



Biotransformasi α -Pinena Menggunakan *Bacillus subtilis*

Aris Tri Susanto[✉], Nanik Wijayati, dan Harjono

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang
Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati Telp. (024)8508112 Semarang 50229

Info Artikel

Diterima Juli 2017

Disetujui Agustus 2017

Dipublikasikan November
2017

Keywords:

α -pinena
biotransformasi
Bacillus subtilis

Abstrak

Reaksi biotransformasi α -pinena oleh mikroorganisme menghasilkan beberapa senyawa yang berharga. Banyak mikroorganisme yang dapat digunakan untuk mengonversi α -pinena secara spesifik, salah satunya adalah *Bacillus subtilis*. Kultur *Bacillus subtilis* diuji aktivitasnya dalam mengonversi α -pinena menjadi senyawa turunannya. Uji aktivitas *Bacillus subtilis* berdasarkan sumber karbon utama dan lama waktu inkubasi. Sumber karbon utama yang digunakan pada medium biakan adalah sorbitol dan glukosa. Variasi lama waktu inkubasi berdasarkan fase hidup *Bacillus subtilis* yaitu 8, 10, dan 12 jam. Substrat α -pinena dikonversi menjadi senyawa turunannya yang dianalisis menggunakan FT-IR, GC (*Gas Chromatography*), dan GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*). Berdasarkan hasil reaksi biotransformasi, glukosa lebih baik daripada sorbitol sebagai sumber karbon utama dengan menghasilkan pada lama waktu inkubasi 12 jam. Hasil reaksi biotransformasi α -pinena oleh *Bacillus subtilis* ialah senyawa alkohol turunan α -pinena dengan kadar 67,69%.

Abstract

The biotransformation of α -pinene by micro-organism produce some valuable compounds. Many microorganisms that can be used to specific conversion of α -pinene, one is *Bacillus subtilis*. Culture of *Bacillus subtilis* were tested its activities in convert of α -pinene compounds to derivatives. Assay activity *Bacillus subtilis* major carbon source and based on the incubation time. The main carbon source used in the culture medium is sorbitol and glucose. Incubation time variations based on the phases of living *Bacillus subtilis* that is 8, 10, and 12 hours. The substrate α -pinene were converted to compound derivatives were analyzed using FT-IR, GC (*Gas Chromatography*), and GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*). Based on the results of biotransformation reaction, glucose better than sorbitol as carbon source with primary produce on incubation time of 12 hour. Results of biotransformation of α -pinene by *Bacillus subtilis* is alcohol compound derivatives of α -pinene with 67.69%.

© 2017 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lantai 2 Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229
E-mail: alnestaris26@gmail.com

p-ISSN 2252-6951

e-ISSN 2502-6844

Pendahuluan

Produksi minyak terpenin dari getah pinus di Indonesia sampai dengan bulan Desember 2012, dilaporkan mencapai 15.340 ton dengan luas hutan pinus sekitar 163.150 hektar. Adanya peningkatan permintaan industri atas minyak terpenin sebagai bahan baku farmasi, parfum, pelarut, resin dan polimer menyebabkan permintaan pasar terhadap minyak terpenin ini semakin meningkat setiap tahunnya (Handayani, *et al.*, 2015). Kandungan utama minyak terpenin adalah α -pinena (70- 90%), β -pinena (5-10%), 3-karena (4-10%), dan δ -longifolena (0,2-5%). Rumus struktur α -pinena terdiri atas dua cincin yang menyatu yaitu siklobutana dan sikloheksana yang membentuk suatu bisiklo, mengandung atom karbon dan hydrogen yang tidak bersifat aromatik, serta tersusun atas jumlah karbon C10 sehingga digolongkan ke dalam kelompok senyawa monoterpena bisiklis (Wijayati *et al.*, 2014).

