

1. BIOTEKNOLOGI
2. MIKROBIOLOGI INDUSTRIAL

DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
PROYEK PENGEMBANGAN STAF DAN SARANA
PERGURUAN TINGGI

KCS
KK
660.62
Sum
b

**BIOTRANSFORMASI PROGESTERON
OLEH *Aspergillus niger* UICC 159 YANG DITUMBUHKAN
PADA MEDIA TETES (MOLASE)**



TERDAFTAR PADA :
LEMBAGA PENELITIAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Angka: 140 LP VII 1995/95
Surabaya, 9-8-1995
Ketua,

Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130355372

OLEH :
DRA. SRI SUMARSIH
STAF JURUSAN KIMIA FMIPA UNAIR

SELESAI

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA
1995

BIOTRANSFORMASI PROGESTERON OLEH *Aspergillus niger* UICC 159
YANG DITUMBUHKAN PADA MEDIA TETES (MOLASE)



30003169631411

LAPORAN MAGANG PENELITIAN

Disusun Oleh :

Dra. Sri Sumarsih

Staf Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga



3000 316963141-1

Disetujui Oleh :

Dosen Pembimbing

DR. Usman Sumo Friend Tambunan

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah swt., karena atas rahmat dan hidayah-Nya, laporan Magang Penelitian Yang berjudul: BIOTRANSFORMASI PROGESTERON OLEH *Aspergillus niger* UICC 159 YANG DITUMBUHKAN PADA MEDIA TETES (MOLASE) dapat terselesaikan.

Tulisan ini merupakan laporan kegiatan Magang Penelitian MIPA dasar di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Indonesia yang berlangsung tanggal 4 September - 25 Nopember 1995.

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Subtim Magang Penelitian Tim Basic Sciences Universitas yang memberi kesempatan kepada penulis untuk mengikuti Magang Penelitian
2. Dekan FMIPA Universitas Airlangga
3. Dr. Usman Sumo F.T. selaku Dosen Pembimbing
4. Ketua dan Staf Jurusan Kimia FMIPA UI selaku tuan rumah tempat kegiatan penelitian
5. Rekan-rekan sesama peserta Magang Penelitian, khususnya Drs. Rudy Situmeang dan Dra.Siti Mutrofin atas kebersamaannya
6. Nils dan Lies yang telah banyak membantu pada waktu penelitian berlangsung.

Terakhir, segala yang benar itu mutlak datangnya dari Allah dan Rasulnya dan segala yang salah adalah karena kebodohan penulis semata.



Depok. Nopember 1995

Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Biotransformasi	4
2.1.1. Keunggulan Biotransformasi	4
2.1.2. Faktor-faktor penting pada Biotransformasi	5
2.1.3 Biotransformasi Steroid	6
2.2. <i>Aspergillus niger</i>	10
2.3. Reaksi Hidroksilasi	13
2.4. Tetes (Molase)	16
BAB III METODE PENELITIAN	17
3.1. Bahan dan Alat	17
3.1.1. Bahan yang digunakan	17
3.1.2. Alat yang digunakan	17
3.2. Rancangan Percobaan	18
3.3. Pembuatan Media dan Pemeliharaan Kapang	18
3.3.1. Pembuatan Media Padat PDA	18
3.3.2. Pembuatan Media Cair	18
3.3.3. Pembuatan Media Biotransformasi	18
3.3.4. Pemeliharaan Kapang	19
3.4. Pembuatan Inokulum	20
3.5. Aktivasi dan Induksi	20
3.6. Biotransformasi dengan variasi konsentrasi tetes	21
3.7. Penentuan Produk Biotransformasi	21
3.8. Analisis Produk	22
3.8.1. Analisis Pendahuluan	22
3.8.2. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif	22

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1. Aktivasi dan Induksi	24
4.2. Proses Biotransformasi dengan Variasi	26
4.2.1. Analisis Pendahuluan	26
4.2.2. Analisis dengan HPLC	27
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	29
5.1. Kesimpulan	29
5.2. Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Beberapa reaksi Biotransformasi Steroid	9
Tabel 2.2. Beberapa mikroorganisme Pembentuk 11α -hidroksilase	15
Tabel 2.3. Komposisi Molase	16

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Reaksi-reaksi Kimiawi dan mikrobiologis pada Pembuatan Kortison dan prednison	8
Gambar 2.2. Morfologi <i>Aspergillus niger</i>	11
Gambar 2.3. Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> UICC 159	12
Gambar 2.4. Mekanisme reaksi pembentukan 11α -hidroksi progesteron	14

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Tabel Berat Kering Kapang dan Hasil TLC Produk Biotransformasi	32
Lampiran 2. Kromatogram HPLC	33
Lampiran 3. Analisis Kuantitatif Produk Biotransformasi	34
Lampiran 4. Rumus Statistik Uji Homogenitas, Uji anova satu arah dan Uji jarak berganda Duncan	37
Lampiran 5 Analisis Ststistik Pengaruh konsentrasi tetes terhadap produk Biotransformasi	40

BAB I

PENDAHULUAN

Salah satu penerapan bioteknologi yang sedang giat dikembangkan dalam industri adalah mengeksploitasi potensi mikro-organisme untuk memproduksi bahan-bahan kimia yang dibutuhkan oleh industri dan obat-obatan. Motivasi utama penggunaan biokatalisator (enzim) adalah karena kemampuan enzim yang spesifik mengkatalis suatu reaksi tertentu.

Indonesia sampai sekarang masih mengimport bahan obat-obatan golongan steroid. Menurut data yang ada, import hormon pada tahun 1988 bernilai US \$15.948.200 yang merupakan kelompok ke-10 terbesar diantara obat-obat yang beredar di Indonesia. Hormon kortikosteroid merupakan golongan utama dari kelompok tersebut yaitu 42,29 % diikuti oleh estrogen, progesteron dan obat-obatan golongan steroid hasil sintesis 40,31 % (Corinthian Infopharma Corpora,1990).

Permintaan bahan obat-obatan golongan steroid masih akan meningkat dari tahun ke tahun khususnya bahan obat kontraseptik. Hal ini berkaitan dengan program pemerintah Indonesia tentang kependudukan, yaitu mengharapkan pertambahan penduduk mendekati nol persen pada tahun 2000 (Tarigan,1980).

Indonesia kaya akan tumbuh-tumbuhan dan hewan yang dapat digunakan sebagai sumber steroid. Selain usaha menggalakan penelitian untuk mencari sumber steroid potensial di Indonesia,

juga dibutuhkan pengetahuan untuk mengolah lebih lanjut bahan steroid tersebut menjadi steroid yang aktif farmakologik. Steroid yang aktif farmakologik dapat diperoleh melalui sintesis parsial, dengan menggunakan kombinasi reaksi kimia dan bantuan mikroorganisme (proses biotransformasi).

Selain kaya akan sumber steroid, Indonesia juga kaya akan hasil samping industri gula, yaitu tetes (molase). Tetes dari industri gula di seluruh Indonesia belum dimanfaatkan secara optimum. Mengingat tetes tersebut sebagian besar merupakan karbohidrat (sukrosa) maka kemungkinan tetes tersebut dapat digunakan sebagai sumber karbon utama untuk pertumbuhan mikroba yang akan digunakan dalam penelitian ini.

Dari hasil penelitian terdahulu, disebutkan bahwa kapang *Aspergillus niger* UICC 159 yang ditumbuhkan dalam media standar, mampu melakukan reaksi biotransformasi progesteron menjadi 11α -hidroksiprogesteron (Ade, 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan kapang *Aspergillus niger* UICC 159, yang ditumbuhkan dalam media tetes, melakukan reaksi hidroksilasi pada posisi C-11 pada substrat progesteron dan pada konsentrasi tetes berapakah reaksi biotransformasi berjalan optimum.

MANFAAT PENELITIAN :

Dengan diketahuinya kondisi optimum proses biotransformasi progesteron oleh *Aspergillus niger* UICC 159 yang ditumbuhkan dalam media tetes maka :

1. Dapat dikembangkan lebih lanjut untuk sintesis obat golongan steroid secara komersial dengan memanfaatkan kapang *Aspergillus niger* dan tetes (molase).
2. Dapat dikembangkan untuk mengubah steroid hasil isolasi dari tumbuhan atau hewan menjadi aktif farmakologik.

