

NICHE Journal of Tropical Biology

Available online: <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/niche>

Purifikasi asam 5-aminolevulinat dari kultur bakteri strain B10 dengan *ion exchange*

Purification of 5-aminolevulinic acid from strain B10 bacterial culture by ion exchange

Hasna Maheswari^{a)}, Agung Suprihadi^{a)*}, Nurhayati^{a)}, dan Silva Abraham^{b)}

^{a)}Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Jl. Prof Soedharto, SH, Tembalang, Semarang 50275

^{b)}Pusat Teknologi Bioindustri, TAB-BPPT, Gedung LABTIAB (614) Lt 2, PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang Selatan 15314

A B S T R A C T

5-aminolevulinic acid (5-ALA) is an intermediate precursor for the biosynthesis of tetrapyrrol compounds which are widely applied in agriculture. Purification needs to be done since the impurity components are still obtained during production by fermentation. The aim of this research is to detect 5-ALA compounds after purification by ion exchange techniques, and to differentiate the 5-ALA concentrations in the ion exchange purified eluate. Research methods include subculture of bacterial isolates of strain B10, analysis of bacterial growth and detection of 5-ALA, pH measurement, 5-ALA fermentation, 5-ALA crude production, ion exchange purification, 5-ALA analysis with TLC test and UV-Vis spectrophotometer (553 nm), as well as data analysis. This study used a single factor that distinguishes 5-ALA levels after three times elution by ion exchange techniques using the Paired Sample T-test. The results of the study showed that the TLC test had a pink stain, indicated the 5-ALA contained. The test results with a UV-Vis spectrophotometer showed the highest 5-ALA concentration in the second eluate. The results of the analysis using the Paired Sample T-test, exhibited no significant difference ($\text{Sig.} > 0,05$) from the three eluate results of 5-ALA purification. Results from research shows that the product of 5-ALA fermentation of bacterial culture strain B10 can be purified by ion exchange techniques.

Keywords: 5-ALA, Purification, Ion Exchange, Bacteria Strain B10

A B S T R A K

Asam 5-aminolevulinat (5-ALA) adalah prekursor intermediet untuk biosintesis senyawa tetrapirrol yang banyak diaplikasikan dalam bidang pertanian. Purifikasi perlu dilakukan karena masih diperoleh komponen pengotor saat produksi dengan fermentasi. Tujuan penelitian, yaitu mengetahui senyawa 5-ALA setelah dipurifikasi dengan teknik *ion exchange*, serta membedakan konsentrasi 5-ALA pada eluat hasil purifikasi *ion exchange*. Metode penelitian meliputi peremajaan isolat bakteri strain B10, analisis pertumbuhan bakteri dan deteksi 5-ALA, pengukuran pH, fermentasi produksi 5-ALA, produksi *crude* 5-ALA, purifikasi dengan *ion exchange*, analisis 5-ALA dengan uji KLT dan spektrofotometer UV-Vis (553 nm), serta analisis data. Penelitian menggunakan faktor tunggal yaitu membedakan kadar 5-ALA setelah tiga kali elusi dengan teknik *ion exchange* menggunakan uji *Paired Sample T-test*. Hasil dari penelitian, pada uji KLT terdapat noda merah muda, mengindikasikan kandungan 5-ALA. Hasil uji dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan konsentrasi 5-ALA tertinggi terdapat pada eluat kedua. Hasil analisis menggunakan uji *Paired Sample T-test* menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($\text{Sig.} > 0,05$) dari ketiga eluat hasil purifikasi 5-ALA. Berdasarkan hasil penelitian tersebut disimpulkan bahwa produk 5-ALA dari fermentasi kultur bakteri strain B10 dapat dipurifikasi dengan teknik *ion exchange*.

Kata kunci: 5-ALA, Purifikasi, Ion Exchange, Bakteri Strain B10

*Penulis korespondensi: agungsuprihadi61@gmail.com

Diterima 7 Februari 2021, Disetujui 19 Maret 2021

Disarankan menyitasi artikel ini sebagai: Maheswari et al, *NICHE J Trop Bio* (2022) 4(2) 46-55

I. PENDAHULUAN

Asam 5-aminolevulinat (5-ALA) ialah asam amino dengan lima karbon non-proteinogenik, yang merupakan prekursor untuk biosintesis senyawa tetrapirrol, seperti heme, klorofil dan vitamin B12 (Liu *et al.* 2016). Senyawa 5-ALA memiliki sifat hidrofilik, serta zwitterionik (Maliszewska *et al.*, 2020) karena adanya dua muatan. Asam amino dalam larutan berair akan terionisasi untuk membentuk ion dipolar, atau zwitter karena memiliki dua muatan yang berlawanan. Asam amino juga bersifat amfoter, yaitu adanya gugus asam dan basa pada suatu molekul (Fearon, 2014). Struktur zwitter-ion pada suatu biomolekul memiliki medan listrik yang kuat di sekitarnya yang dapat menentukan sifat dan fungsi biomolekul tersebut (Yang & Zhou, 2014).

