

## Mutagenesis *Rhizopus stolonifer* UICC 137 dengan etil metan sulfonat untuk meningkatkan produksi biotransformasi progesteron menjadi 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron

oleh

Usman Sumo F. Tambunan dan Trismillah<sup>1</sup>

### ABSTRAK

Penelitian untuk mengembangkan galur *Rhizopus stolonifer* UICC 137 dengan mutagen etil metan sulfonat telah dilakukan dengan menggunakan berbagai variasi dosis dan waktu paparan mutagen yang berbeda. Seleksi mutan secara acak dilakukan terhadap biakan dengan persen kesintasan terkecil. Mutan Gt20 dan Gt40 menunjukkan aktivitas 11 $\alpha$ -hidroksilase lebih besar dibandingkan dengan galur inangnya. Mutan Gt20 dan Gt40 stabil hingga generasi keempat baik pada penyimpanan dalam ruangan dingin (2-3 °C, setiap generasi 25 hari) maupun pada penyimpanan dalam inkubator (30°C, setiap generasi 10 hari).

Kata Kunci : Mutagenesis, *Rhizopus stolonifer*, Etil metan sulfonat

We described here an ethyl methane sulphonate mutagenesis of *Rhizopus stolonifer* UICC 137 for biotransforming progesterone to 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. Mutagenesis was carried out by using various doses and treatment intervals. Randomized screening method was performed to select the mutants, then, the mutants were tested for 11 $\alpha$ -hydroxylase activities. Mutants of Gt20 and Gt40 gave relatively higher biotransformation yield compared to parents strain and both mutants were stable up to fourth generation when they maintained in a cool chamber (2-3 °C, 25 days each generation) and in an incubator (30°C, 10 days each generation).

Key Words : Mutagenesis, *Rhizopus stolonifer*, Ethyl methane sulphonate

### I. PENDAHULUAN

Beberapa senyawa steroid yang aktif farmakologik mempunyai atom oksigen terikat pada atom karbon posisi sebelas (C-11), misalnya: kortison, kortikosteron, prednison, dan prednisolon. Senyawa-senyawa tersebut dapat diproduksi melalui sintesis partial dari bahan dasar progesteron maupun 11-deoksikortisol (Maddox : 1981; Talboys : 1985; Zalkelj-Mavric: 1987). Kesulitan utama sintesis kimia senyawa steroid yang mempunyai atom oksigen terikat pada C-11 adalah bagaimana memasukkan atom oksigen posisi C-11 dengan rendemen yang cukup baik. Hal tersebut dapat diatasi dengan menggunakan mikroba atau komponen selnya berupa enzim yang mampu mengkatalisis reaksi secara spesifik (Mahato : 1985)

Biotransformasi secara luas telah diaplikasikan dalam produksi komersial steroid. Penelitian biotransformasi progesteron menjadi 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron telah dan terus dilakukan oleh peneliti-peneliti dari negara maju dengan menggunakan berbagai jenis media. Selain itu, dilakukan pula penelitian biotransformasi dengan menggunakan sel yang diimobilisasi (Houng : 1994).

Penelitian terdahulu membuktikan bahwa kapang lokal *Rhizopus stolonifer* UICC 137 dapat mentransformasi progesteron menjadi 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron (Tambunan: 1996), tetapi rendemennya relatif rendah. Penelitian yang sama tentang pengembangan biotransformasi progesteron dengan menggunakan media tetes juga telah dilakukan (Tambunan, 1997). Pengembangan galur mikroba dilaporkan pula dapat dilakukan dengan cara mutasi dan rekayasa genetik

<sup>1</sup> Jurusan Kimia FMIPA Universitas Indonesia

(Mavric : 1987; Samantha :1978). Pengembangan galur *Rhizopus stolonifer* UICC 137 dengan Iradiasi Sinar  $\gamma$ -Co 60 untuk biotransformasi progesteron menjadi  $11\alpha$ -hidroksiprogesteron telah dilakukan dan diperoleh beberapa mutan yang memberikan hasil biotransformasi lebih tinggi jika dibandingkan dengan galur inangnya (Tambunan : 1997).

Penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan galur *Rhizopus stolonifer* UICC 137 dengan mutasi kimia etil metan sulfonat (EMS). Mutan yang diperoleh dapat mentransformasi progesteron menjadi  $11\alpha$ -hidroksiprogesteron lebih baik dari galur inangnya. Metode seleksi mutan yang digunakan adalah metode acak, yaitu menseleksi secara acak kapang hasil mutagenesis yang berasal dari dosis EMS yang memberikan persen sintas yang terkecil. Proses biotransformasi mengikuti kondisi yang sudah dilakukan peneliti terdahulu, yaitu : pH awal 5 ; suhu  $30^{\circ}\text{C}$ ; laju pengadukan 100 rpm ; waktu penambahan substrat 14 jam ditambah waktu inkubasi selama 8 jam, dan konsentrasi awal substrat progesteron 1 g/L (Tambunan : 1996).

## II. BAHAN DAN METODE

*Rhizopus stolonifer* UICC 137 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA-Universitas Indonesia. Progesteron dan  $11\alpha$ -hidroksiprogesteron berasal dari Sigma. Media padat Agar Dekstrosa Kentang (PDA) diperoleh dari Merck, sedangkan bahan media cair ekstrak ragi dan glukosa diperoleh dari Oxoid. Bahan kimia lain seperti  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaOH, HCl,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , etil asetat, metanol, aseton, dan kloroform dengan kualitas p.a. diperoleh dari Merck. Mutagen etil metan sulfonat (EMS) diperoleh dari Merck.

Peralatan gelas yang dipakai adalah yang umum digunakan di Laboratorium Biokimia

dan Mikrobiologi. Alat lain yang digunakan adalah Autoklaf model Webeco H 7586, pH meter TOA, shaker inkubator B. Braun RS-1, Universal shaker model OSK 6445 Ogawa seiki Co. L td., Inkubator model OSK 6306 Ogawa Seiki Co.Ltd., HPLC Shimadzu SPD-6AV.

### Media

Media cair yang digunakan merupakan modifikasi dari media yang digunakan Hanish (Hanish : 1980 ; Tambunan : 1997). Komposisi media adalah : glukosa (25 g/L), ekstrak ragi (20 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,78 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,026 g/L), dan larutan unsur runut (0,1 mL/L).

Glukosa dilarutkan dalam air suling sampai dengan 10 % volume akhir media dan pH larutan diatur sampai 3. Selanjutnya larutan disterilisasi dalam autoklaf pada 1,1 kg F/cm<sup>2</sup>,  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit (larutan 1). Ekstrak ragi, larutan unsur runut dan komponen lain dilarutkan dalam air suling sampai 90% volume akhir media, kemudian pH larutan diatur sampai 5 dengan penambahan asam fosfat. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada 1,1 kg F/cm<sup>2</sup>,  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit (larutan 2). Larutan 1 dan larutan 2 dicampur beberapa saat sebelum dipakai.

### Inokulum dan Aktivasi kapang

Pembuatan inokulum dan aktivasi kapang mengikuti prosedur yang sudah dilakukan pada penelitian terdahulu (Tambunan : 1997).

### Mutasi

Ke dalam tiga tabung reaksi yang berisi 3 mL media cair, secara aseptis diinokulasi dengan masing-masing 1 mL inokulum. Kemudian campuran diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  dengan laju pengadukan 100 rpm selama 4,5 jam. Selanjutnya, ke dalam masing-masing biakan ditambahkan mutagen EMS yang bervariasi (0; 6 ; 12; 18; 24; 30; 36; 48; 60; 72; 84; dan

$96 \times 10^3$  ppm) dan dikocok selama 1 menit dengan vortex. Campuran diinkubasi lebih lanjut pada suhu  $30^\circ\text{C}$  dengan waktu inkubasi yang bervariasi (3 ; 4; dan 5 jam). Masing-masing campuran dicuci dengan larutan garam fisiologis NaCl 0,85% dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Jumlah kapang yang hidup setelah mutasi ditentukan dengan metode hitungan cawan.

Sebanyak 1 ose spora dan miselia dari agar miring (dosis EMS yang memberikan persen sintas terkecil) ditambahkan ke dalam 10 mL larutan garam fisiologis NaCl 0,85%. Setelah dilakukan pengenceran  $10^3$  sampai  $10^5$ , sebanyak 0,1 mL campuran spora dan miselia ditanam pada cawan petri dan selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Kemudian koloni-koloni yang tumbuh secara terpisah diambil secara acak untuk ditanam pada media agar miring dan diuji aktivitas biotransformasinya (Tambunan: 1997).