RUMUSAN MASALAH :

1. Apakah kapang *Aspergillus niger* UICC 159 yang ditumbuhkan dalam media tetes mampu melakukan reaksi hidroksilasi pada posisi C-11 pada substrat progesteron menjadi 11α -hidroksiprogesteron.
2. Pada konsentrasi tetes berapakah reaksi biotransformasi oleh kapang *Aspergillus niger* UICC 159 yang ditumbuhkan dalam media tetes dapat berlangsung optimum.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biotransformasi

Biotransformasi ialah proses perubahan atau modifikasi kimia suatu molekul oleh mikroba menjadi produk dengan struktur yang hampir sama. Transformasi seperti ini sering disebut transformasi mikroba. Transformasi biasanya dapat dilakukan dengan sel yang sedang tumbuh, enzim, sel mobil atau enzim amobil (Tarigan, 1989)

2.1.1. Keunggulan Biotransformasi

Biotransformasi sering lebih menguntungkan dari pada proses kimia biasa karena alasan berikut :

1. Reaksi spesifik

Hanya satu langkah reaksi yang spesifik yang dikatalis oleh suatu enzim.

2. Regiospesifik

Kalau terdapat beberapa gugus fungsi dari tipe yang sama yang terdapat dalam suatu molekul, hanya salah satu posisi spesifik yang dipengaruhi.

3. Stereospesifik

Kalau suatu campuran rasemat dipergunakan sebagai bahan awal atau substrat, hanya salah satu enantiomer yang spesifik yang ditransformasikan. Sedangkan jika pada reaksi biotransformasi muncul suatu pusat asimetrik sebagai reaksi enzim, maka produk

yang dihasilkan biasanya molekul optis aktif.

4. Kondisi reaksi lunak

Reaksi enzimatis tidak menyebabkan destruksi substrat yang labil oleh suhu dan pH, disebabkan kondisi lunak atau suhu di bawah 40^o C, pH mendekati netral dan tekanan 1 atm.

2.1.2. Faktor-faktor Penting pada Biotransformasi

1. Seleksi mikroba

Untuk memperoleh mikroba yang dapat mengkatalis suatu reaksi dengan hasil semaksimal mungkin, maka perlu dilakukan penyeleksian secara ekstensif terhadap sejumlah besar kultur murni.

2. Substrat biotransformasi

Agar proses biotransformasi dapat berlangsung dengan baik, maka molekul substrat harus dapat berinteraksi dengan enzim. Oleh karena itu substrat yang ideal harus larut dalam media biotransformasi. Untuk senyawa-senyawa yang tidak larut dalam air dapat dimodifikasi sehingga segera ditransformasikan, antara lain dengan cara :

- a. Melarutkan substrat dalam pelarut organik yang dapat bercampur dengan air, seperti aseton, alkohol, dimetil formamida dan etilen glikol. Pelarut ini digunakan sesedikit mungkin, sekitar 1 % volume total untuk mencegah toksisitas pelarut terhadap mikroba
- b. Menambahkan zat pensuspensi non ionik seperti tween 80 pada substrat.

- c. Menggerus substrat sampai berukuran mikron lalu disuspensikan dalam media biotransformasi. Cara ini disebut *pseudokristalofermentasi* (Cueger,1980; Kieslich, 1984; Tarigan, 1989).

3. Optimasi kondisi lingkungan

Untuk memperoleh efisiensi biotransformasi yang tinggi maka kondisi lingkungan harus optimal. Dua aspek yang harus diperhatikan untuk mencapai kondisi biotransformasi yang optimum :

- a. Optimasi jumlah sel agar didapat konsentrasi maksimum.
- b. Menciptakan kondisi agar enzim yang terbentuk menunjukkan aktivitas maksimum.

2.1.3. Biotransformasi Steroid

Beberapa senyawa steroid didalam tubuh manusia ada yang bersifat sebagai hormon, misalnya : hormon kortek adrenal (glukokortikoid dan mineralokortikoid), androgen, estrogen dan progesteron. Disamping bersifat sebagai hormon, beberapa steroid juga aktif sebagai sedatuf pada terapi anti tumor dan sebagai stimulan pada bidang veteriner. Turunan progesteron dan estrogen banyak digunakan sebagai kontraseptik (Tarigan, 1980).

Glukokortikoid merupakan senyawa yang bermanfaat pada berbagai terapi. Kortison sangat bermanfaat karena dapat bekerja sebaga anti inflamasi dalam kondisi seperti arthritis rematoid dan penyakit kulit (Goodman, 1977).

Berbagai senyawa steroid aktif farmakologik memiliki atom

oksigen yang terikat pada atom karbon posisi sebelas (C - 11) antara lain : golongan glukokortikoid (kortison, kortikosteron, prednison dan prednisolon), mineralokortikoid (aldosteron), golongan androgenik (fluoksimestteron) dan steroid lain seperti alfaksolon (Tarigan, 1980).

Senyawa-senyawa steroid aktif farmakologik dapat diproduksi melalui :

- a. Isolasi langsung dari sumber alamiah
- b. Sintesis total menggunakan bahan dasar sederhana
- c. Sintesis sebagian (semi sintesis) dari senyawa bahan alam yang berstruktur mendekati struktur senyawa yang akan disintesis.

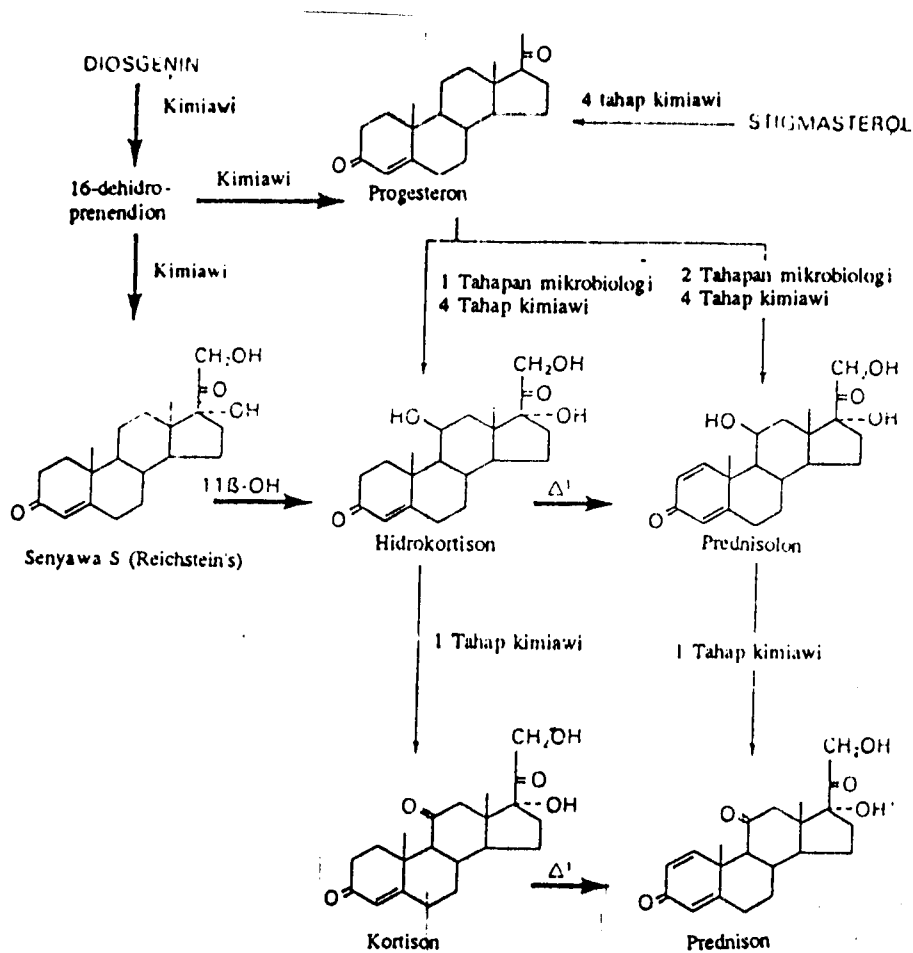
Cara semi sintesis dapat dilakukan melalui reaksi kimia biasa atau menggunakan bantuan mikroorganisme (biokatalis) atau kombinasi antara reaksi kimia dan bantuan mikroorganisme (Adharowitz, 1981; Mahato, 1984-1985).

Steroid yang dapat digunakan sebagai bahan dasar semi sintesis adalah : kolesterol, stigmasterol, sitosterol dan diosgenin.

Untuk membuat senyawa steroid aktif farmakologik ternyata lebih murah dengan cara semi sintesis dan umumnya dilakukan dengan menggunakan gabungan reaksi kimia biasa dan bantuan mikroorganisme (Sebek, 1979).

Karena molekul steroid mengandung beberapa pusat asimetrik, sintesis kimia secara keseluruhan sangat sulit dilakukan. Hal ini dapat diatasi dengan melakukan reaksi enzimatik, sehingga tahap-tahap reaksi dapat dikurangi.