Biotransformasi α -pinena dapat menghasilkan senyawa bisiklik, monosiklik, atau produk lainnya. Biotransformasi α -pinena dapat dilakukan secara langsung menggunakan biakan bakteri atau mengekstrak enzim biakan terlebih dahulu. Wijayati *et al.* (2008) melakukan biotransformasi α -pinena menggunakan enzim *lipase* yang diperoleh dengan mengekstrak biakan *Pseudomonas aeruginosa*, dengan produk biotransformasi berupa senyawa α -pinena oksida. Biotransformasi secara langsung dilakukan oleh Savithiry, *et al.* (1998) yang mentransformasikan α -pinena menggunakan *Bacillus pallidus* menjadi karveol dan karvon.

Bacillus subtilis merupakan mikroorganisme yang masih satu spesies dengan *Bacillus pallidus*, dimungkinkan dapat mentransformasikan senyawa α -pinena. Selain memiliki karakteristik yang hampir sama, *Bacillus subtilis* mampu menghasilkan enzim *amilase* serta memiliki kemampuan membentuk endospora yang memungkinkannya dapat bertahan dalam kondisi ekstrim (Nakano dan Peter, 1998). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui adanya produk yang terbentuk dari biotransformasi α -pinena oleh *Bacillus subtilis* serta dipelajari pengaruh sumber karbon dan lama waktu inkubasi terhadap produk reaksi.

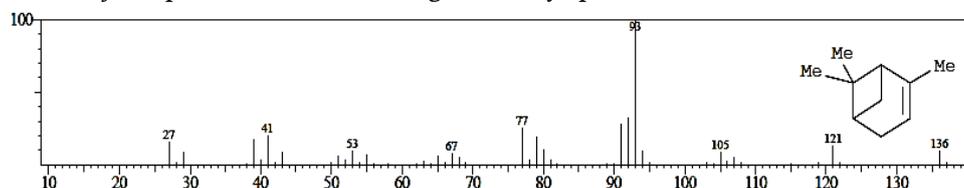
Metode

Peralatan yang digunakan antara lain *Shaking incubator*, *GC Hewlett Packard 5890 Series II*, *GC-MS Shimadzu QP 5000*, *Spektrofotometer FT-IR Shimadzu FTIR 8201 PC*. Bahan yang digunakan minyak terpenin, aquades, sel bakteri *Bacillus subtilis*, Na_2SO_4 anhidrat, dan bahan medium biakan berupa glukosa, sorbitol, ekstrak *yeast*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , dan FeSO_4 (semua dengan *grade pro analyst* buatan *Merck*).

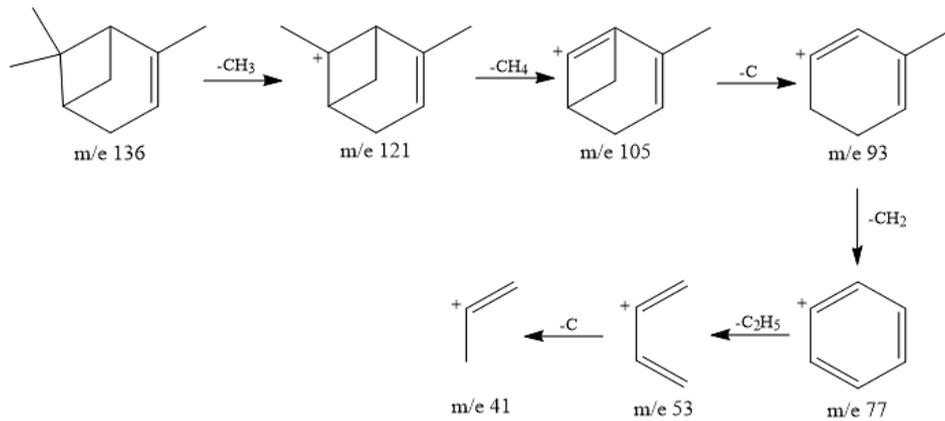
Isolasi α -pinena dilakukan dengan menambahkan Na_2SO_4 anhidrat pada 500 mL minyak terpenin. Selanjutnya terpenin didestilasi fraksinasi dengan pengurangan tekanan pada temperatur 50°C . Destilat diuji dengan GC, FT-IR, dan GC-MS. Pembuatan medium biakan dilakukan dengan 1 L aquades ditambahkan dengan 13,5 g glukosa, 5 g ekstrak *yeast*, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,66 g K_2HPO_4 , 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g MgSO_4 , dan 0,01 g FeSO_4 . pH medium adalah 7,0 (Chen *et al.*, 2008). Medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C dengan tekanan 2 atm selama 20 menit. Membuat medium dengan komposisi yang sama namun sumber C glukosa diganti dengan sorbitol. Biotransformasi α -pinena dilakukan dengan menambahkan 2-3 ose *Bacillus subtilis* ke dalam erlenmeyer yang berisi 50 mL medium biakan steril. Kultur kemudian diinkubasi pada temperatur $27 \pm 2^\circ\text{C}$ sampai pada fase optimum pertumbuhan bakteri. Fase pertumbuhan dimulai pada jam ke-4 (Supartono *et al.*, 2011). Kultur *Bacillus subtilis* ditambahkan dengan 1 mL substrat α -pinena metanolik (60 mg/mL). Kultur diinkubasi menggunakan *shaking incubator* pada temperatur $27 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 8, 10, dan 12 jam (Siddhardha *et al.*, 2011). Hasil reaksi biotransformasi dianalisis menggunakan GC, FT-IR, dan GC-MS.

