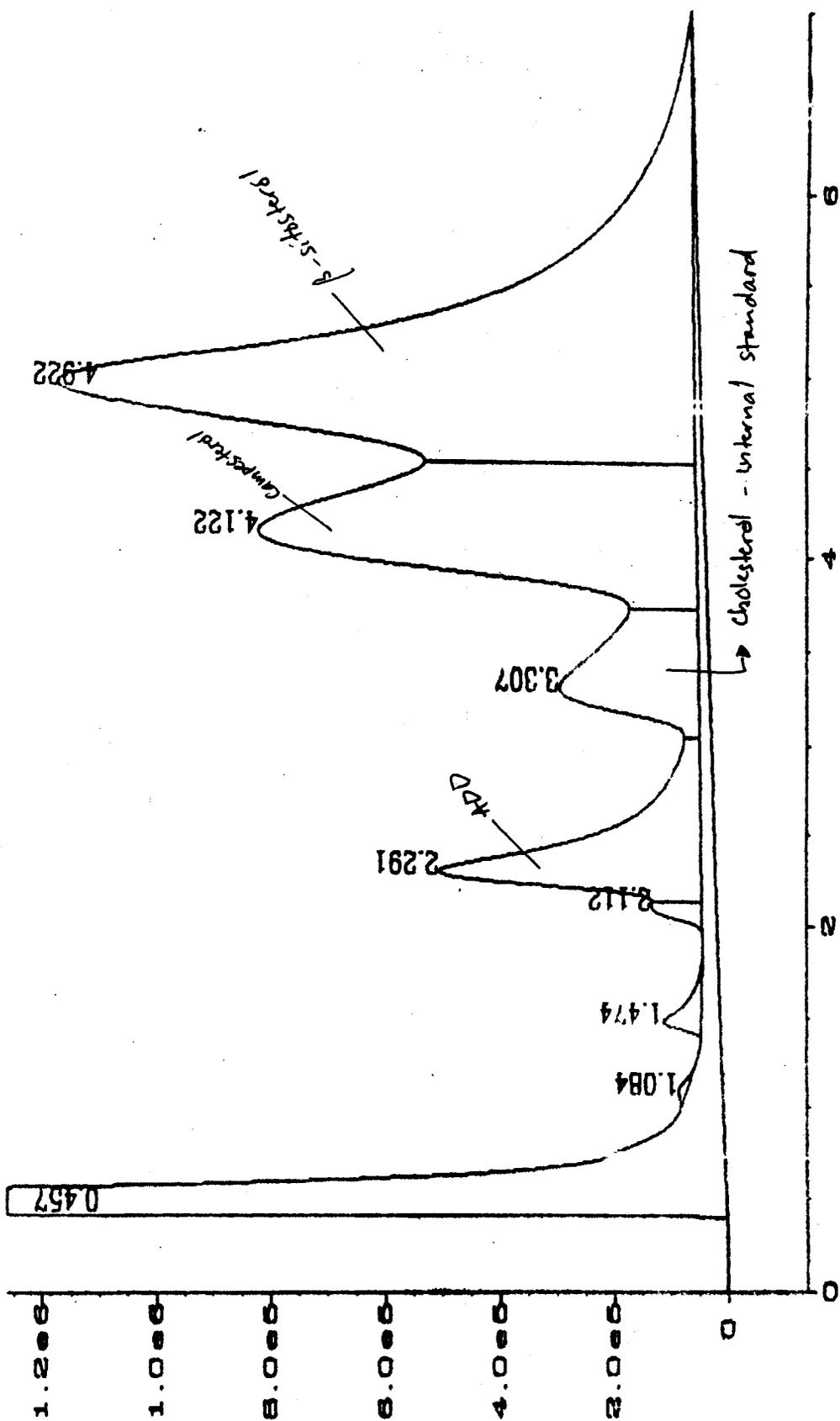
Lama Fermentasi (hari)	NIHIRA			SRIVASTAVA		
	Ekstrak kasar (gr)	ADD (mg)	ADD/E. kasar (mg/gr)	Ekstrak kasar (gr)	ADD (mg)	ADD/E. kasar (mg/gr)
6	1,341	76	56,67	1,345	86	63,94
9	1,477	80	56,16	1,378	93	67,44
12	2,746	159	57,90	2,635	185	70,21

Pengaruh glukosa dan CSL

Pengaruh glukosa dan CSL terhadap pembentukan ADD dipelajari dalam medium Srivastava yang masing-masing secara terpisah berisi 0,5% glukosa dan CSL. Seperti diperlihatkan dalam Gambar 2, pada 0,5%, penambahan glukosa tidak berpengaruh terhadap pembentukan ADD dari sitosterol tetapi berpengaruh sedang dari campesterol (Gambar 2b). Sebaliknya, penambahan 0,5% CSL menyebabkan kenaikan kelarutan sitosterol (dan campesterol) yang selanjutnya berakibat pada kenaikan jumlah ADD yang terbentuk (Gambar 2c).