Contoh reaksi pembuatan kortison dan prednison secara kimiawi dan mikrobiologis dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Reaksi-reaksi kimiawi dan mikrobiologis pada pembuatan kortison dan prednison (Vezina, 1987)

Sampai saat ini, berbagai jenis reaksi sudah dapat diterapkan pada senyawa steroid yaitu : monohidroksilasi, dihidroksilasi,

epoksidasi, dehidrogenasi, hidrogenasi dan pemotongan rantai cabang (Sebek, 1979).

Dengan bantuan mikroorganisme, hidroksilasi molekul steroid pada posisi tertentu sudah dapat dilakukan oleh beberapa peneliti, tetapi hanya sebagian dari proses tersebut yang diterapkan dalam industri (El-Kady, 1985; Peterson, 1952).

Salah satu jenis hidroksilasi yang penting pada sintesis steroid aktif farmakologik adalah 11- hidroksilasi. Beberapa reaksi biotransformasi steroid dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Beberapa Reaksi Biotransformasi steroid

Substrat	Produk	Mikroorganisme	Hasil (%)
Progesteron	11 α -hidroksi progesteron	<i>Rhizopus arrhizus</i>	10
		<i>R. Nigricans</i>	80-90
		<i>Rhizopus sp.</i>	40-45
		<i>Aspergillus niger</i>	35
		<i>Pestalotia foedans</i>	
		<i>Erolium chevalieri</i>	
		<i>A. niger</i>	83
		<i>A. ochraceus</i>	64
		<i>A. amstelodami</i>	64
		<i>A. psedoglaucus</i>	64
		<i>A. repens</i>	63
		<i>Dactylium d.</i>	30
		<i>R. arrhizus</i>	7,5
		<i>A. niger</i>	20
	6 β ,11 α -Dihidroksi progesteron	<i>Apergillus sp.</i>	...
	11 α ,17 α -Dihidroksi progesteron	<i>D. dentroides</i>	...
Pregnandion	11 α -Hidroksipregnan-dion	<i>R. Nigricans</i>	40
Allopregnandion	11 α -Hidroksiallopregn-anedion	<i>R. nigricans</i>	25

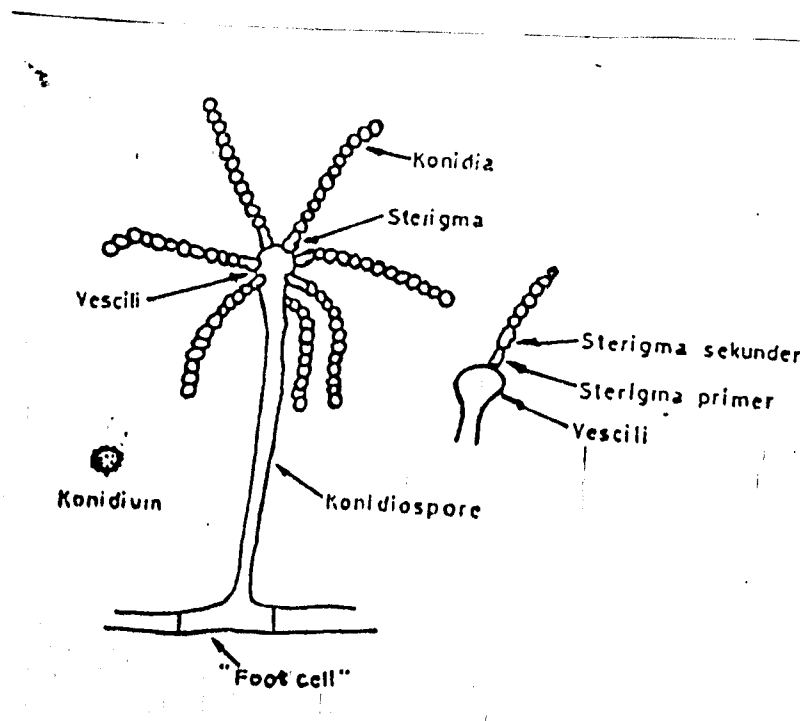
2.2. *Aspergillus niger*

Kapang *Aspergillus niger* merupakan kapang yang paling umum dijumpai dibandingkan dengan kapang lain dari genus *Aspergillus*. *Aspergillus niger* dapat menghasilkan bermacam-macam enzim, antara lain : amilase, sellobiase, anvertase, lipase, maltase, protease, amiloglukosidase dan glukosa oksidase. Enzim amilase merupakan anzim yang banyak dihasilkan oleh *Aspergillus niger* (Prihantini, 1987; Raper, 1965).

Kapang *Aspergillus niger* mempunyai peranan yang cukup besar dalam kehidupan manusia. Pada umumnya kapang ini hidup pada bahan pangan, dapat memberikan keuntungan pada pembuatan dan pengolahan makanan, akan tetapi dapat pula mendatangkan kerugian misalnya : menyebabkan pembusukan makanan dan sebagai kontaminan di laboratorium. Kedudukan kapang *Aspergillus niger* dalam taksonomi adalah sebagai berikut (Raper, 1965) :

Divisio	: Thallophyta
Subdivisio	: Deuteuromycotyna
Ordo	: Monoliales
Family	: Monoliaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Species	: <i>Aspergillus niger</i>

Kapang *Aspergillus niger* mempunyai bentuk morfologi yang khas dan terdiri atas : foot cell, konidiofor, vescili, sterigma dan konidia.



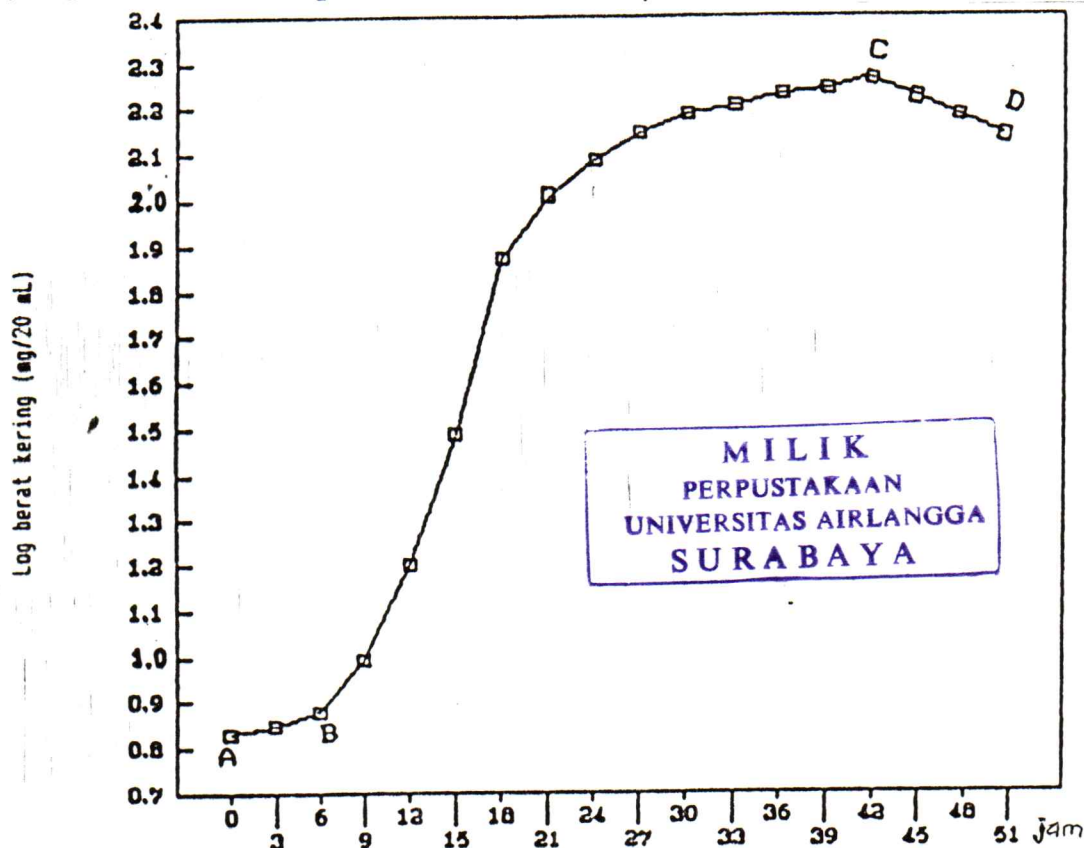
Gambar 2.2. Morfologi *Aspergillus niger*

Kapang *Aspergillus niger* memiliki hifa yang bercabang dan bersepta. Sel hifa yang tumbuh sebagai cabang tegak lurus membentuk konidiofor disebut *foot cell*, sedangkan vesicili adalah struktur yang meruoakan pembesaran konodiofor. Pada permukaan fertil terdapat sterigma yang merupakan sel-sel penghasil spora (konidia) (Raper 1965; Samuel, 1959).

