

INDUKSI KOBALT TERHADAP BIOSINTESIS SIANOKOBALAMIN *OLEH Streptomyces olivaceus* IFO 3409

COBALT INDUCTION ON BIOSYNTHESIS OF CYANOCOBALAMIN *by Streptomyces olivaceus* IFO 3409.

Noer Kasanah dan Silvia Utami Tunjung Pratiwi

Lab. Mikrobiologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Sianokobalamin mengandung unsur kobalt sebagai bagian esensial pada strukturnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan kobalt terhadap biosintesis sianokobalamin oleh *Streptomyces olivaceus* IFO 3409.

Penelitian dilakukan dengan menumbuhkan *S. olivaceus* dalam medium fermentasi yang mengandung glukosa 1,5%, pepton 1%, ekstrak ragi 0,25%, larutan *trace mineral* dan kobalt dengan kadar bervariasi 5, 10 dan 20 ppm. Sianokobalamin diperoleh dari sel yang dipanen pada akhir fase eksponensial. Kadar sianokobalamin yang diperoleh ditetapkan dengan spektrofotometer.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sianokobalamin tidak dihasilkan dari sel tanpa penambahan kobalt dan penambahan kobalt 5 ppm. Sel menghasilkan sianokobalamin pada penambahan kobalt 10 dan 20 ppm. Berdasarkan hasil tersebut terbukti bahwa kobalt dapat menginduksi biosintesis sianokobalamin oleh *S. olivaceus* dan perlu dilakukan optimasi kadar kobalt diatas 20 ppm.

Kata kunci : sianokobalamin, kobalt, *Streptomyces olivaceus* IFO 3409

ABSTRACT

The structure of cyanocobalamin containing an essential cobalt is as part the compound. The aim of this study was to investigate the influence of cobalt on biosynthesis of cyanocobalamin done by *Streptomyces olivaceus* IFO 3409.

This experiment was carried out by cultivating *S. olivaceus* in fermentation medium contained glucose 1,5%, pepton 1%, yeast extract 0,25%, trace mineral and each of medium was added cobalt 5, 10, 20 ppm. Cyanocobalamin synthesized by the cells was harvested on the last exponential phase. The amount of cyanocobalamin was analyzed by spectrophotometer.

The results show that no cyanocobalamin was produced by *S. olivaceus* culture without kobalt or treated with 5 ppm cobalt on medium. However cyanocobalamin was produced if the culture medium was treated with 10 and 20 ppm cobalt respectively.

It was concluded that kobalt induced on cyanocobalamin biosynthesis, therefore optimization of adding kobalt might be examined on getting maximal cyanocobalamin produced by *Streptomyces olivaceus* IFO 3409.

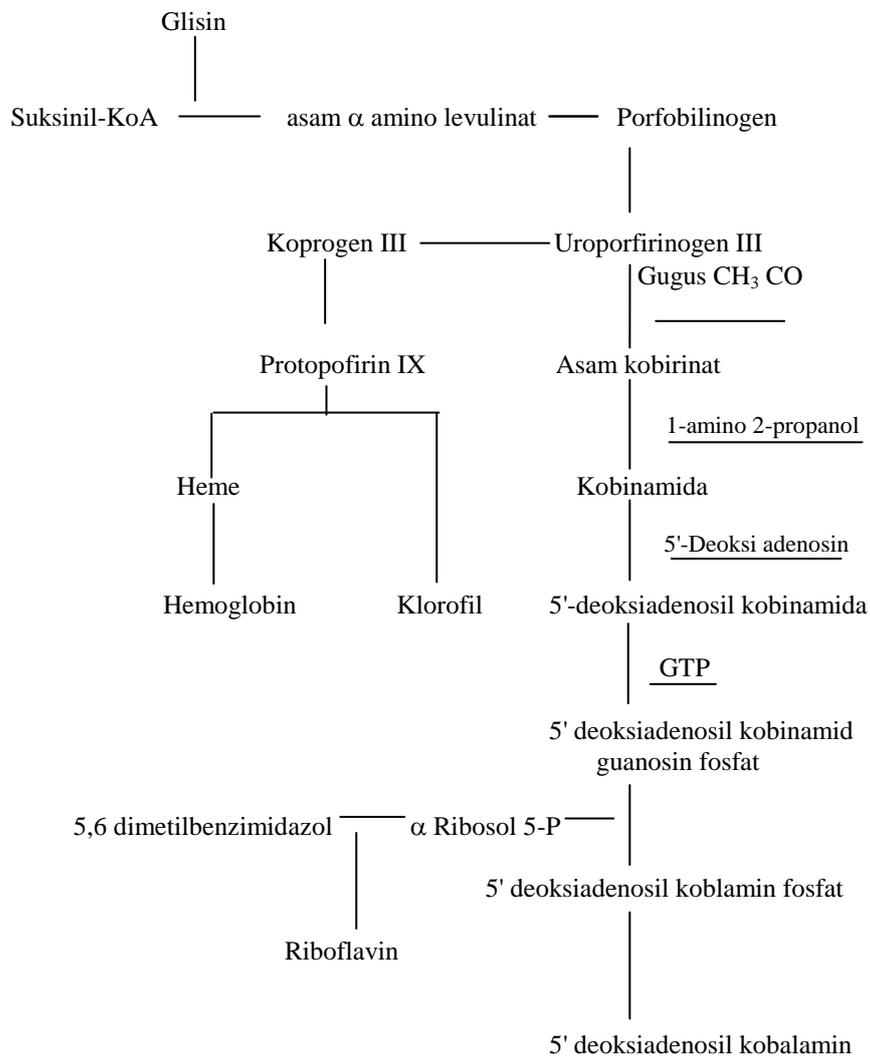
Key words: cyanocobalamin, cobalt, *Streptomyces olivaceus* IFO 3409.