Senyawa 5-ALA adalah prekursor intermediet untuk biosintesis senyawa tetrapirrol yang banyak diaplikasikan dalam bidang pertanian. Fungsi 5-ALA pada tanaman, yaitu untuk membentuk senyawa tetrapirrol seperti klorofil yang dibutuhkan saat fotosintesis dan sebagai senyawa pengatur pertumbuhan. Menurut Wu *et al.* (2019), pada jalur biosintesis klorofil dari senyawa intermediet, dua molekul 5-ALA kemudian akan bergabung untuk membentuk cincin pirol, yang disebut porphobilinogen (PBG). Empat molekul PBG yang dikatalisis oleh PBG deaminase dipolimerisasi akan menjadi 1-hidroksimetilbillane (HMB), hingga terbentuk klorofil.

Pengaruh penyemprotan 5-ALA dengan tujuh jenis asam amino sebanyak 300 mg/l pada tanaman kurma memiliki pertumbuhan yang lebih baik. Tinggi tanaman, jumlah daun, berat basah dan kering, diameter batang, serta klorofil a dan klorofil b, menunjukkan nilai yang lebih tinggi pada masing-masing perlakuan penyemprotan 5-ALA dengan asam amino dibandingkan kontrol (Rasmia *et al.*, 2014). Aplikasi 5-ALA menunjukkan efek promotif pada hasil dan kualitas buah pohon kurma 'Rabia' dan 'Sukkariat-Yanbo' pada lingkungan gersang dengan meningkatkan konsentrasi klorofil dan asimilasi fotosintesis (Al-Qurashi & Awad, 2011). Pemberian 5-ALA dengan konsentrasi rendah dapat memacu pertumbuhan tanaman (Zhen *et al.*, 2012 dan Ali *et al.*, 2013).

Biosintesis 5-ALA terdiri dari dua jalur. Jalur pertama yaitu C-4, di mana glisin dan suksinil-KoA dikondensasikan menjadi 5-ALA yang dikatalisis oleh ALA sintase (ALAS) (Liu *et al.*, 2014). Pada jalur C-5 yaitu biosintesis dari glutamat yang melibatkan enzim glutamyl-tRNA sintase, glutamyl-tRNA reduktase dan glutamat-1-semialdehid aminotransferase (Sasaki *et al.*, 2002).

Senyawa 5-ALA yang tersedia secara komersial sangat mahal, seperti penerapannya di bidang pertanian, sehingga penggunaan mikroorganisme penghasil 5-ALA dipandang sebagai opsi yang menjanjikan karena lebih ekonomis (Nunkaew *et al.*, 2014). Purifikasi perlu dilakukan karena masih diperoleh komponen pengotor ketika proses produksi 5-ALA dengan fermentasi. Menurut Karekar *et al.* (2020), pada medium fermentasi mengandung bahan-bahan pengotor yang dapat menjadi masalah dalam suatu tahap produksi.

Teknologi yang dapat digunakan untuk memurnikan produk 5-ALA, yaitu pertukaran ion (*ion exchange*). Teknik *ion exchange* merupakan proses ketika ion dalam suatu larutan yang terikat pada fase diam, akan bertukar dengan ion pelarut. Fase diam dapat digunakan lagi karena sifatnya yang dapat kembali pada kondisi semula, setelah dilakukan regenerasi. Menurut Nesterenko (2018), pertukaran ion adalah pertukaran jumlah stoikiometrik ion antara dua fase yang berbeda, ketika adsorpsi atau dimasukkannya satu atau beberapa jenis ion ke dalam fase penukar ion, kemudian terjadi desorpsi atau pelepasan satu atau lebih ion lain ke dalam larutan.

Penukar ion adalah bahan padat atau cairan yang mengandung gugus fungsional bermuatan positif atau negatif, yang mampu mempertahankan ion bermuatan yang berlawanan dari larutan elektrolit. Pada saat yang sama, juga terjadi pertukaran jumlah ekuivalen dari ion muatan yang sama ke dalam larutan. Berdasarkan muatan listrik ion yang berperan dalam proses pertukaran ion, penukar ion dapat dibedakan menjadi penukar kation dan anion (Nesterenko, 2018). Resin Amberlite IR-120 menurut Franco *et al.* (2013), digunakan sebagai penukar ion dengan beberapa sifat resin seperti yang telah dideskripsikan Alguacil *et al.* (2004) bahwa resin Amberlite IR-120 merupakan resin kationik yang memiliki gugus fungsional sulfonat (SO_3^-), dengan bentuk ion Na^+ dan matriks berupa *Polystyrene-divinylbenzene copolymer*.