Koloni *Aspergillus niger* tumbuh dengan cepat di media agar pada suhu kamar. Basal miselium berwarna putih atau kuning yang menghasilkan konidia di seluruh permukaan koloni. Sporulasi pada umumnya berwarna hijau kecoklatan, kemudian berubah menjadi coklat gelap.

Pertumbuhan *Aspergillus niger* dalam media cair melalui perpanjangan dan percabangan hifa. Jika ditumbuhkan pada permukaan media, maka hifa akan bertumpang tindih dan membentuk lapisan tebal, sedangkan pada kultur yang terendam hifa akan membentuk pelet yang berdiameter 0,1 - 10 mm (Raper, 1965; Sekarwati, 1993).

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil bahwa pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* memperlihatkan 3 fase, yaitu : fase lag (fase adaptasi), fase log (fase eksponensial) dan fase kematian. Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* UICC 159 yang dibuat berdasarkan waktu inkubasi dan berat kering kapang adalah sebagai berikut (Ade, 1995) :



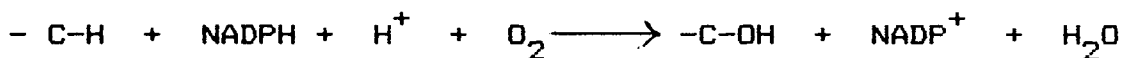
Gambar 2.3. Kurva Pertumbuhan *Aspergillus niger* UICC 159

2.3. Reaksi Hidroksilasi

Umumnya reaksi oksidasi berlangsung didalam mitokondria. Retikulum endoplasmik mengandung enzim yang dapat mengkatalis reaksi oksidatif khusus. Atom oksigen secara langsung bergabung dengan molekul substrat membentuk suatu gugus hidroksil atau karbonil baru. Enzim ini disebut *oksigenase*. Oksigenase dapat digolongkan menjadi dioksigenase dan monooksigenase.

Dioksigenase mengkatalis reaksi yang kedua atom oksigennya melekat pada molekul substrat; sedangkan monooksigenase mangkatalis reaksi yang melibatkan satu atom oksigen untuk bergabung dengan substrat. Monooksigenase memerlukan dua substrat untuk berperan sebagai pereduksi kedua atom oksigen. Substrat utama menerima satu diantara dua oksigen dan suatu kosubstrat memberikan atom hidrogen untuk mereduksi oksigen menjadi H_2O .

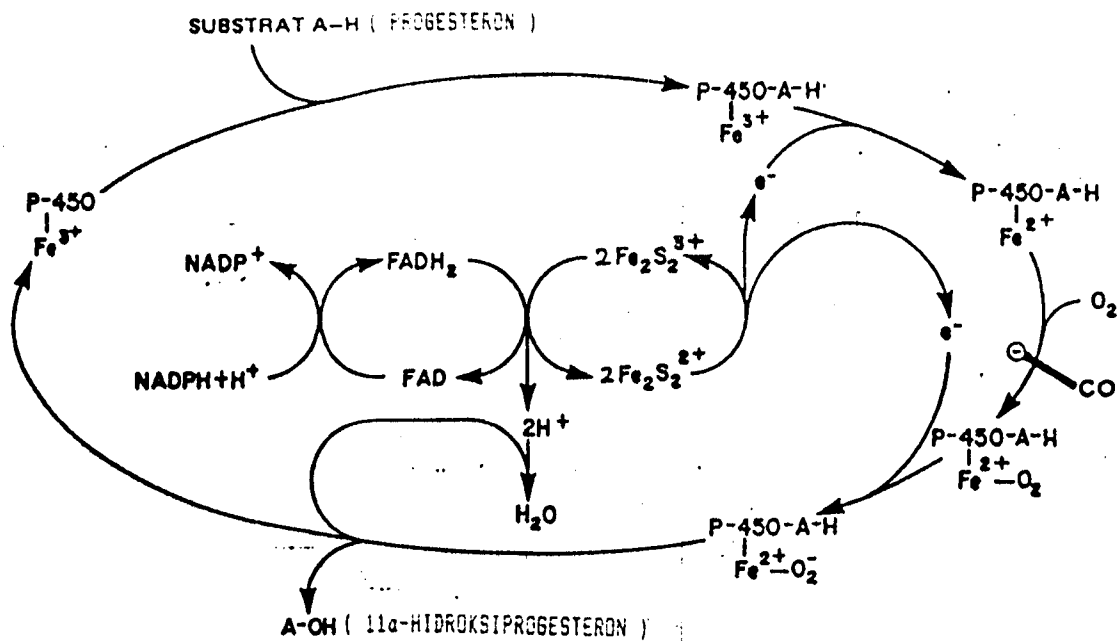
Secara umum reaksinya dapat ditulis :



Karena hampir semua monooksigenase mengkatalis reaksi yang substrat utamanya mengalami hidroksilasi maka enzim ini dinamakan *hidroksilase* (Lehninger, 1991).

Sistem hidroksilasi pada kapang menunjukkan kemiripan dengan sistem hidroksilasi steroid pada mamalia, yaitu memanfaatkan sejenis protein heme yang disebut sitokrom P-450. Jenis sitokrom ini terdapat di dalam retikulum endoplasma. Dalam bentuk tereduksi, sitokrom P-450 (Fe^{2+}) mengkatalis reaksi pembentukan

11 α -hidroksiprogesteron (gambar 2.4.).



Gambar 2.4. Mekanisme Reaksi Pembentukan 11 α -hidroksiprogesteron

Enzim 11 α -hidroksilase dapat dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme yang dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2. Beberapa mikroorganisme Pembentuk 11 α -hidroksilase

(Stoudt, 1960)

Substrat	Kultur	OH
Progesteron	<i>Rhizopus nigrican</i>	11 α
		11 α + 6 β
	<i>Aspergillus niger</i>	11 α
		11 α + 6 β
	<i>Bacillus</i>	11 α
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	11 α
		11 α + 6 β
	<i>Dactylium dendroides</i>	11 α
		11 α + 17
	<i>Aspergillus niger</i>	11 α
17α, 21 Dihidroksi Pregn-4 ena 3,20 dion		11 α + 21
	<i>Cephalothecium roseum</i>	11 α
		11 α + 17
	<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	11 α
		11 β
1-Dehydro-17α, 21 Dihidroksi Pregn-4 ena 3,20 dion	<i>Absidia glauca</i>	11 α
		11 β
	<i>Delacroixia coronata</i>	11 α
Allopregnan 3,20 dion		
	<i>Rhizopus nigrican</i>	11 α
19-Nortetesteron		
	<i>Rhizopus nigrican</i>	11 α
3-Ketobisnor 4-Cholen-22-al		
	<i>Rhizopus nigrican</i>	11 α

2.4. Tetes (molase)

Molase atau tetes tebu merupakan hasil samping pabrik gula tebu yang berupa cairan kental berwarna coklat kehitaman dan berasal dari sirup yang tidak dapat dikristalkan dengan metode biasa, yang masih memiliki kandungan gula yang cukup tinggi. Selain itu molase juga mengandung senyawa anorganik yang cukup tinggi sehingga tidak dapat dikonsumsi secara langsung. Jumlah dan mutu molase yang dihasilkan tergantung pada mutu tebu dan proses pembuatan gula tebu. Molase telah dimanfaatkan sebagai campuran makanan ternak dan pupuk serta bahan media fermentasi pada produksi asam asetat, alkohol, asam laktat, gliserin, ragi dan lain-lain. Molase dapat digunakan sebagai bahan baku industri fermentasi karena kandungan gula dan berbagai nutrisi yang diperlukan oleh mikroorganisme untuk hidup dan berkembang biak masih cukup banyak di dalam molase. (Chen, 1993; Honig, 1963).

Komposisi molase secara lengkap dapat dilihat pada tabel 2.3. :

Tabel 2.3. Komposisi Molase (% berat)

Komponen	Prosentase
Air	17-25
Sukrosa	30-40
Glukosa	4- 9
Fruktosa	5-12
Gula pereduksi lain	1- 4
Pati, pentosan, d-manitol	2- 5
asam uronat, myonositol	
Abu (sebagai karbonat)	7-15
Protein kasar	2,5-4,5
Asam amino (asam glutamat)	0,3-0,5
Asam asetonat, sitrat, malat	1,5- 6
oksalat dan glikolonat	
lilin, sterol	0,5-1,5
Vitamin	bervariasi

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan yang digunakan :

Kapang *Aspergillus niger* UICC 159 yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UI, bahan media padat Potato Dextrose Agar (PDA) dari Merck, molase (tetes) dari PG Subang dan bahan-bahan kimia : NaOH, Progesteron (sebagai substrat), 11α -hidroksiprogesteron (sebagai standar produk), aseton, kloroform, metanol, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, KH_2PO_4 , pepton, asparagin dan ekstrak ragi; yang semuanya berkualitas p.a. Serta etil asetat teknis yang didestilasi terlebih dulu sebelum digunakan.