PENDAHULUAN

Sianokobalamin dapat dihasilkan dari 3 macam proses yaitu : isolasi dari jaringan hewan, sintesis kimia dan fermentasi mikrobial penghasilnya. Isolasi dari jaringan hewan sukar untuk dilakukan dan menghasilkan produk dalam jumlah rendah. Sintesis kimia membutuhkan 70 langkah reaksi sehingga sangat tidak efisien. Fermentasi merupakan cara yang paling menguntungkan karena menghasilkan produk dalam

jumlah besar dan proses isolasinya mudah dilakukan (Crueger & Crueger, 1989, Kasanah, 2000). Banyak mikrobia menghasilkan sianokobalamin secara alamiah, salah satu diantaranya adalah *Streptomyces olivaceus*. Mikrobia mensintess kobalamin dalam bentuk turunannya yaitu adenosilkobalamin, metilkobalamin dan hidroks(aquo)kobalamin (Fazio & Roth, 1996). *Streptomyces olivaceus* telah diketahui menghasilkan sianokobalamin bukan turunan yang lain (Kasanah, 2000).

Biosintesis kobalamin dipelajari secara ekstensif pada *Propionil bacterium* (Gambar 1). Berdasarkan lintasan biosintesis tersebut terlihat bahwa biosintesis dipengaruhi oleh banyak faktor yaitu suksinil-KoA dan glisin membentuk asam 5 aminolevulenat (5-ALA), kobalt (Co) sebagai penyusun atom pusat dan riboflavin yang mempengaruhi ketersediaan 5,6 dimetilbenzimidazol. Kobalt merupakan bagian esensial dari struktur sianokobalamin, oleh karena itu adanya kobalt sangat mempengaruhi pembentukan sianokobalamin dalam *Streptomyces olivaceus* IFO 3409. Penambahan kobalt pada medium fermentasi dapat menginduksi produksi sianokobalamin (Madigan dkk, 1997).



Gambar 1. Jalur biosintesis vitamin B₁₂ disadur dari (Crueger & Crueger, 1989)

Uroporfirinogen II, akan berubah menjadi koprogen III, tetapi adanya Cobalt dapat berubah menjadi asam korbirin, asam ini akan meneruskan jalur pembentukan sianokobalamin. Tetapi bila tak ada Co, atau ada tetapi tak mencukupi jumlahnya, asam korbirin tidak terjadi. Bahkan senyawa antar zat koprogen III dapat menjadi hemoglobin bila ada ion ferro, dan menjadi klorofil bila ada ion Mg (Gambar 1).

Atas dasar itu maka penelitian ini untuk mengetahui seberapa jauh pengaruh kobalt dalam medium yang diperlukan untuk mensintesis sianokobalamin walaupun belum diketahui optimalnya.