Penentuan kandungan 5-ALA dapat menggunakan reagen Ehrlich, dengan menyiapkan sampel yang dicampur buffer asetaldehida-aseton, lalu ditempatkan pada suhu 100°C dan didinginkan pada suhu 0°C , kemudian sampel direaksikan dengan reagen Ehrlich (Novak *et al.*, 2017). Penelitian bertujuan untuk mengetahui senyawa 5-ALA setelah dipurifikasi dengan teknik *ion exchange*, serta membedakan konsentrasi 5-ALA pada eluat hasil purifikasi *ion exchange*.

II. MATERI DAN METODE

Peremajaan Isolat dan Persiapan Analisis Kultur Bakteri

Isolat diinokulasikan pada medium LB miring, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Peremajaan bakteri strain B10 dilakukan pada 10 buah tabung medium agar miring untuk stok isolat. Persiapan untuk analisis pertumbuhan dan deteksi 5-ALA dari kultur bakteri strain B10 disiapkan dengan menuangkan 5 ml medium LB *broth* ke agar miring berisi inokulum bakteri yang sudah aktif secara aseptis. Jarum ose bulat digunakan untuk melepas koloni bakteri dari agar miring secara hati-hati dan divortex agar homogen dengan medium LB *broth*. Suspensi bakteri sebagai inokulum dimasukkan pada medium LB *broth*, sehingga volume kultur menjadi 300 ml. Kultur bakteri strain B10 dishaker menggunakan kecepatan 133 rpm dengan suhu 30°C, lalu disampling untuk analisis pertumbuhan bakteri dan deteksi 5-ALA.

Analisis Pertumbuhan Bakteri Strain B10

Analisis pertumbuhan bakteri dilakukan selama 24 jam dengan interval waktu sampling 4 jam, melalui pengukuran kerapatan sel berdasarkan nilai OD (*optical density*), serta dilakukan penanaman bakteri menggunakan metode TPC untuk pemeriksaan kembali sel bakteri yang hidup. Sampling dari kultur bakteri strain B10 yang diambil untuk analisis pertumbuhan dan deteksi 5-ALA yaitu sebanyak 1 ml, lalu disimpan pada *microtube* steril dan disentrifuge dengan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan pada *microtube* steril yang baru untuk selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi untuk mengetahui kandungan 5-ALA, dan disimpan sementara di lemari pendingin.

Pengukuran OD dilakukan setelah didapatkan pelet yang dibilas dengan 1 ml akuades steril, lalu divortex dan disentrifuge dengan 12.000 rpm selama 5 menit. Pembilasan pelet dilakukan sebanyak dua kali sampai supernatan jernih, sehingga sampel hanya berisi sel bakteri saja. Pada pembilasan terakhir, supernatan dibuang dan pelet ditambah 1 ml akuades steril, lalu divortex dan 1 ml sampel yang sudah homogen dipindahkan ke kuvet untuk diukur tingkat kekeruhan dari biomassa selnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm dan 0,5 McFarland untuk blankonya sebagai pembanding untuk standar kekeruhan sel bakteri.

Analisis Deteksi 5-ALA

Pengukuran nilai absorbansi untuk mendeteksi kehadiran 5-ALA pada kultur bakteri strain B10 dilakukan selama 24 jam dengan interval waktu 4 jam. Supernatan yang sudah dipindahkan pada *microtube* yang baru, kemudian diambil 100 µl ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml buffer asetat, lalu divortex. Tabung reaksi ditutup menggunakan selotip, dan dimasukkan dalam *waterbath* dengan suhu 90°C selama 15 menit. Sampel direndam dalam air es dan divortex. Reagen Ehrlich ditambahkan sebanyak 3,5 ml dan divortex kembali, lalu diamati perubahan warnanya.

Sebanyak 1 ml sampel dipindahkan dalam kuvet, lalu diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 553 nm dengan akuades yang dijadikan blankonya. Data nilai absorbansi yang diperoleh dari hasil sampling pada jam ke-0, jam ke-4, jam ke-8, jam ke-12, jam ke-16, jam ke-20, dan jam ke-24, dimasukkan pada persamaan linear kurva standar untuk mengganti nilai x, sehingga konversi nilai konsentrasi 5-ALA (y) akan didapatkan. Kurva standar dibuat menggunakan 5-ALA bulk (tingkat kemurnian 90%) yang diencerkan terlebih dahulu menjadi 0 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, dan 500 µM.

Pengukuran pH

Selama analisis produksi 5-ALA dengan waktu fermentasi 24 jam dilakukan pula pengukuran pH setiap 4 jam menggunakan pH meter.