Hasil dan Pembahasan

α -Pinena merupakan komponen utama penyusun terpenin yang diperoleh dengan cara destilasi fraksinasi pengurangan tekanan. Destilat dianalisis strukturnya menggunakan FT-IR dan GC-MS. Berdasarkan analisis spektrum IR diketahui adanya beberapa serapan karakteristik. Puncak 2918 cm^{-1} menunjukkan serapan gugus C-H alkana, puncak 1740 cm^{-1} menunjukkan rentangan C=C alkena, puncak 1443 cm^{-1} menunjukkan gugus CH_2 , dan puncak 1371 cm^{-1} menunjukkan gugus CH_3 . Analisis spektrum massa destilat disajikan pada Gambar 1 dan fragmentasinya pada Gambar 2.



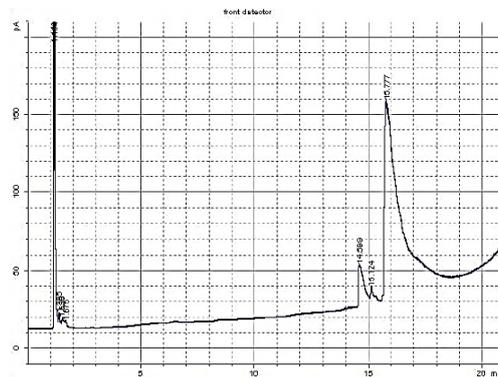
Gambar 1. Spektrum massa α -pinena



Gambar 2. Skema fragmentasi α -pinena

Aktivitas *Bacillus subtilis* terhadap α -pinena pada reaksi biotransformasi diamati berdasarkan ada tidaknya produk biotransformasi yang dihasilkan selama waktu inkubasi. Aktivitas *Bacillus subtilis* dalam mengonversi α -pinena sangat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi pada medium biakan yang digunakan. Reaksi biotransformasi α -pinena dilakukan pada medium cair dengan sumber karbon utama sorbitol selama waktu inkubasi 8, 10, dan 12 jam. Berdasarkan analisis kromatogram GC hasil reaksi biotransformasi pada medium karbon utama sorbitol belum terbentuk produk reaksi yang diharapkan. Hal ini menunjukkan bahwa belum ada aktivitas *Bacillus subtilis* terhadap substrat α -pinena selama waktu reaksi 8, 10, dan 12 jam. Sorbitol merupakan karbohidrat kompleks yang membutuhkan waktu lebih lama untuk *Bacillus subtilis* menguraikannya. Sehingga sumber karbon sorbitol kurang efektif digunakan pada pada reaksi biotransformasi α -pinena menggunakan kultur *Bacillus subtilis*.