3.1.2. Alat Yang Digunakan :

Jarum tanam, cawan petri, inkubator, autoklaf dari Ogawa Co, Ltd., pH meter, shaking water bath dari GCA Corporation, alat sentrifuge merk Clay Adams serta alat-alat gelas.

Sedangkan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif produk digunakan alat HPLC (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi : KCKT) merk Shimadzu LC - 6A Liquid Chromatograph.

3.2. Rancangan Percobaan :

Pada penelitian ini diuji kemampuan kapang *Aspergillus niger* UICC 159 yang ditumbuhkan pada media tetes untuk melakukan proses biotransformasi progesteron menjadi 11α -hidroksi progesteron dan mengetahui pada konsentrasi tetes berapakah proses biotransformasi dapat berlangsung optimal.

Pada penelitian ini digunakan rancangan percobaan acak lengkap. Setiap variabel dilakukan tiga kali pengulangan dan diuji dengan analisis variansi satu arah.

3.3. Pembuatan media dan pemeliharaan kapang

3.3.1. Pembuatan media padat PDA

Sebanyak 39 gram bahan media PDA (Potato Dextrose Agar) yang sudah baku dilarutkan dalam 1 liter air suling, selanjutnya dipanaskan sambil diaduk sampai jernih. Dalam keadaan panas, larutan dituang masing-masing 5 ml kedalam tabung reaksi dan 50 ml kedalam erlenmeyer 250 ml. Kemudian ditutup dengan kapas dan ditutup lagi dengan kertas, lalu disterikan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Untuk membuat media agar miring, tabung reaksi yang masih panas diletakkan miring dan dibiarkan hingga membeku.

3.3.2. Pembuatan Media Cair

Semua bahan media cair ditimbang sesuai dengan keperluan. Komposisi media : molase 50 gram, ekstrak ragi 1 gram, pepton 1 gram, asparagin 0,7 gram, KH_2PO_4 0,74 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 gram.

Kemudian ditambahkan air suling hingga satu liter. Padatan yang terdapat dalam molase dipisahkan dengan sentrifugasi, pH diatur dengan penambahan larutan buffer sitrat-fosfat hingga pH 5,6. Larutan yang diperoleh disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.3.3. Pembuatan Media Biotransformasi

Molase (divariasi 5, 20, 35, 50, 65 dan 80 gram), ekstrak ragi 1 gram, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ^{1 gram}, pepton 1 gram, KH_2PO_4 ^{0,74 gram} dan asparagin 0,7 gram kemudian ditambahkan air suling hingga 1 liter. Padatan yang terdapat dalam larutan dipisahkan dengan sentrifugasi, pH diatur dengan penambahan larutan buffer sitrat-fosfat sehingga diperoleh pH 5,6. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.3.4. Pemeliharaan kapang

Spora dari biakan kapang *Aspergillus niger* UICC 159 ditanam secara aseptis dengan jarum tanam pada media agar miring, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C . Setelah berumur 7 hari, biakan kapang disuspensi dengan 2 ml air suling yang steril dan dipindahkan secara aseptis kedalam media PDA dalam erlenmeyer dan diinkubasi kembali pada suhu 30°C selama 7 hari.

3.4. Pembuatan Inokulum

Biakan kapang *Aspergillus niger* UICC 159 dalam media PDA dalam erlenmeyer yang telah berumur 7 hari, disuspensikan dengan 50 ml media cair dan dikoco-kocok hingga semua spora terlepas. Jumlah spora dalam inokulum dihitung untuk mengetahui jumlah sel/ml inokulum.

3.5. Aktivasi dan Induksi

Sebanyak 2 ml inokulum yang baru dibuat diinokulasikan secara aseptis kedalam 18 ml cair yang steril dan diinkubasi dengan pengocokan 100 goyangan/menit pada suhu 30°C. Substrat progesteron dengan konsentrasi akhir 0,3 gram/liter yang dalam 10 ml etanol ditambahkan kedalam kultur yang sedang tumbuh setelah diinkubasi selama 12 jam pada suhu 30°C.

Selanjutnya diinkubasi kembali selama 27 jam. Setelah inkubasi selama 27 jam makansuoernatan yang diperoleh dipindahkan secara aseptis dengan jarum tanam kedalam media agar miring. Sisanya dianalisis dengan cara TLC untuk mengetahui apakah produk 11 α -hidroksiprogesteron sudah terbentuk yang menunjukkan bahwa kapang *Aspergillus niger* sudah aktif dan enzim 11 α -hidroksilase sudah terbentuk. Kultur yang diperoleh dari agar miring dipakai untuk proses biotransformasi.

3.6. Biotransformasi dengan variasi konsentrasi tetes

Sebanyak 2 ml inokulum diinokulasikan kedalam media biotransformasi dengan konsentrasi tetes yang bervariasi (5, 20, 35, 50, 65 dan 80 gram/liter media) dan pH awal 5,6; dengan media tanpa tetes dan tanpa mikroba sebagai kontrol.

Kemudian diinkubasi dengan pengocokan 100 goyangan/menit pada suhu 30^o C. Substrat progesteron dengan konsentrasi akhir 0,3 gram/liter yang telah dilarutkan kedalam 10 ml etanol, ditambahkan kedalam kultur yang sedang tumbuh setelah inkubasi selama 12 jam. Selanjtnya kultur diinkubasi kembali selama 36 jam. Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan NaOH 5 %.

Pada akhir proses, sampel diambil untuk penentuan konsentrasi produk.

3.7. Penentuan Produk Biotransformasi

Sampel hasil biotransformasi disaring untuk memisahkan kapang dari filtratnya. Filtrat yang diperoleh diekstraksi dengan 40 ml etil asetat. Lapisan etil asetat diambil yang selanjutnya dipekatkan dengan rotavapor. Hasil yang diperoleh dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (TLC) untuk mengetahui jumlah komponen dalam produk biotransformasi.