METODOLOGI

Bahan

Streptomyces olivaceus IFO 3409, Kobalt nitrat (E. Merck), Glukosa (E. Merck), Pepton (Difco), Ekstrak ragi (Difco), Triptic Soya Broth atau TSB (Oxoid), Sianokobaltamin (E. Merck).

Alat

Shaker (Thermolyne), Sentrifuge (Hettich Universal), Spektrofotometer (Gynesis 5)

Cara Penelitian

Pemeliharaan dan penanaman *S. olivaceus* IFO 3409.

S. olivaceus IFO 3409 dipelihara dalam agar miring mengandung TSB 30g ekstrak ragi 2g dan agar 20g per liter (pH: 7). Jika akan digunakan spora dipindahkan ke medium cair yang mengandung TSB 30 g per liter.

Fermentasi

Medium fermentasi untuk produksi sianokobalamin berisi glukosa 15 g, pepton 10 g, ekstrak ragi 2,5 g dan trace mineral (FeSO_4 1 ppm, ZnSO_4 1 ppm dan MnCl_2 5 ppm). Fermentasi dilakukan pada suhu kamar dengan kecepatan penggojog 150 rpm. Untuk penentuan profil pertumbuhan sel dilakukan pengambilan contoh kultur setiap hari, dan tentukan produksi sianokobalamin fermentasi dilakukan sampai akhir fase eksponensial pertumbuhan mikrobia.

Profil pertumbuhan sel

Penentuan profil pertumbuhan sel dilakukan dengan mengukur berat kering sel. Profil ini digunakan sebagai dasar penentuan fase eksponensial pertumbuhan mikrobia.

Analisis produksi sianokobalamin

Sel yang diperoleh dari fermentasi dipanen pada waktu fase eksponensial akhir. Sianokobalamin diperoleh dari sel dengan cara pemecahan sel dan pemisahan menurut Kasanah (2000). Analisis dilakukan terhadap filtrat hasil pemecahan sel. Analisis kualitatif dilakukan dengan spektrofotometer untuk melihat spektra khas sianokobalamin (puncak pada λ 278, 361 dan 550 ± 1 nm) dan analisis kuantitatif dilakukan dengan spektrofotometer pada λ 361 nm dengan kurva baku sianokobalamin standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil pertumbuhan sel

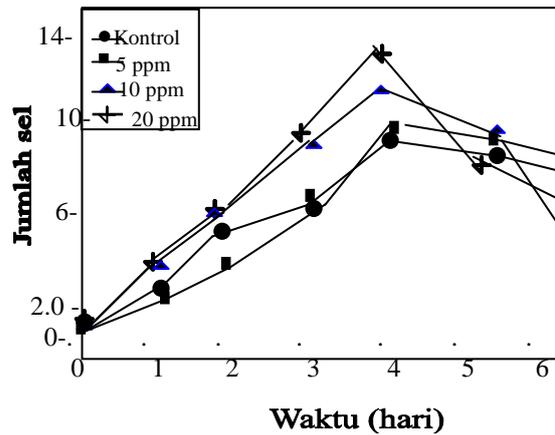
Profil pertumbuhan sel kontrol dan masing-masing perlakuan seperti Gambar 2. Gambar tersebut terlihat bahwa pola pertumbuhan sel tidak berubah. Pada semua perlakuan sel mencapai akhir fase eksponensial pada hari keempat fermentasi. Berdasarkan pola pertumbuhan maka untuk memanen sianokobalamin sel dipanen pada hari keempat fermentasi. Hal tersebut berdasarkan pertimbangan bahwa sianokobalamin merupakan metabolit primer yang diproduksi selama fase eksponensial pertumbuhan mikrobia. Pada akhir fase eksponensial akan terjadi akumulasi sianokobalamin. Jika pemanenan dilakukan terlambat, ada kemungkinan sianokobalamin digunakan oleh mikrobia untuk pembentukan pigmen.

Pertumbuhan tidak hanya dianalisis berdasarkan pola pertumbuhan saja tetapi juga ditentukan beberapa parameter pertumbuhan yaitu μ (kecepatan pertumbuhan spesifik) dan t_d (waktu penggandaan massa

sel). Tabel I menunjukkan harga μ dan t_d masing-masing perlakuan μ dan t_d dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\mu = \ln x_t - \ln x_0 / t \text{ (Madigan dkk, 1997).}$$

x_t = berat sel purata pada saat t (hari)
 x_0 = berat sel pada saat awal eksponensial
 $t_d = \ln 2 / \mu$, satuan ppm adalah berat penambahan garam kobalt yang dihitung sebagai Co.