Fermentasi Produksi 5-ALA

Persiapan tahap fermentasi dilakukan dengan mengetahui terlebih dahulu laju pertumbuhan spesifik (μ), menggunakan data TPC (CFU/ml). Menurut Goswami & Kalita (2011) dalam Gour *et al.* (2016), laju pertumbuhan spesifik (μ) dapat dihitung dengan rumus:

$$\ln N_t - \ln N_0 = \mu (t - t_0)$$

N_t adalah jumlah sel pada akhir fase log, N_0 adalah jumlah sel pada awal fase log, T_t adalah waktu akhir fase log dan T_0 adalah waktu awal fase log. Hasil dari perhitungan nilai μ pada setiap data TPC, ditentukan nilai tengahnya ketika di fase eksponensial. Nilai tengah μ yang didapat merupakan acuan penentuan waktu yang tepat untuk inokulasi, sehingga pertumbuhan bakteri dapat optimum tanpa terbentuknya fase lag. Menurut pendapat Nicola *et al.* (2019), fase

awal dengan periode lag (λ) akan diikuti oleh fase pertumbuhan eksponensial (disebut juga fase log, dengan laju pertumbuhan μ).

Pembuatan *starter* untuk produksi 5-ALA dibuat dengan 10% suspensi inokulum bakteri untuk medium LB *broth* sebanyak 50 ml. Waktu inokulasi *starter* pada medium fermentasi kultur, disesuaikan berdasarkan waktu dari nilai tengah μ . Produksi 5-ALA dari bakteri strain B10 dilakukan dengan menginokulasi 50 ml *starter*, sehingga volume akhir menjadi 500 ml. Kultur bakteri difermentasi selama 24 jam dan dishaker 133 rpm pada suhu 30°C.

Produksi *Crude* 5-ALA

Hasil fermentasi sebanyak 500 ml yang dipanen setelah 24 jam dipindahkan pada *corning* dan ditimbang terlebih dahulu dengan *table balance* agar seimbang ketika dimasukkan dalam sentrifuge. Sampel dipisahkan menjadi dua fase dengan sentrifugasi 7.000 rpm dengan suhu 22°C, selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke erlenmeyer dan disimpan dalam *cold room* dengan suhu 4-8°C, sedangkan biomassa berupa pelet yang mengendap dibuang. Supernatan dijadikan sampel sebagai produk *crude* 5-ALA (tanpa purifikasi) yang akan diuji kualitatif menggunakan KLT dan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis, serta ada pula yang disiapkan untuk tahap purifikasi.

Purifikasi dengan *Ion Exchange*

Fase diam atau penukar ion yang dipakai yaitu resin kation Dowex IR 100 Na-Amberlite, sedangkan fase gerak atau eluen menggunakan natrium asetat 1 M. Resin direndam dengan 5 ml HCl 4 N selama 4-5 jam, kemudian direndam dengan 5 ml HCl 1 N selama 4-5 jam. Perendaman oleh HCl bertujuan untuk mengaktifasi resin sebagai matriks yang akan mengikat kation 5-ALA. Pada penelitian Tripetch *et al.* (2013), resin harus diaktifasi terlebih dahulu menggunakan HCl 4 N dan HCl 1 N yang masing-masing digunakan untuk merendam resin selama 4-6 jam, sebelum pemurnian dengan *ion exchange*. Resin yang sudah diaktifasi, dibilas dengan 5 ml akuades, lalu dipindahkan ke buret yang memiliki panjang 41,5 cm dan diameter 2 cm sebagai kolom untuk *ion exchange*. Akuades ditambahkan ke kolom untuk membilas resin yang masih menempel di dinding kolom, dan akuades dibiarkan mengalir.

Hasil fermentasi (*crude*) sebanyak 3 ml dimasukkan pada kolom dengan resin yang sudah aktif, kemudian dibiarkan mengalir melewati resin. Eluen natrium asetat 1 M sebanyak 7 ml digunakan untuk sekali elusi yang ditambahkan perlahan-lahan pada dinding dalam kolom, lalu eluat dikumpulkan secara terpisah. Purifikasi *ion exchange* untuk *crude* 5-ALA dilakukan sebanyak tiga kali elusi. Eluat disimpan untuk diuji KLT dan pengukuran spektrofotometri UV-Vis pada analisis kandungan 5-ALA.

Analisis Kualitatif 5-ALA

Uji KLT dilakukan untuk mengetahui hadirnya 5-ALA dalam sampel berupa *crude* dan eluat, yang dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, dengan kontrol positifnya yaitu 5-ALA bulk 1000 μ M. Penentuan golongan senyawa pada uji KLT dilakukan dengan menjenuhkan *chamber* terlebih dahulu dengan fase gerak, menggunakan etil asetat : 2-propanol : 10% amonia dengan perbandingan 6:4:3 secara berurutan, dengan volume akhir 52 ml. Fase diam menggunakan *silica gel* 60 F₂₅₄. Batas bawah dan batas atas plat memiliki jarak 1 cm, sedangkan jarak antar sampel yaitu 1,5 cm. Fase diam diaktifkan dengan memasukkan plat dalam oven bersuhu 90°C selama 50 menit.

Sampel disiapkan dengan memindahkan 100 μ l sampel yang akan diuji ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml buffer asetat, lalu divortex. Tabung reaksi ditutup menggunakan selotip dan dimasukkan dalam *waterbath* yang sudah bersuhu 90°C. Proses pemanasan dilakukan selama 15 menit, kemudian direndam dalam air es selama 10 menit dan divortex.