Pustaka

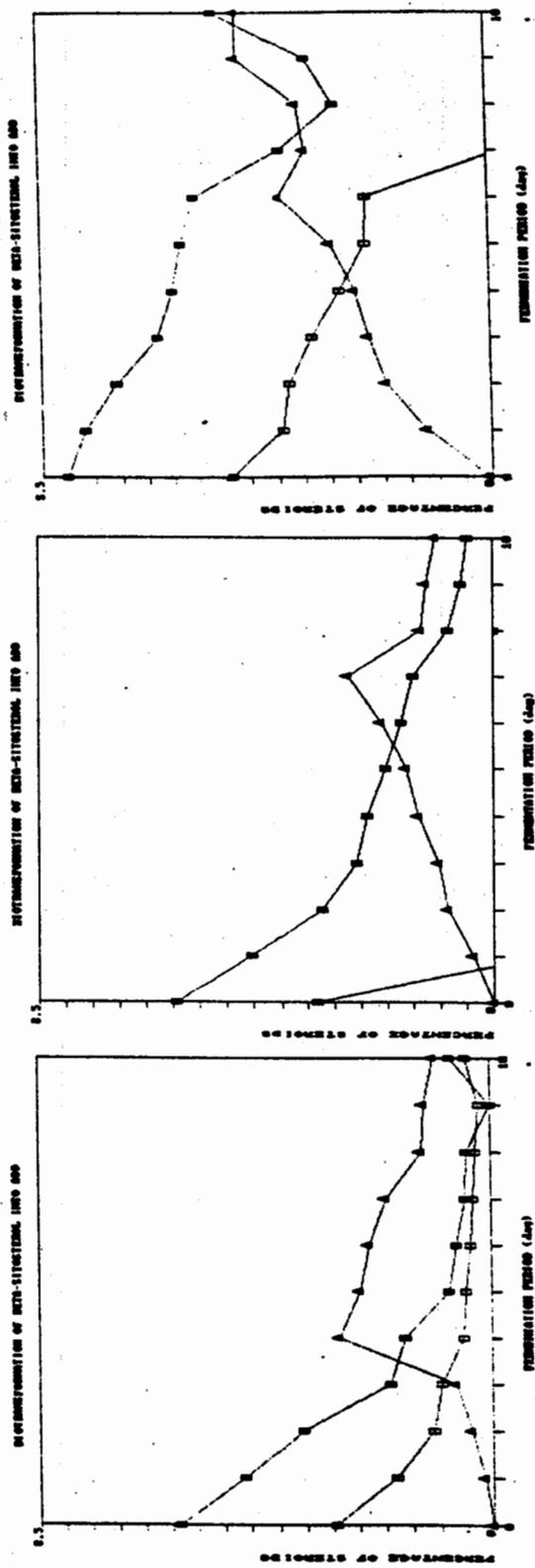
- Laporan Teknik, 1980. Proyek Penelitian Bioteknologi. Puslitbang Bioteknologi - LIPI, Bogor.
- Marsheck, W.J., Kraychy, S. & Muir, R.D. 1972. Microbial Degradation of Sterol. *Applied Microbiology* 23 (1) : 72 - 77.



β-5-Hydroxy
Cholesterol

Cholesterol - Internal Standard

FIG. 1 IN C:\HPCHEM\1\DATA\ASMP1\BPS1.D



(a) (b) (c)

Gambar 2. Biotransformasi β -sitosterol menjadi Androstadienedione (ADD) oleh *Mycobacterium* sp. DSM 2867 dalam medium Srivastava (a), medium Srivastava + 0,5% glukosa (b), dan medium Srivastava + 0,5% CSL.

■ : sitosterol, □ : campesterol, ▲ : ADD