#### Uji stabilitas mutan

Uji stabilitas dilakukan pada dua kondisi, yaitu kondisi penyimpanan pada suhu  $30^\circ\text{C}$  (inkubator) dan pada suhu  $2-3^\circ\text{C}$  (lemari pendingin). Inokulum mutan ditanam pada 10 mL media padat dalam Erlenmeyer 125 mL. Penyimpanan pada inkubator dilakukan sampai generasi ketujuh dengan waktu inkubasi 10 hari sejak galur ditanam. Untuk penyimpanan pada lemari pendingin dilakukan sampai generasi keempat dengan waktu inkubasi 25 hari sejak galur ditanam dan disimpan pada lemari pendingin. Setelah penyimpanan, selanjutnya dilakukan uji biotransformasi progesteron menjadi  $11\alpha$ -hidroksiprogesteron dengan mengikuti metode terdahulu (Tambunan: 1997). Hasil biotransformasi dianalisis dengan HPLC menggunakan kolom Shimpack CLC-C8 dan fasa gerak metanol - air (4:1); laju aliran 1 mL/menit; Detektor UV pada panjang gelombang 250 nm.

#### Proses Biotransformasi

Ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi media cair biotransformasi pH 5, dimasukkan 2 ml inokulum mutan. Selanjutnya biakan tersebut diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu  $30^\circ\text{C}$ , 100 rpm selama 14 jam. Secara aseptis ke dalam campuran biotransformasi dimasukkan 0,3 mL larutan progesteron (68 g/L) dan inkubasi dilanjutkan kembali selama 8 jam. Kemudian dilakukan ekstraksi dan analisis dengan mengikuti metode yang sudah dilakukan sebelumnya (Tambunan : 1997).

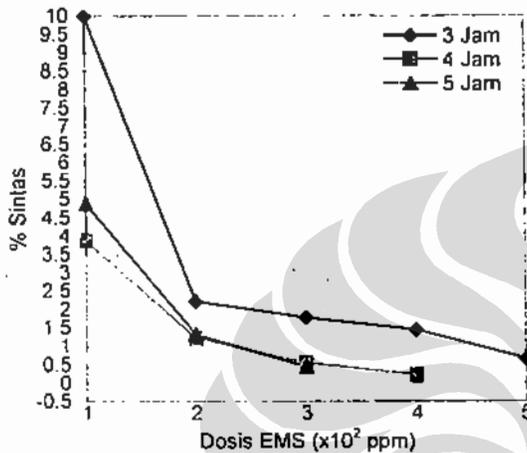
### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses mutagenesis dilakukan dengan menggunakan inokulum dari kultur kapang yang sudah diaktifkan/diinduksi dan memiliki kepadatan  $(5,50 \pm 0,25) \times 10^6$  spora/mL. Dasar pikiran melakukan mutasi pada kultur yang sudah diaktifkan/diinduksi adalah agar gen yang mengekspresikan pembentukan enzim  $11\alpha$ -hidroksilase dapat aktif, sehingga kemungkinan terjadinya mutasi dapat lebih besar (Aharonowitz: 1981). Penambahan metagen EMS dilakukan pada fase eksponensial dengan suatu asumsi bahwa pada fase tersebut mutasi yang diinginkan berlangsung secara maksimal (Andreoni : 1995).

#### Jumlah kapang hasil mutasi

Pengaruh dosis EMS terhadap persen sintas *Rhizopus stolonifer* UICC 137 dengan waktu inkubasi 3, 4 dan 5 jam disajikan pada Gambar 1. Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa *Rhizopus stolonifer* UICC 137 tidak dapat tumbuh pada dosis EMS  $30 \times 10^3$  ppm dengan waktu inkubasi 3 jam. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa persen sintas terkecil sebesar 0,22 % diperoleh pada dosis EMS  $18 \times 10^3$  ppm dan waktu inkubasi selama 4 jam. Dosis EMS  $18 \times 10^3$  ppm dengan waktu inkubasi 4 jam tersebut digunakan untuk penelitian lebih lanjut dengan alasan bahwa pada umumnya mutan-