Sampel ditotolkan sebanyak 15 kali pada plat menggunakan pipa kapiler dan langsung dikeringkan dengan *hairdryer*. Plat absorben dimasukkan pada *chamber* yang sudah jenuh dan ditutup rapat. Elusi dilakukan hingga pelarut hampir mencapai batas atas, kemudian plat diambil dengan bantuan pinset dan dikeringkan dengan *hairdryer*, lalu dimasukkan ke oven yang bersuhu 90°C selama 15 menit. Plat yang sudah kering, selanjutnya diamati terlebih dahulu di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Plat disemprot dengan Ehrlich secara merata di dalam ruang asam. Plat dikeringkan dan diamati adanya perubahan warna, lalu nilai Rf dihitung, sesuai dengan Bele & Khale (2011):

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda dari titik awal}}{\text{Jarak pelarut dari titik awal}}$$

Analisis Kuantitatif 5-ALA

Semua sampel yang akan diuji, masing-masing diambil 100 μ l ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml buffer asetat, lalu divortex. Tabung reaksi ditutup menggunakan selotip dan dipanaskan selama 15 menit dengan *waterbath* bersuhu 90°C. Sampel direndam dalam air es selama 10 menit dan divortex, kemudian ditambahkan 3,5 ml Ehrlich dan divortex agar homogen. Perubahan warna menjadi merah muda diamati selama 15 menit. Setiap sampel diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 553 nm, dengan akuades sebagai blanko. Menurut Hijaz & Killiny (2016), intensitas warna merah muda yang dihasilkan dari reaksi pirol yang dimiliki 5-ALA dengan reagen Ehrlich, lalu dibaca pada 553 nm menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi 5-ALA dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi ke persamaan linear kurva standar.

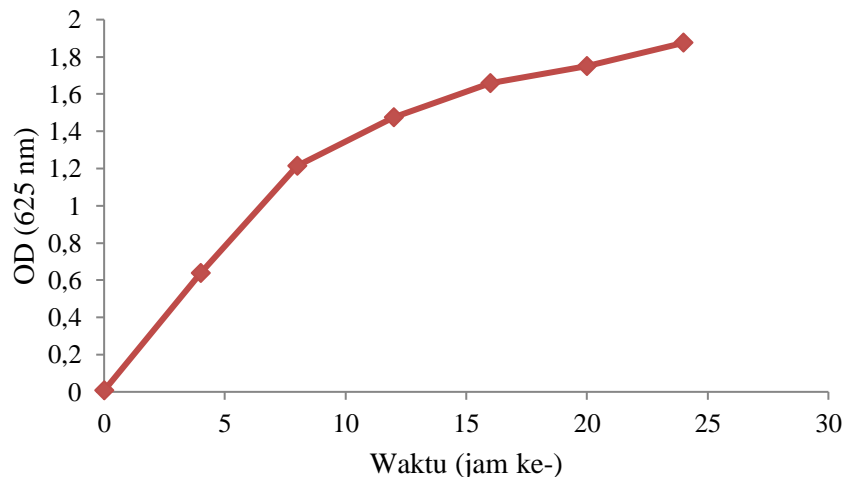
Analisis Data

Perbedaan konsentrasi 5-ALA antara eluat ke-1, eluat ke-2, dan eluat ke-3 diuji menggunakan *Paired Sample T-Test* pada aplikasi SPSS (*Statistical Product Service Solution*), dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Pertumbuhan Bakteri B10

Berdasarkan data absorbansi bakteri strain B10 selama 24 jam inkubasi, terdapat adanya peningkatan nilai kepadatan sel. Peningkatan absorbansi mengindikasikan jumlah bakteri yang meningkat karena pembelahan sel. Pengukuran turbiditas menurut Bakar *et al.* (2015), dapat mengukur tingkat kekeruhan kultur dan dapat digunakan untuk mengetahui jumlah sel dalam kultur. Hasil penelitian mengenai pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* pada penelitian Zhu *et al.* (2013) menunjukkan adanya peningkatan nilai OD₆₀₀ hingga 24 jam ditumbuhkan pada medium LB. Hasil pengukuran OD yang diperoleh, dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri strain B10 berdasarkan OD

Pertumbuhan bakteri berdasarkan OD menjadi acuan untuk mengetahui sudah terbentuknya produk 5-ALA, dan waktu pemanenan yang kemudian dilanjutkan dengan pemurnian. Berdasarkan Gambar 1, jam ke-24 merupakan waktu pemanenan 5-ALA karena banyaknya jumlah sel yang dapat memproduksi senyawa 5-ALA. Menurut Zhang *et al.* (2015), produk 5-ALA dari fermentasi strain *E. coli* rekombinan, sudah dapat dihasilkan pada jam ke-12 dan dipanen pada akhir tahap fermentasi yaitu di jam ke-36. Kadar 5-ALA yang terus meningkat, berbanding lurus dengan hasil pertumbuhan bakteri berdasarkan OD selama 36 jam fermentasi.