Gambar 2. Profil pertumbuhan sel *S. olivaceus* IFO 3409

Tabel I. Harga μ dan t_d pertumbuhan sel *S. olivaceus* IFO 3409

Perlakuan	μ (jam ⁻¹)	t_d (jam)
Kontrol	0,020	35
Kobalt 5 ppm	0,022	32
Kobalt 10 ppm	0,020	35
Kobalt 20 ppm	0,021	33

Harga μ dan t_d pada masing-masing perlakuan menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Hal ini berarti penambahan kobalt tidak mempengaruhi pertumbuhan mikrobia.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol dan kobalt 5 ppm tidak menunjukkan adanya sianokobalamin. Hal ini menunjukkan pada keadaan tanpa kobalt, biosintesis sianokobalamin tidak terjadi. Pada perlakuan kobalt kadar 5 ppm kemungkinan yang terjadi adalah sianokobalamin yang dihasilkan terlalu sedikit sehingga tidak terdeteksi dengan penetapan secara spektrofotometri. Kemungkinan yang lain adalah kadar kobalt yang terlalu rendah tidak cukup untuk menginduksi sistem enzim yang terlibat dalam pemasukan kobalt sehingga tidak terbentuk sianokobalamin (Fazio & Roth, 1997, Bykhovsky dkk, 1997). Perlakuan dengan penambahan kobalt sebanyak 10 dan 20 ppm menunjukkan peningkatan kadar sianokobalamin yang dihasilkan oleh *S. olivaceus*. Peningkatan kadar kobalt diatas 20 ppm perlu dilakukan untuk mengetahui produk maksimal yang dihasilkan.

Produksi sianokobalaminTabel II. Produksi sianokobalamin hasil fermentasi *S. olivaceus* IFO 3409

Perlakuan dengan penam bahan garam kobalt	Berat sel kering (mg.ml ⁻¹)	Kadar sianokobaltamin (ug.ml ⁻¹)	Produksi sianokobaltamin (ug.mg ⁻¹ sel ⁻¹)
Kontrol	109,67	-	-
	102,50	-	-
	106,13	-	-
Penambahan 5 ppm	135,33	-	-
	133,33	-	-
	130,13	-	-
Penambahan 10 ppm	181,40	7,42	0,0406 ± 0,00046
	170,47	7,14	
	172,53	7,27	
Penambahan 20 ppm	186,87	12,85	0,070 ± 0,0038
	189,67	14,37	
	181,60	12,16	

Berat sel : Berat sel hasil fermentasi yang dilisis, ditetapkan dengan berat kering sel

Kadar : Kadar sianokobalamin total hasil fermentasi

Produksi : Produksi sianokobalamin = Kadar / berat sel

KESIMPULAN

Kobalt dapat menginduksi biosintesis sianokobalamin pada kultur fermentasi *Streptomyces olivaceus* IFO 3409. Peningkatan produksi sianokobalamin dicapai pada pemberian kobalt dalam medium pertumbuhan pada kadar 10 dan 20 ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian UGM yang telah membiayai penelitian melalui dana Anggaran Rutin M..A. 5250 tahun 1998.

DAFTAR PUSTAKA

- Bykhovsky, V.Y., Demain, A.L., & Zaitseva, N.I., 1997, The Crucial Contribution of Starved Resting Cell to Elucidation of the Pathway of Vit B -12 Biosynthesis, *Crit. Rev. Biotech*, 17:17-28
- Crueger, W & Crueger, A., 1989, *Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology*, Science Tech., Inc. 187-189
- Fazzio, F.G & Roth, J.R., 1996, Evidence that Cys G Protein Catalyses the First Reaction Specific to B-12 Synthesis in Salmonella Typhimurium, Insertion of Cobalt, *J. Bacteriol*, 178, 6952-6954
- Kasanah, N., 2000, Isolasi Sianokobalamin dari Kultur Fermentasi *Streptomyces olivaceus* IFO 3409., *Media Gama 2* (1)
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1997, *Brock Biology of Microorganism*, Prentice Hall, 447-448