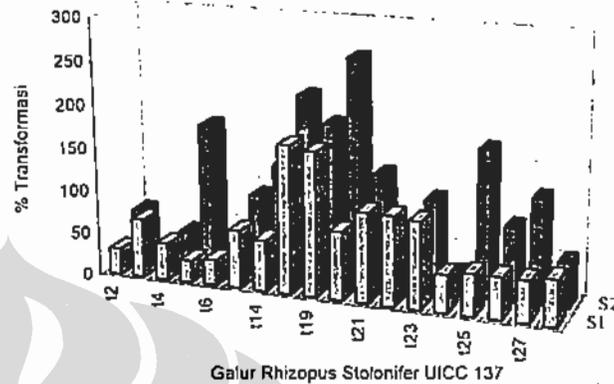
mutan akan lebih banyak ditemukan di antara koloni yang dapat hidup pada dosis mutagen yang memberikan % kesintasan terkecil (Hopwood: 1970).



Gambar 1. Pengaruh dosis EMS terhadap persentase sintas *Rhizopus stolonifer* UICC 137 berdasarkan jumlah koloni awal. Waktu inkubasi setelah penambahan EMS 3 jam, 4 jam, dan 5 jam. Volume kerja 4 mL. pH awal 5, dan suhu inkubasi 30°C

**Isolasi mutan**

Mutan dari beberapa isolat *Rhizopus stolonifer* UICC 137 diisolasi dengan menggunakan metode pengenceran dan penyebaran di atas cawan petri. Kemudian isolasi dilanjutkan dengan metode coretan di atas cawan petri. Hasil isolasi dari beberapa koloni *Rhizopus stolonifer* UICC 137 ada 18 isolat. Isolat-isolat tersebut digunakan pada biotransformasi yang tujuannya untuk memilih isolat yang menghasilkan persen transformasi tertinggi. Pada penelitian ini dilakukan uji biotransformasi dengan dan tanpa melakukan induksi terlebih dahulu. Persen transformasi progesteron menjadi 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron oleh 18 isolat *Rhizopus stolonifer* UICC 137 disajikan pada Gambar 2. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa secara keseluruhan persen transformasi beberapa isolat *Rhizopus stolonifer* UICC 137, sebelum diinduksi lebih rendah dari pada sesudah diinduksi.

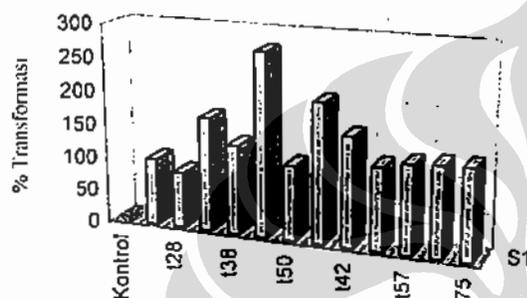


Gambar 2. Persen transformasi progesteron menjadi 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron oleh 18 isolat hasil seleksi mutagenesis *Rhizopus stolonifer* UICC 137. S1 isolat sebelum diinduksi dan S2 isolat sesudah diinduksi.

Ada tiga galur yang menunjukkan aktivitas lebih tinggi dari seluruh isolat yang diuji, termasuk kontrol. Rendemen tertinggi ditunjukkan oleh *Rhizopus stolonifer* UICC 137/t20, yaitu: 16,67% atau 261,28 % nisbah terhadap kontrol. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata dari dua metode biotransformasi yang dipakai, dan demikian pula terdapat perbedaan yang nyata antara beberapa isolat yang diuji. Hal ini menunjukkan bahwa ada kemungkinan kualitas masing-masing isolat tidak sama.

Rendemen yang dihasilkan pada mutagenesis pertama masih rendah, oleh karena itu dilakukan pula mutagenesis kedua dengan menggunakan metode kimia yang sama. Untuk penyederhanaan nomenklatur, isolat mutan dari *Rhizopus stolonifer* UICC 137 selanjutnya disebut Gt1, Gt2 dan seterusnya. Mutagenesis kedua dilakukan terhadap Gt5, Gt14, Gt18, Gt19, Gt20 dan Gt25. Dari mutagenesis kedua ini diisolasi 12 isolat yang selanjutnya diuji kemampuannya mengkatalisis bio transformasi progesteron menjadi 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron. Data hasil analisis kemampuan mengkatalisis biotransformasi dari 12 isolat disajikan pada Gambar 3. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa rendemen hasil mutagenesis kedua

sangat bervariasi. Rendemen hasil mutagenesis pertama. Pada mutagenesis kedua, hanya dua isolat mutan yang memberikan rendemen lebih tinggi dari pada isolat mutan hasil mutagenesis pertama, yaitu Gt40 dan Gt15 masing-masing 273,9% dan 208,4% nisbah terhadap kontrol.