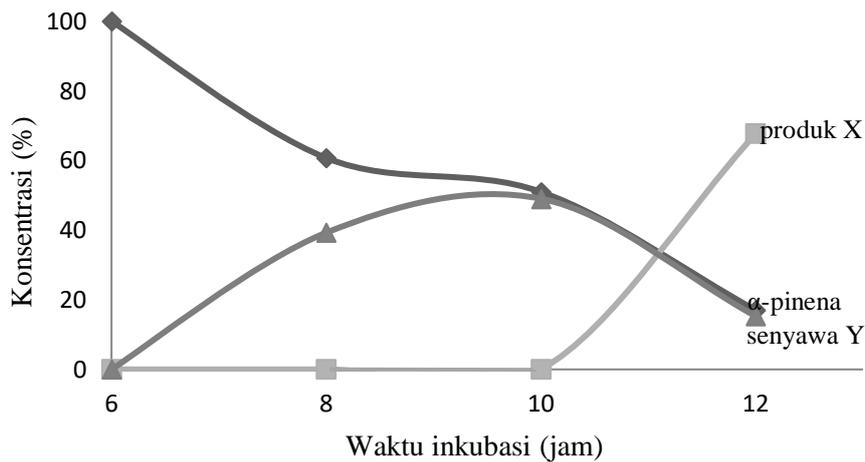
Reaksi biotransformasi α -pinena menggunakan medium sumber karbon glukosa dengan waktu inkubasi 8, 10, dan 12 jam menunjukkan hasil yang berbeda. Berdasarkan analisis kromatogram GC hasil reaksi biotransformasi pada medium komposisi karbon utama glukosa, terbentuk produk reaksi pada lama waktu inkubasi 12 jam. Hasil kromatogram GC pada Gambar 3 menunjukkan adanya delapan puncak. Puncak tertinggi dengan waktu retensi 15,777 menit merupakan senyawa paling dominan dengan persentase kadar 67,69%.



Gambar 3. Kromatogram GC hasil biotransformasi pada glukosa waktu 12 jam
Perkembangan terbentuknya hasil reaksi biotransformasi disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 4.

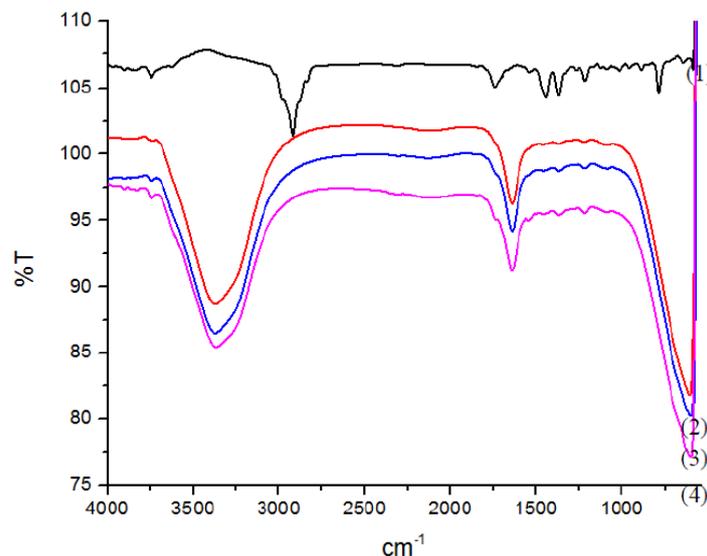
Tabel 1. Persentase hasil reaksi biotransformasi α -pinena

Waktu (jam)	α -pinena (%)	Produk X (%)	Senyawa Y(%)
0	100	-	-
8	60,73	-	39,27
10	50,98	-	49,02
12	17,02	67,69	15,29