3.8. Analisis Produk

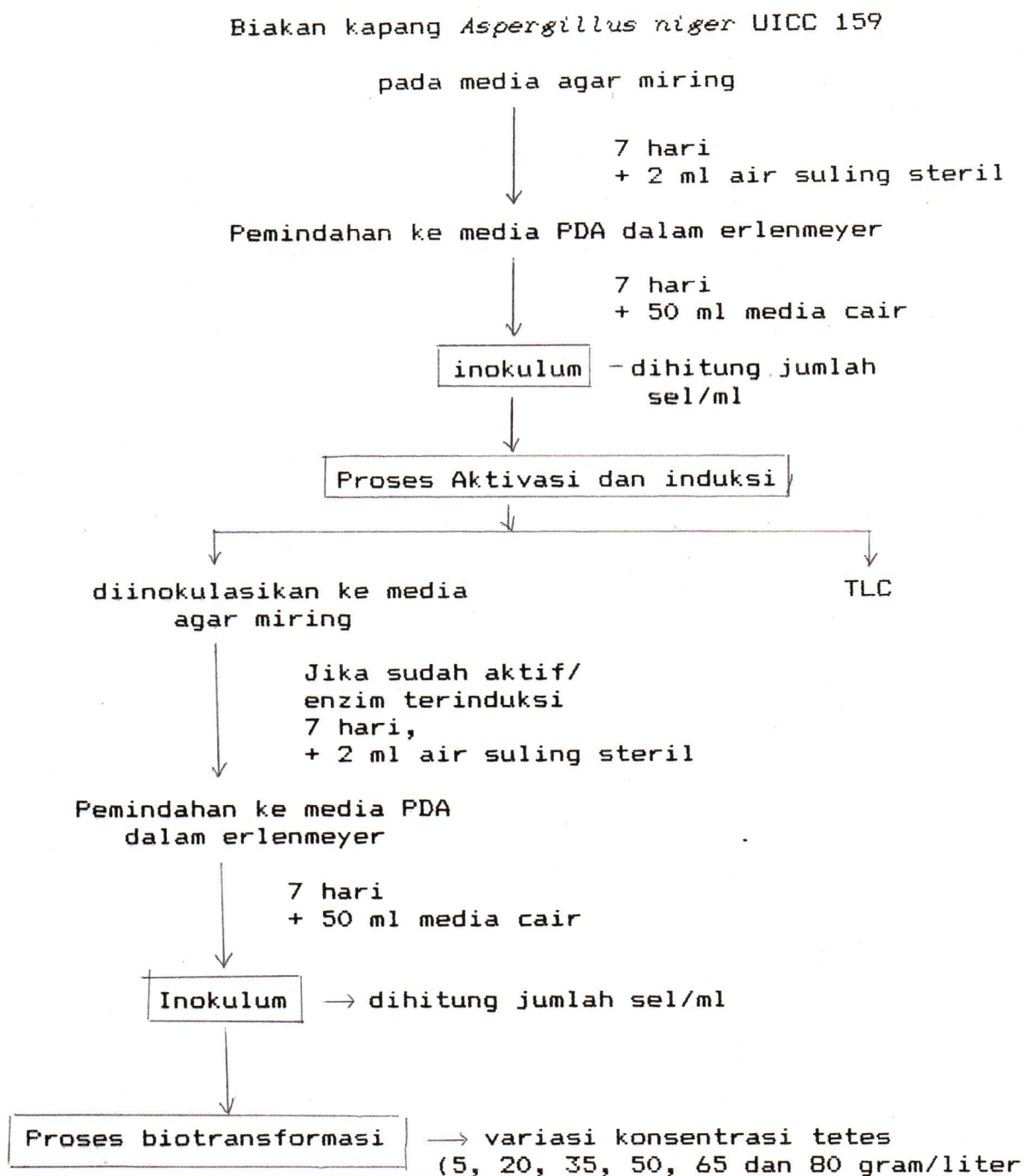
3.8.1. Analisis Pendahuluan

Jumlah komponen dalam produk biotransformasi dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (TLC) menggunakan lempeng silika gel GF₂₅₄ dan eluen campuran kloroform : aseton = 7 : 3. Noda yang terbentuk dapat diketahui dengan menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm.

3.8.2. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif

Analisis produk biotransformasi secara kualitatif dan kuantitatif dilakukan dengan alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC) menggunakan kolom Shimpack CLC-C8. Produk biotransformasi yang diperoleh dilarutkan dalam larutan metanol : air = 4 : 1 dan dielusi dengan pelarut yang sama.

Alur Kerja Keseluruhan dapat dilihat pada skema berikut :



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semua mikroorganisme membutuhkan air, sumber energi, karbon, nitrogen, unsur-unsur mineral dan vitamin serta oksigen jika aerob. Oleh karena itu suatu media fermentasi harus mengandung komponen-komponen yang sangat dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk proses metabolisme sel.

Sumber karbon yang umum digunakan adalah molase, sukrose, tanaman padi-padian, tepung, glukose dan laktose, sedangkan sumber nitrogen antara lain bersal dari garam-garam amonium, urea, nitrat, kedelai dan limbah rumah pemetongan hewan. Hampir semua mikroorganisme yang digunakan oleh industri adalah kemoorganotrop dimana sumber energi berasal dari kbahan kimia yaitu karbohidrat, lipida dan protein (Stanbury, 1986).

4.1. Aktivasi dan Induksi

Enzim 11 α -hidroksilase yang berperan mengubah progesteron menjadi 11 α -hidroksiprogesteron, yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus niger*, merupakan enzim induktif yaitu enzim yang dapat terbentuk bila kapang yang memproduksinya dalam keadaan aktif. Jadi sebelum digunakan maka kapang *Aspergillus niger* harus diaktivasi terlebih dahulu dengan cara penambahan sedikit substrat pada kultur yang sedang tumbuh.

Sebanyak 2 ml inokulum dengan jumlah spora $3,71 \cdot 10^6$ sel/ml dinokulasikan secara aseptis kedalam 18 ml media cair dan diinkubasi dengan pengocokan 100 goyangan/menit pada suhu 30° C. Setelah 12 jam diinkubasi, ditambahkan substrat dengan konsentrasi akhir 0,3 gram/liter yang telah dilarutkan kedalam etanol. Selanjutnya diinkubasi kembali selama 27 jam. Produk hasil aktivasi ini diinokulasikan secara aseptis kedalam media agar miring dan sisanya diuji dengan TLC untuk mengetahui apakah enzim sudah terinduksi dengan ditandai terbentuknya produk 11α -hidroksiprogesteron. TLC dilakukan dengan pelat silika gel GF 254 dan eluen campuran kloroform : aseton = 7 : 3. Noda yang terbentuk diidentifikasi dengan sinar UV panjang gelombang 254 nm. Ternyata terbentuk 4 noda dengan Rf 0,554, 0,738, 0,846 dan 0,898. Jika dibandingkan dengan senyawa standar progesteron (Rf 0,830) dan 11α -hidroksiprogesteron (Rf 0,554) maka dapat diketahui bahwa noda dengan Rf 0,554 sama dengan Rf standar 11α -hidroksiprogesteron dan noda dengan Rf 0,846 hampir sama dengan Rf standar progesteron. Jad dapat disimpulkan bahwa produk 11α -hidroksiprogesteron sudah terbentuk yang berarti kapang *Aspergillus niger* sudah aktif. Selanjutnya kapang yang sudah aktif ini dapat digunakan untuk proses biotransformasi.

4.2. Proses Biotransformasi dengan Variasi Konsentrasi tetes

Sebanyak 2 % inokulum dengan jumlah spora $3,78 \cdot 10^6$ sel/ml dimasukkan kedalam media biotransformasi dengan berbagai konsentrasi tetes (5, 20, 35, 50, 65 dan 80 gram/ liter).

Pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* UICC 159 dalam media tetes selama proses biotransformasi dapat diketahui dari berat kering kapang. Pertumbuhan kapang dalam media tetes meningkat dengan meningkatnya konsentrasi tetes : 5, 20, 35, 50 dan 65 gram/ liter selanjutnya mengalami penurunan pada konsentrasi tetes 80 gram/ liter (Lampiran 1).

Hal ini menunjukkan bahwa dalam media dengan konsentrasi tetes 65 gram/ liter kapang *Aspergillus niger* UICC 159 dapat tumbuh dengan baik karena sumber karbon untuk pertumbuhan dan metabolisme sel dapat tercukupi. Sedangkan dalam media dengan konsentrasi tetes 80 gram/ liter, pertumbuhan kapang *Aseprgillus niger* UICC 159 tidak terlalu baik, kemungkinan disebabkan karena kekentalan media yang diakibatkan oleh tetes, ckukup mengganggu pertumbuhan kapang. walaupun kebutuhan karbon terpenuhi.

4.2.1. Analisis Pendahuluan

Analisis pendahuluan produk biotransformasi dimaksudkan untuk mengetahui jumlah komponen dalam produk biotransformasi. Analisis dilakukan dengan cara kromatografi lapis tipis (TLC) menggunakan lempeng silika gel GF 254 dan eluen campuran kloroform : aseton = 7 : 3. Dari hasil TLC, dapat disimpulkan bahwa produk biotransformasi dengan berbagai konsentrasi tetes

(5, 20, 53, 50, 65 dan 80 gram/ liter mengandung 4 komponen yang ditandai dengan terbentuknya 4 noda pada lempeng silika gel (Lampiran 1).

Jika dibandingkan dengan standar progesteron dan 11α -hidroksi progesteron, maka dapat disimpulkan bahwa dalam produk biotransformasi terdapat senyawa progesteron, 11α -hidroksi progesteron dan 2 senyawa lain yang belum diketahui. Berarti enzim 11α -hidroksilase, yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* UICC 159 dalam media tetes, hanya mampu mengubah sebagian substrat progesteron menjadi 11α -hidroksiprogesteron.

4.2.2. Analisis dengan HPLC

Analisis kualitatif dan kuantitatif produk biotransformasi dilakukan dengan menggunakan alat HPLC Shimadzu LC- 6A Liquid Chromatograph.

Analisis kualitatif dimaksudkan untuk mengetahui jumlah komponen dalam produk biotransformasi. Dari kromatogram HPLC dapat diketahui bahwa dalam produk biotransformasi terkandung 5 komponen dengan waktu retensi (t_R) : 2,133, 3,098, 5,66, 7,037 dan 7,47 menit. Jika dibandingkan dengan standar progesteron dan 11α -hidroksiprogesteron maka dapat disimpulkan bahwa dalam produk biotransformasi terkandung 3 senyawa yaitu campuran progesteron, 11α -hidroksiprogesteron (produk biotransformasi) dan satu senyawa yang belum diketahui, yang diperkirakan bukan merupakan produk biotransformasi sebab pada kromatogram kontrol (tanpa mikroba) senyawa tersebut juga muncul (Lampiran 2)

Pada analisis kuantitatif dengan HPLC, terdapat hubungan linier antara konsentrasi senyawa dengan luas area. Jika konsentrasi senyawa dinyatakan dengan X (absis) dan luas area dengan Y (ordinat) maka persamaan garis :

$$Y = a + b X$$

Dari hasil pengukuran beberapa larutan standar 11α - hidroksi progesteron dan menggunakan regresi linier maka dapat diperoleh persamaan garis :

$$Y = - 8405,333 + 1038 X$$

Hasil pengukuran produk biotransformasi dengan alat HPLC Shimadzu LC - 6 A dan diinterpolasikan pada garis regresi hasil maka dapat diperoleh % produk 11α -hidroksiprogesteron.