Galur *Rhizopus stolonifer* UICC 137

Gambar 3. Persen transformasi progesteron menjadi 11α-hidroksiprogesteron oleh 12 isolat hasil seleksi mutagenesis *Rhizopus stolonifer* UICC 137

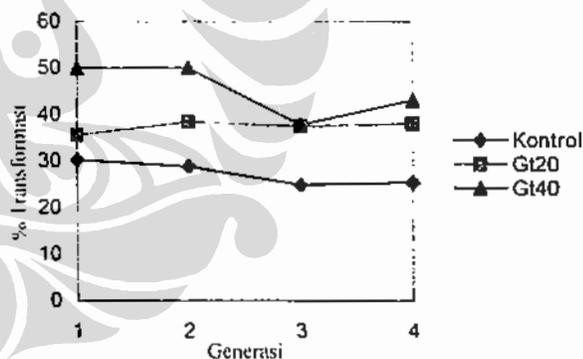
### Uji stabilitas

Ada beberapa ciri yang harus dimiliki oleh galur mikroba unggul, salah satu diantaranya adalah galur tersebut harus stabil secara genetik. Stabilitas galur dikontrol secara genetik dan dapat dimodifikasi dengan kontrol khusus, misalnya: faktor lingkungan dan intensitas cahaya matahari (Smith, 1993). Pada penelitian ini dilakukan uji stabilitas terhadap isolat mutan *Rhizopus stolonifer* UICC 137, yaitu Gt20, Gt40 dan kontrol. Masing-masing mutan disimpan di dua tempat, yaitu di ruangan dingin (cool chamber, suhu 2-3°C) dan di inkubator (suhu 30°C).

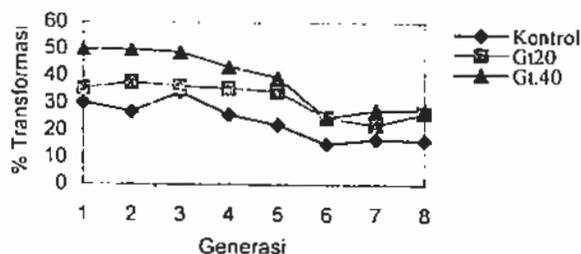
Pada ruangan dingin, isolat dan kontrol yang diuji relatif stabil sampai generasi keempat. Khusus mutan Gt40, pada generasi ketiga mengalami penurunan produk dengan rendemen sebesar 37,83% atau 151,87% nisbah terhadap kontrol, namun mengalami kenaikan lagi pada generasi keempat dengan rendemen sebesar 43,08% atau 169,87% nisbah terhadap kontrol. Penurunan produk

pada generasi ketiga mungkin disebabkan oleh adanya perbaikan dalam sel itu sendiri. Sel mempunyai kemampuan untuk memperbaiki DNA yang rusak atau mengembalikan DNA ke keadaan semula seperti pada keadaan sebelum terjadi mutasi (Judoamidjojo, 1992).

Uji stabilitas di dalam inkubator menunjukkan bahwa mutan Gt20 dan Gt40 relatif stabil dibanding dengan kontrol. Namun jika dianalisis lebih lanjut terlihat bahwa dari mulai generasi keempat sudah ada kecenderungan terjadinya penurunan aktivitas 11α-hidroksilasinya dengan mengacu pada data persen transformasi progesteron menjadi 11α-hidroksiprogesteron. Penurunan aktivitas mutan berkaitan dengan kemungkinan adanya perbaikan di dalam sel. Pada Gambar 4 dan Gambar 5 disajikan grafik hubungan generasi terhadap persen transformasi di dalam inkubator dan di dalam cool chamber.



Gambar 4. Hubungan antara persen transformasi dengan generasi dari mutan Gt20 dan Gt40, serta kontrol, disimpan dalam ruangan dingin (2-3°C), setiap generasi disimpan 25 hari.



Gambar 5. Hubungan antara persen transformasi dengan generasi dari mutan Gt20 dan Gt40, serta kontrol, disimpan dalam inkubator (30°C), setiap generasi disimpan 10 hari.