Gambar 4. Pengaruh waktu inkubasi terhadap hasil biotransformasi

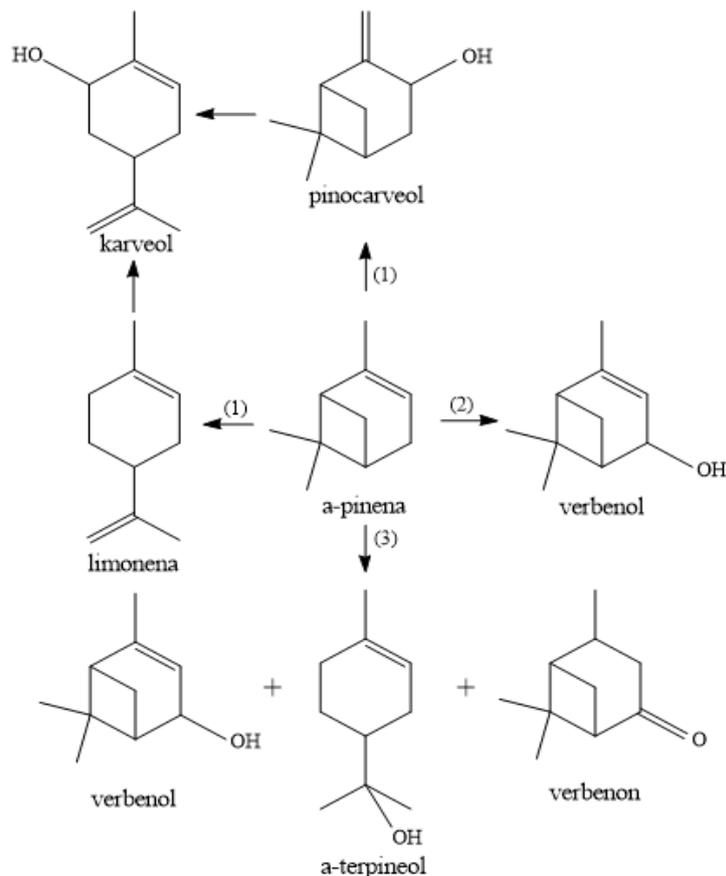
Hasil reaksi biotransformasi α -pinena menggunakan *Bacillus subtilis* pada medium sumber karbon glukosa dengan waktu inkubasi 12 jam menunjukkan terbentuknya produk reaksi. Analisis dilanjutkan dengan menggunakan FT-IR untuk menentukan struktur senyawa produk reaksi biotransformasi. Spektrum IR hasil reaksi biotransformasi α -pinena menunjukkan bahwa ketiga variasi lama waktu inkubasi telah terbentuk produk reaksi. Hasil analisis IR lama waktu inkubasi 8, 10, dan 12 jam menunjukkan adanya gugus OH pada puncak spesifik dalam rentang $3000-3700\text{ cm}^{-1}$. Hal ini berbeda dengan hasil analisis IR pada α -pinena sebelum reaksi biotransformasi. Perbandingan spektrum IR α -pinena dan ketiga hasil reaksi biotransformasi disajikan pada Gambar 5. Puncak gugus OH yang ditunjukkan pada spektrum IR hasil reaksi biotransformasi membuktikan bahwa produk reaksi biotransformasi adalah senyawa alkohol turunan α -pinena.



Gambar 5. Perbandingan spektrum IR (1) α -pinena dengan spektrum IR hasil biotransformasi menggunakan medium glukosa pada lama inkubasi (2) 8 jam, (3) 10 jam, dan (4) 12 jam

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Savithiry *et al.* (1998), biotransformasi α -pinena oleh kultur *Bacillus pallidus* menghasilkan senyawa karveol dan karvon. Karveol sendiri merupakan senyawa alkohol monoterpenoid monosiklik. Reaksi biotransformasi α -pinena juga dilakukan menggunakan kultur *Aspergillus niger* seperti yang telah dilakukan oleh Agrawal *et al.* (1999). Dari reaksi tersebut didapatkan produk berupa verbenol. Penelitian biotransformasi α -pinena lain yang juga menghasilkan produk senyawa alkohol turunan α -pinena adalah penelitian yang dilakukan oleh Rozenbaum *et al.* (2006). Biotransformasi dilakukan menggunakan kultur *Aspergillus niger*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa α -pinena dapat ditransformasi menjadi senyawa α -terpineol, verbenol, dan verbenon. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, maka senyawa alkohol hasil reaksi biotransformasi α -pinena oleh *Bacillus subtilis* dimungkinkan