(Lampiran 3 tabel 4)

Dari hasil analisis statistik ANOVA satu arah dan uji jarak berganda Duncan maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi tetes dalam media biotransformasi berpengaruh pada % produk biotransformasi dan konsentrasi tetes 65 gram/ liter merupakan konsentrasi optimum.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. *Aspergillus niger* UICC 159 yang ditumbuhkan pada media tetes mampu mentransformasi progesteron menjadi 11α -hidrokosi progesteron.
2. *Aspergillus niger* UICC 159 sebanyak $3,78 \cdot 10^6$ sel/ml dalam media tetes 65 gram/ liter mampu mentransformasi progesteron menjadi 11α -hidroksiprogesteron sebanyak 22,259 %.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kondisi optimum biotransformasi sehingga dapat diperoleh produk 11α - hidroksiprogesteron maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Ade Arsianti, Karya Utama Sarjana Kimia, FMIPA UI, Depok, 1995.
- Adharonowitz, Y.; Cohen, G., The Microbiological Production Of Pharmaceutical, Sci. Am., 245, pp 106-118, 1981.
- Corinthian Infopharma Corpora, P.T., Study on Pharmaceutical Industry and Marketing in Indonesia-1990, PT CIC, 1990.
- Cueger, w., Biotechnology, Microbial Transformation, 1980.
- El-Kady, I.A.; Metwali, M. R ., 17 α -hydroxylation Of Progesteron by *Cunninghamella echinulata* on a laboratory Scale, Qatar Univ. , 5, pp 145-152, 1985.Sci. Bull
- Goodman, L.S.; Gillman, A. G., The Pharmaceutical Basis Of Therapeutics, 5th ed., Mc Graw Hill, New York, 1977.
- Hanisch, W.H.; Dunnill, P. ; Lily, M.D., Optimation Of the Production of Progesterone 11 α -hydroxylasemby *Rhizopus nigricans*; Biotech. and Bioeng, 22, pp 355-570, 1980.
- Honig, P., Principles of Sugar Technology, Elsevier Publ., New York, 1963.
- Kieslich, K., Biotechnology, Biotransformation, Verlag Chemie, vol. 6 a, Weinheim, 1984.
- Mahato, S.B.; Mukherjee, A., Steroid Transformation by microorganisms I , Phytochemistry, 23, pp 2131, 1984.
- Mahato, S.B.; Banerjee, S., Steroid Transformation by microorganisms II, Phytochemistry, 24, pp 1423, 1985.
- Peterson, D.H.; Murry, H.C., Microbial Transformation of Steroid- Introduction of Oxygenase Carbon-11 of Progesteron, J.A.C.S., 74, pp 5933 - 5936, 1952.
- Prihantini, N.B., Karya Utama Sarjana Biologi, FMIPA UI, Jakarta, 1987.
- Raper, K. B.; Sennel, P.T., The Genus *Aspergillus*, The williams and Wilkins Company, Baltimore, 1965.
- Sebek, O.K.; Perlman, D., Microbial Transformation of Steroid and Sterol, Microbial Technology, vol. 1, Academic Press, New York, 1979.

- Sekarwati, Karya Utama Sarjana Kimia, FMIPA UI, Jakarta, 1993.
- Stanbury, P.F.; Whitaker, A., Principles of fermentation Technology, Pergamon Press, Oxford, 1986.
- Stoudt, T.W., Microbial Transformation of Steroid, Advance in Applied Microbiology, ed. 2, 1960.
- Tarigan, P., Sapogenin Steroid, Desertasi Doktor, FMIPA Universitas Pajajaran, Bandung, 1980.
- Vezina, C., Biotransformations, Basic Biotechnology, ed. I, Bu'lock and Kristiasen, Academic Press, London, 1987.

Lampiran 1.

Tabel 1. Berat Kering Kapang setelah Proses Biotransformasi

Konsentrasi tetes (gr/lt)	5	20	35	50	65	80
berat kering kapang (gram)	0,109	0,145	0,171	0,261	0,298	0,217
	0,114	0,138	0,193	0,276	0,294	0,231
	0,125	0,153	0,228	0,244	0,336	0,212
Rata-rata	0,116	0,146	0,198	0,260	0,309	0,219

Tabel 2. Hasil TLC Produk Biotransformasi

Konsentrasi tetes(gr/lt)	5	20	35	50	65	80
Rf	1. 0,554	0,569	0,554	0,538	0,538	0,538
	2. 0,738	0,738	0,723	0,754	0,738	0,723
	3. 0,846	0,846	0,831	0,831	0,846	0,846
	4. 0,892	0,892	0,892	0,907	0,907	0,907

Progesteron standar $R_f = 0,830$
 11 α -hidroksiprogesteron standar $R_f = 0,554$

Lampiran 2. Kromatogram HPLC

Kondisi Analisis :

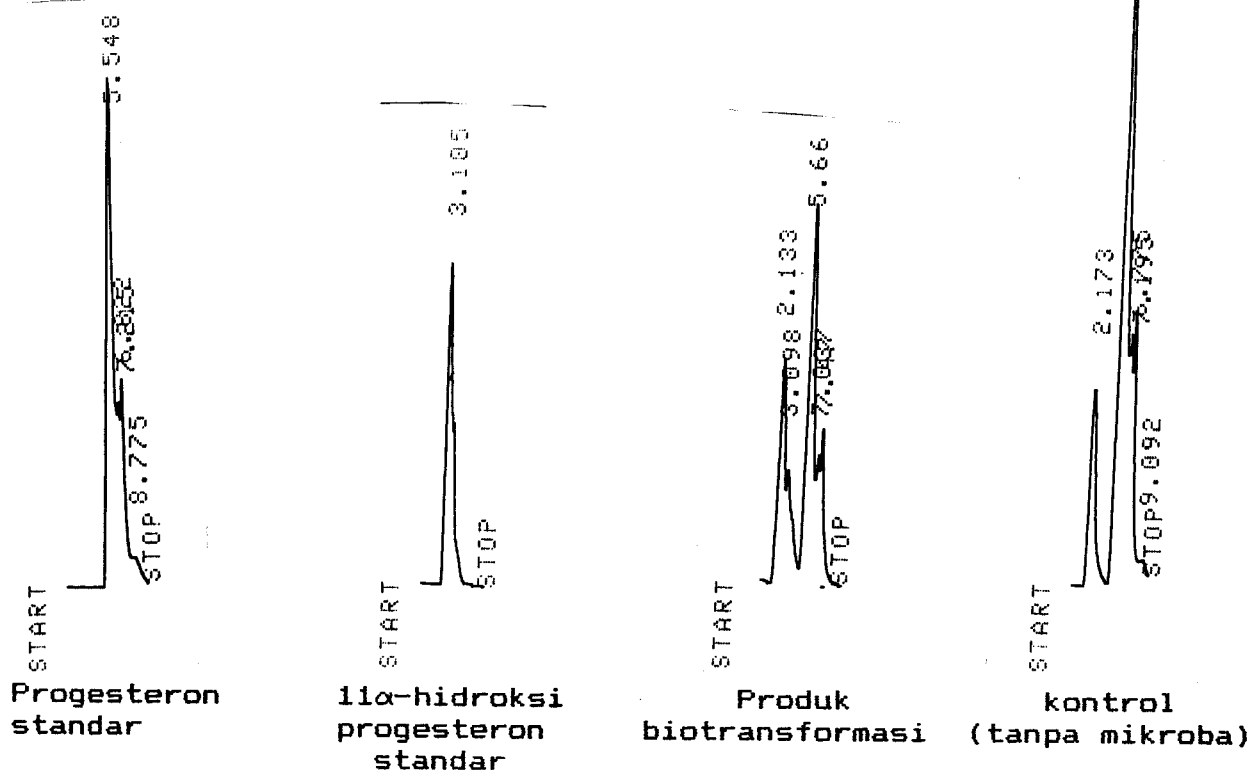
Kolom : Shimpack CLC - C8
 Fasa gerak : metanol : air = 4 : 1
 Kecepatan alir : 1,5 ml/ menit
 Panjang gelombang : 250 nm

LIST WIDTH(0)

ANALYSIS PARAMETER FILE 0

WIDTH 5
 DRIFT 0
 T.DBL 0
 ATTEN 3
 METHOD\$ 41
 SPL.WT 100

SLOPE 70
 MIN.AREA 1000
 STOP.TM 20
 SPEED 1
 FORMAT\$ 0
 IS.WT 1



Gambar 1. Kromatogram HPLC

Lampiran 3. Analisis Kuantitatif Produk Biotransformasi

Pada analisis kuantitatif dengan HPLC, terdapat hubungan linier antara konsentrasi senyawa dengan luas area. Jika konsentrasi senyawa dinyatakan dengan X (absis) dan luas area dengan Y (ordinat) maka persamaan garis dapat ditulis :

$$Y = a + b X$$

a = perpotongan garis pada sumbu Y (intersep)

b = kemiringan garis

$$a = \frac{\sum Y - b \sum X}{n} \quad b = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

Derajat kelinieran kurva dinyatakan dengan koefisien regresi (r) yang mempunyai nilai antara - 1 sampai + 1

$$r = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{\{ (n \sum X^2 - (\sum X)^2) (n \sum Y^2 - (\sum Y)^2) \}^{1/2}}$$

Jika $r = 1$, dikatakan korelasi antara X dan Y sempurna. Dalam prakteknya, r yang digunakan biasanya lebih besar dari 0,99.