#### IV. KESIMPULAN

Mutagenesis *Rhizopus stolonifer* UICC 137 dengan etil metan sulfonat menghasilkan beberapa mutan dan dua diantaranya, yaitu mutan Gt20 dan Gt40 menunjukkan aktivitas 11 $\alpha$ -hidroksilase yang cukup baik dibandingkan dengan galur inangnya. Gt20 dan Gt40 dapat mentransformasi progesteron menjadi 11 $\alpha$ -hidroksiprogesteron dengan masing-masing rendemen 261,28% dan 273,9% nisbah terhadap kontrol.

Mutan Gt20 dan Gt40 stabil sampai generasi keempat jika disimpan pada ruangan dingin (2-3°C, setiap generasi 25 hari) dan relatif stabil sampai generasi keempat jika disimpan pada inkubator (30°C, setiap generasi 10 hari).

#### Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada Prof. Dr. Indrawati Gandjar atas dukungannya sehingga penelitian ini dapat terlaksana dan kepada Menteri P dan K atas dukungan dana yang berasal dari Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat Nomor : 006/P21PT/DPPM/96/PHB III/3/V/1996 tertanggal 5 Mei 1996.

#### V. DAFTAR PUSTAKA

- Aharonowitz, Y., and Cohen, G. (1981). The Microbial Production Of Pharmaceutical, *Sci. Am.* 245 : 106-118.
- Andreoni, V., Bernasconi, S., and Bestetti, G. (1995). Biotransformation Of Ferulic Acid And Related Compound By Mutant Strains Of *Pseudomonas fluorescens*, *Appl. Microbial Biotechnology* 42 : 830-835.
- Hopwood, D.A. (1970). *Methods in Microbiology*, Academic Press, London.
- Houng, J.Y., Chiang, W.P., and Chen, K.C. (1994). 11 $\alpha$ -hydroxylation of Progesterone In Biphasic Media Using Alginate Entrapped *Aspergillus ochraceus* gel beads coated with polyurea, *Enzyme Microb. Technology* 16 : 485-491.
- Maddox, I.S., Dunnill, P., and Lilly, M.D. (1981). Use Of Immobilized Cells Of *Rhizopus nigricans* For The 11 $\alpha$ -hydroxylation Of Progesterone, *Biotech. and Bioeng.* 23 : 345-354.
- Mahato, S.B., Banerjee, S. (1985). Steroid Transformation By microorganisms-II, *Phytochemistry* 24(7) : 1403-1421.
- Mavric, M.Z., and Belic, L. (1987). Hydroxylation of Steroids With 11 $\alpha$ -hydroxylase of *Rhizopus nigricans*, *J. Steroid Biochem.* 28 : 197-201.
- Samantha, T.B., Roy, N., and Chattopadhyay, S. (1978). An Improved 11 $\alpha$ -hydroxylation Of Progesterone By *Aspergillus ochraceus* TS, *Biochem J.* 176 : 593-594.
- Talboys, B.L., Dunnill, P. (1985). Effect of Shear On Membrane associated Enzymes: Studies Of The release Of Intracellular Protein And The Progesterone 11 $\alpha$ -hydroxylase Complex From *Rhizopus nigricans*, *Biotech. and Bioeng.* 27 : 1730-1734.
- Tambunan, U.S.F., and Nuki, B.N. (1996). Biotransformation of Progesterone By using *Rhizopus stolonifer* UICC 137 and *Aspergillus niger*, *Proceeding : 10th International Biotechnology Symposium, Australia*.
- Tambunan, U.S.F., and Wijaya, N.H. (1997). Pengembangan Galur *Rhizopus stolonifer* UICC 137 Dengan Iradiasi Sinar  $\gamma$ -Co60, *Sains Indonesia* 2(1) : 13-21.
- Tambunan, U.S.F., Juwati, K., and Andriyani, S. (1997). Biotransformasi Progesteron

Oleh *Rhizopus stolonifer* PDN-IJ Yang Ditumbuhkan Pada Media Tetes, *Jurnal Penelitian Universitas Indonesia*, 1 : 16-23.

Zalkelj-Mavric, M., and Belic. I. (1987). Hydroxylation Of Steroids With  $11\alpha$ -hydroxylase Of *Rhizopus nigricans*, *J. Steroid Biochem.* 28 : 197-201.