adalah α -terpineol, verbenol, dan karveol. Mekanisme reaksi yang mungkin terjadi disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Mekanisme reaksi biotransformasi α -pinena (Savithiry *et al.* (1998), Agrawal *et al.* (1999), dan Rozenbaum *et al.* (2006))

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian reaksi biotransformasi α -pinena menggunakan *Bacillus subtilis*, disimpulkan bahwa sumber karbon pada medium berpengaruh terhadap terbentuknya produk reaksi. Sumber karbon glukosa lebih baik daripada sorbitol dalam pengaruhnya terhadap aktivitas *Bacillus subtilis* ketika mentransformasikan α -pinena. Sedangkan lama waktu inkubasi berpengaruh terhadap jumlah produk reaksi yang ditunjukkan dengan meningkatnya konsentrasi produk. Adapun sumber karbon dan waktu inkubasi yang paling baik dalam penelitian ini adalah glukosa dan 12 jam dengan senyawa hasil biotransformasi berupa senyawa alkohol turunan α -pinena.

Daftar Pustaka

- Agrawal, R., dan R. Joseph. 1999. Bioconversion of Alpha-Pinene to Verbenone by Resting Cells of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 335-337
- Amini, R.W., Masruri, dan M.F. Rahman. 2014. Analisis Minyak Terpentin (*Pinus Merkusii*) Hasil Produksi Perusahaan Lokal dan Perdagangan menggunakan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-SM) serta Metode Pemurniannya. *Kimia Student Journal*, 1(1): 147-153
- Chen, J., Y. Zheng, dan Y. Shen. 2008. Biotransformation of p-Methoxyphenylacetone into p-Methoxyphenylacetic Acid by Resting Cells of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 50: 147-153
- Handayani, T., N. Wijayati, dan Harjono. 2015. Pengaruh Waktu dan Temperatur pada Reaksi Isomerisasi α -Pinena menggunakan Katalis Zr^{4+} /Zeolit Alam. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 4(3): 234-239
- Mercier, B., J. Prost, dan M. Prost. 2009. The Essential Oil of Turpentine and Its Major Volatile Fraction (A- And B-Pinenes). *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4): 331-342

- Nakano, M. M., dan Z. Peter. 1998. Anaerobic Growth of A "Strict Aerobe" (*Bacillus Subtilis*). *Annual Review of Microbiology*, 52: 165-90
- Rottava, I., P.F. Cortina, E. Martello, dan D. Oliveira. 2010. Optimization of α -Terpineol Production by the Biotransformation of R-(+)-Limonene and (-)- β -Pinene. *Appl. Biochem Biotechnol*, 164: 514-523
- Savithiry, N., D. Gage, W. Fu, dan P. Oriel. 1998. Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Kluwer Academic Publishers, Biodegradation*, 9: 337-341
- Siddhardha, B., M.V. Kumar, U.S. Murty, dan S. Prabhakar. 2011. Biotransformation of α -Pinene to Terpineol by Resting Cell Suspension of *Absidia corulea*. *Indian J. Microbiol*, 52(2): 292-294
- Supartono, N. Wijayati, L. Herlina, dan E. Ratnaningsih. 2011. Produksi Antibiotika oleh *Bacillus subtilis* M10 dalam Media Urea-Sorbitol. *Reaktor*, 13(3): 185-193
- Wijayati, N., C. Astutiningsih, dan S. Mulyati. 2014. Transformasi α -Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Biosaintifika*, 6(1)
- Wijayati, N., K. Siadi, H. Wijaya, dan M. Thenawidjaja. 2008. Biotransformasi α -Pinena dari Minyak Terpentin dengan Enzim *Lipase* dari *Ps. Aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*