Berdasarkan hasil pengukuran pH pada Tabel 1, diketahui bahwa tahap fermentasi bakteri strain B10 terdapat dalam rentang pH asam karena nilai pH yang menurun. Pemanenan 5-ALA dilakukan pada jam ke-24 dengan pH kultur asam.

Pada hasil penelitian Tan *et al.* (2019), menunjukkan senyawa 5-ALA diproduksi pada pH 4,5-5. Produksi senyawa 5-ALA terus meningkat dalam kisaran pH asam pada akhir fermentasi *E. coli* rekombinan selama 12 jam.

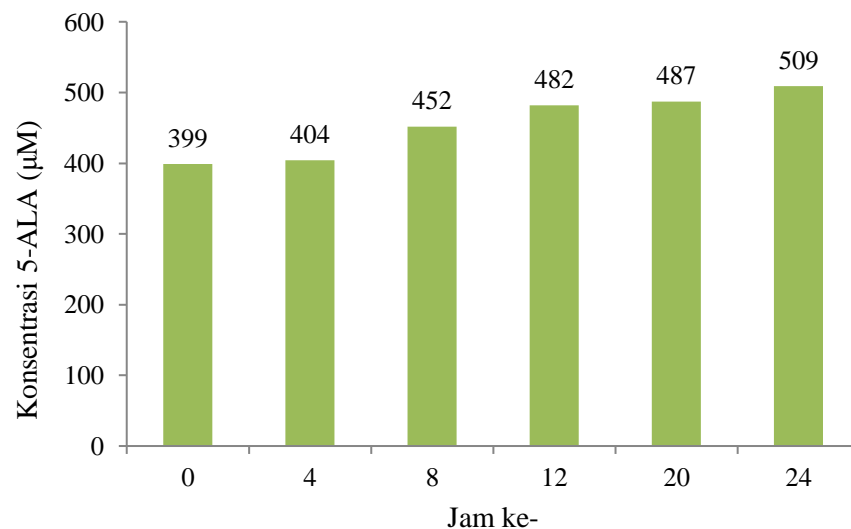
Tabel 1. Data pengukuran pH

Jam ke-	pH
0	5,67
4	5,33
8	4,95
12	5,02
16	4,97
20	5,15
24	5,04

Deteksi 5-ALA dari Kultur Bakteri Strain B10

Berdasarkan pengukuran konsentrasi 5-ALA yang dihasilkan bakteri strain B10, konsentrasi 5-ALA tertinggi terdapat pada jam ke-24. Hasil pengukuran konsentrasi 5-ALA memiliki kesinambungan dengan pengukuran OD bakteri strain B10 yang terus meningkat dan terdapat pada kisaran pH asam. Noh *et al.* (2017) melakukan penelitian yang mendukung, bahwa produksi 5-ALA dari *E. coli* setelah dikultivasi selama 18 jam, memiliki kadar 5-ALA tertinggi pada jam ke-18 yang berbanding lurus dengan nilai OD.

Hasil pengukuran konsentrasi untuk deteksi 5-ALA dari kultur bakteri strain B10, dapat ditampilkan pada Gambar 2.

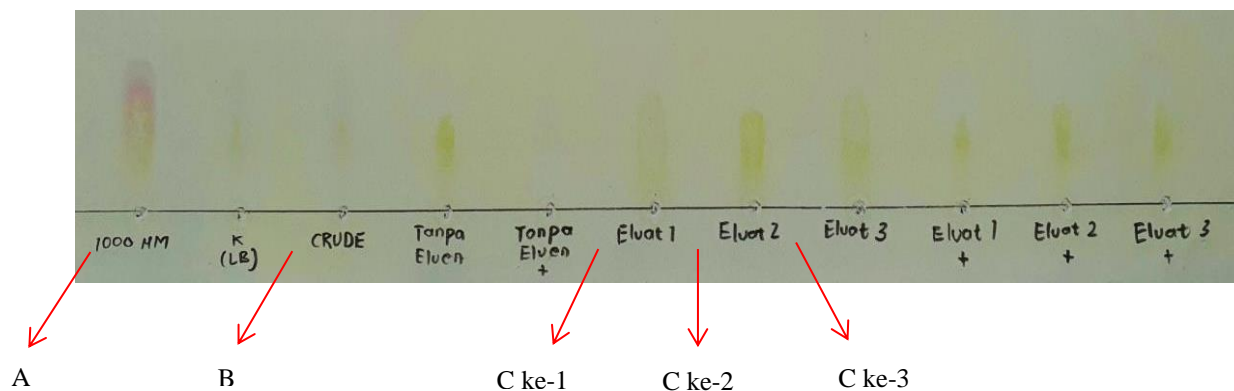


Gambar 2. Konsentrasi 5-ALA dari kultur bakteri B10

Produk 5-ALA dipanen pada jam ke-24, dan selanjutnya dilakukan purifikasi 5-ALA dengan teknik *ion exchange*. Produk 5-ALA yang dipanen pada akhir tahap fermentasi, juga dilakukan pada penelitian Yang *et al.* (2016) menggunakan *Corynebacterium glutamicum* rekombinan dengan penambahan glisin dan suksinat, yang difermentasi selama 50 jam.