Dari hasil pengukuran beberapa larutan standar 11 α -hidroksi progesteron pada alat HPLC Shimadzu LC - 6 A diperoleh data sebagai berikut :

Tabel 3. Luas Area 11 α -hidroksiprogesteron standar

Konsentrasi (ppm)	Luas Area
25	16538
50	43639
75	72418
100	94107
125	119626
150	148292

Dengan menggunakan rumus regresi linier dapat diperoleh persamaan garis :

$$Y = - 8405,333 + 1038,194 X$$

Gambar 2. Kurva Kalibrasi 11 α -hidroksiprogesteron standar

Garis regresi hasil perhitungan dapat digunakan untuk mencari konsentrasi sampel dengan cara interpolasi.

Dari hasil pengukuran produk biotransformasi pada berbagai konsentrasi tetes dan diinterpolasikan pada garis regresi hasil perhitungan maka dapat diketahui % produk 11α -hidroksi progesteron :

Tabel 4. Luas Area dan % produk 11α -hidroksiprogesteron

Kons. tetes (gr/liter)	Ulangan	Luas Area	Konsetrasi (ppm)	% produk	Rata-rata
5	1	20502	27,844	9,281	8,507 %
	2	18770	26,176	8,121	
	3	18764	26,169	8,121	
20	1	21557	28,86	9,62	9,739 %
	2	20724	28,058	9,353	
	3	23502	30,733	10,244	
35	1	32121	39,035	13,012	12,505 %
	2	30122	37,11	12,37	
	3	29383	36,398	12,133	
50	1	41087	47,672	15,89	15,657 %
	2	39815	46,446	15,482	
	3	40179	46,797	16,599	
65	1	61314	67,154	22,385	22,259 %
	2	59036	64,96	21,653	
	3	62417	68,217	22,739	
80	1	355091	41,896	13,965	14,614 %
	2	39192	45,847	15,282	
	3	37057	43,789	14,596	

Lampiran 4 Rumus statistik uji homogenitas, uji anova satu arah dan uji jarak berganda Duncan

1. Rumus statistik uji homogenitas

Pengujian homogenitas sampel pada tiap perlakuan digunakan uji Bartlett, dengan mencari harga χ^2 (chi-kuadrat), $\alpha = 0,05$

Harga χ^2 dihitung dengan rumus : $\chi^2 = M/C$

$$M = 2,3036 (db) (a \log \bar{s}^2 - \sum \log s^2)$$

$$C = 1 + \frac{a + 1}{3 (db) (a)}$$

db = derajat kebebasan = jumlah perlakuan - 1

a = jumlah perlakuan

s^2 = variansi masing-masing perlakuan

$$\bar{s}^2 = \frac{\sum s^2}{a}$$

Aturan keputusan

Bila χ^2 perhitungan $> \chi^2_0$ (db, $\alpha=0,05$), maka asumsi homogenitas ditolak.

Bila χ^2 perhitungan $< \chi^2_0$ (db, $\alpha=0,05$), maka asumsi homogenitas diterima.

2. Rumus statistik uji anova satu arah

Sumber variasi	JK	DB	RK	F
Perlakuan	$n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$h-1$	JKp/DBp	RKp/RKg
Galat	$\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$h(n-1)$	JKg/DBg	
Total	$\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x})^2$	$hn-1$		

Keterangan :

- JK = jumlah kuadrat
- JKp = jumlah kuadrat perlakuan
- JKg = jumlah kuadrat galat
- DB = derajat kebebasan
- DBp = derajat kebebasan perlakuan
- DBg = derajat kebebasan galat
- RK = Rata-rata Jumlah Kuadrat
- Rkp = Rata-rata jumlah kuadrat perlakuan
- RKg = Rata-rata jumlah kuadrat galat
- x_i = hasil pengukuran berulang
- x_{ij} = hasil pengukuran untuk setiap perlakuan
- $\bar{x}_i$ = Rata-rata pengukuran berulang
- $\bar{x}$ = Rata-rata dari pengukuran berulang
- n = Banyaknya pengulangan
- h = jumlah perlakuan

Aturan keputusan :

H_0 : Tidak terdapat perbedaan rata-rata akibat beda perlakuan

H_1 : Terdapat paling sedikit dua rata-rata yang tidak sama akibat perlakuan.

Tolak H_0 jika F perhitungan $> F (DBp; DBg, \alpha=0,05)$

Terima H_0 jika F perhitungan $< F (DBp; DBg, \alpha=0,05)$

3. Rumus statistik uji jarak berganda Duncan

$$S_y = \frac{\text{Rata-rata jumlah kuadrat galat}}{n} \quad \frac{1}{2}$$

Mencari faktor R

$$R(2 \text{ sampai ke-} n) = R(2 \text{ sampai ke-} n), DBg; 0,05 \times S_y$$

Kemudian mengurutkan harga rata-rata data dari yang terkecil sampai yang terbesar. Setelah itu menghitung selisih dua rata-rata dan membandingkannya dengan harga R.

Aturan Keputusan :

H₀ : tidak ada perbedaan berarti akibat perlakuan

H₁ : Terdapat perbedaan berarti akibat perlakuan

Tolak H₀ jika rata-rata₂ - rata-rata₁ > R

Terima H₀ jika rata-rata₂ - rata-rata₁ < R

Lampiran 5.

Analisis Statistik Pengaruh Konsentrasi tetes terhadap
Pembentukan 11 α -hidroksiprogesteron

Tabel Pengaruh Konsentasi (gram/liter) terhadap
Produk 11 α -hidroksiprogesteron

Ulangan	Konsentrasi tetes (gram/liter)					
	5	20	35	50	65	80
1	9,281	9,62	13,012	15,89	22,385	13,965
2	8,121	9,353	12,37	15,482	21,653	15,282
3	8,121	10,244	12,133	15,599	22,739	14,596
Rata-rata	8, 507	9,739	12,505	15,657	22,259	14,614
Deviasi standar (s)	0,669	0,457	0,455	0,21	0,307	0,433
Jumlah	25,523	29,217	37,515	46,971	66,777	43,843

a. Uji omogenitas

Hasil perhitungan data dengan uji Bartlett, diperoleh :

$$M = 433,95 ; C = 1,078 ; M/C = \lambda^2 = ,217,125$$

$$\text{Nilai } \lambda_0^2 \text{ tabel } (0,05; 5) = 11,07$$

Karena λ^2 perhitungan tabel maka asumsi homogenitas ditolak.

b. Uji Anova satu arah

Sumber variasi	Jml Kuadrat	der. keb.	Rata-rata kuadrat	F
Perlakuan	Jkp= 385,439	5	RKp= 73,088	326,29
Galat	Jkg= 2,687	12	RKg= 0,224	
Total	JKt= 368,126	17		

Nilai F dari tabel (5; 12; $\alpha = 0,05$) adalah 3,11

Nilai F hitungan adalah 326,29. Karena nilai F hitungan

F tabel maka H_0 ditolak dan H_1 diterima, berarti terdapat paling sedikit dua rata-rata yang tidak sama akibat beda perlakuan.

c. Uji Jarak Berganda Duncan

Harga R	Kons tetes gram/liter	Harga rata-rata	Beda harga rata-rata					
			5	20	35	80	50	65
$R_2 = 1,041$	5	8,507	-	1,232	4,435	6,107	7,15	13,752
$R_3 = 0,849$	20	9,739	-	-	2,766	4,88	6,918	12,525
$R_4 = 0,737$	35	12,505	-	-	-	2,109	3,152	9,754
$R_5 = 0,659$	80	14,614	-	-	-	-	1,043	7,645
$R_6 = 0,601$	50	15,657	-	-	-	-	-	6,602
	65	22,259	-	-	-	-	-	-

$\text{Rata-rata}_2 - \text{rata-rata}_1 > R$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima berarti terdapat perbedaan yang cukup berarti akibat beda perlakuan