Analisis 5-ALA Hasil Purifikasi dengan *Ion Exchange*

Senyawa 5-ALA di ketiga eluat maupun *crude* dapat dideteksi menggunakan metode KLT. Analisis 5-ALA menggunakan reagen Ehrlich diindikasikan dengan munculnya warna merah muda pada plat. Reaksi positif merah muda merupakan hasil positif terkait adanya 5-ALA yang merupakan senyawa indol yang diketahui melalui identifikasi menggunakan Ehrlich. Lamb *et al.* (2015) menyatakan bahwa reaksi dimethylaminobenzaldehyde dengan indol oleh uji Ehrlich akan memberikan warna produk menjadi merah muda. Hasil uji kualitatif 5-ALA dengan KLT ditampilkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil uji KLT 5-ALA setelah disemprot Ehrlich (A: 1000 μM 5-ALA bulk, B: *Crude* 5-ALA, C ke-1: eluat ke-1, C ke-2: eluat ke-2, C ke-3: eluat ke-3)

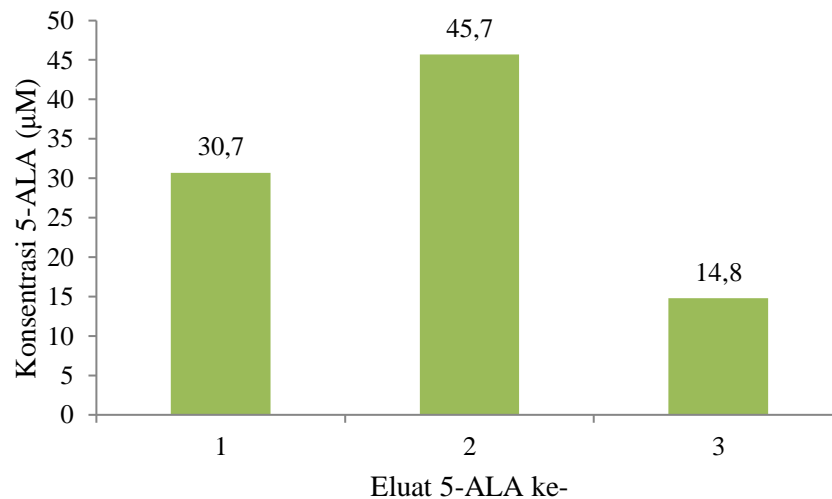
Identifikasi adanya produk 5-ALA dilakukan dengan menghitung nilai Rf pada plat setelah disemprot Ehrlich, yang ditampilkan pada Tabel 2. Pada analisis KLT digunakan kontrol positif 1000 μM 5-ALA bulk. Pada tahap awal dilakukan analisis terhadap produk 5-ALA pada sampel *crude*. Berdasarkan nilai Rf, sampel kontrol positif dan *crude* memiliki nilai Rf 0,23. Nilai Rf pada eluat ke-1, eluat ke-2, dan eluat ke-3 yang terukur yaitu 0,22. Menurut Ikushiro *et al.* (2018), analisis KLT dari campuran reaksi menghasilkan dua titik noda menggunakan ninhidrin dengan hasil uji positif yang tampak pada plat, yaitu untuk glisin menjadi berwarna ungu dengan Rf = 0,81, dan noda warna kuning dengan Rf = 0,66 untuk ALA standar.

Tabel 1. Pengukuran Rf kandungan 5-ALA dengan metode KLT

Sampel	Rf (Merah muda)
1000 μM 5-ALA Bulk	0,23
<i>Crude</i> 5-ALA	0,23
Eluat ke-1	0,22
Eluat ke-2	0,22
Eluat ke-3	0,22

Berdasarkan hasil analisis kuantitatif didapatkan bahwa konsentrasi 5-ALA tertinggi terdapat pada eluat ke-2 diikuti oleh eluat ke-1 dan eluat ke-3. Tingginya konsentrasi 5-ALA pada eluat ke-2 disebabkan lebih banyaknya 5-ALA yang terelusi. Menurut Acikara (2013), protein dengan muatan yang berlawanan akan terikat oleh gugus ionik pada resin, sehingga protein terkonsentrasi pada permukaan resin. Peningkatan kekuatan ion saat elusi, menggantikan protein yang melekat pada situs pengikatan resin. Penambahan kekuatan ion pada elusi berikutnya, akan menggantikan protein yang bermuatan lebih tinggi.

Produk 5-ALA hasil penelitian menggunakan isolat B10 telah berhasil dimurnikan dengan teknik *ion exchange* dan ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Konsentrasi 5-ALA pada eluat hasil purifikasi

Senyawa dengan muatan kation yang tinggi akan muncul setelah dilakukan tahap elusi awal, untuk mengeluarkan muatan kation yang rendah terlebih dahulu. Menurut Berg *et al.* (2002), teknik *ion exchange* memisahkan protein berdasarkan jumlah muatan. Protein yang memiliki muatan positif yang rendah, cenderung akan muncul lebih awal ketika terelusi, diikuti dengan protein yang memiliki muatan yang lebih tinggi.

Gugus aktif SO_3^- yang dimiliki resin pada *ion exchange* akan mengikat kation (H^+) yang dimiliki 5-ALA. Menurut Merclin & Beronius (2004), gugus akhir pada 5-ALA dapat membentuk ion COO^- dan NH_3^+ , sehingga molekul 5-ALA akan bermuatan positif jika terdapat dalam larutan asam. Resin dengan gugus aktif SO_3^- menjerap 5-ALA dalam bentuk zwitter-ion. Fotinos *et al.* (2006) menyatakan, bahwa lebih dari 90% dari semua molekul 5-ALA hadir sebagai zwitter-ion dan membawa muatan positif di terminal amina dan muatan negatif di terminal karboksilat. Menurut Novo *et al.* (1996) dalam Donnelly *et al.* (2007), zwitter-ion pada 5-ALA akan menentukan terbentuknya molekul kation atau anion pada 5-ALA. Larutan 5-ALA hanya stabil pada pH rendah, karena pada kondisi tersebut 5-ALA memiliki molekul kation dengan tidak adanya muatan anion.

Kation pada 5-ALA akan terdesorpsi oleh eluen yang membawa ion Na^+ untuk bersaing dengan kation pada 5-ALA yang terikat pada resin. Resin akan menangkap ion Na^+ dari eluen, dan mengakibatkan terjadinya pertukaran kation, sehingga ikatan ion antara 5-ALA dengan resin dapat terlepas. Menurut Berg *et al.* (2002), protein bermuatan positif yang terikat pada kolom dapat dilepaskan dengan meningkatkan konsentrasi NaCl atau garam lain, karena ion yang dimiliki Na akan bersaing dengan gugus bermuatan positif pada protein untuk terikat pada kolom. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa 5-ALA dapat dipurifikasi menggunakan teknik *ion exchange* dengan nilai konsentrasi tertinggi yang terdapat pada eluat kedua.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) yang telah membantu menyediakan sarana dan prasarana penulis dalam melaksanakan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Acikara, O. B. (2013). *Ion-Exchange Chromatography and Its Applications. Column Chromatography*. 10.5772/55744
- Alguacil, F. J., Alonso, M., & Lozano, L. J. (2004). Chromium(III) recovery from waste acid solution by ion exchange processing using Amberlite IR-120 resin: batch and continuous ion exchange modeling. *Chemosphere*, 57: 789–793.
- Ali, B., Huang, C. R., Qi, Z. Y., Ali, S., Daud, M. K., Geng, X. X., Liu, H. B., & Zhou, W. J. (2013). 5-Aminolevulinic acid ameliorates cadmium-induced morphological, biochemical, and ultrastructural changes in seedlings of oilseed rape. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 7256–7267. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1735-5>

- Al-Qurashi, A., D. & Awad, M., A. (2011). 5-Aminolevulinic acid increases tree yield and improves fruit quality of 'Rabia' and 'Sukkariat-Yanbo' date palm cultivars under hot arid climate. *Scientia Horticulturae*, 129: 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.014>
- Bakar, A. A., Rasol, R. M., Yahaya, N., Noor, N. Md., & Fahmy, M. K. (2015). Turbidity method to measure the growth of anaerobic bacteria related to microbiologically influenced corrosion. *Solid State Phenomena*, 227: 298–301. ISSN 1662-9779
- Bele, A. A. & Khale, A. (2011). Overview On Thin Layer Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2): 256–267. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(2\).256-67](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(2).256-67)
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry, Fifth Edition*. New York: W.H. Freeman. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>
- Donnelly, R. F., McCarron, P. A., & Woolfson, A. D. (2007). Derivatives of 5-aminolevulinic Acid for photodynamic therapy. *Perspectives in medicinal chemistry*, 1, 49–63. PMID: 19812736
- Fearon, W. R. (2014). Amino Acids and Protein Structure. An Introduction to Biochemistry, 135–157. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-0036-1.50016-1>
- Fotinos, N., Campo, M. A., Popowycz, F., Gurny, R., & Lange, N. (2006). 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, application and perspectives. *Photochem. Photobiol*, 82: 994–1015. <https://doi.org/10.1562/2006-02-03-IR-794>
- Franco, P. E., Veit, M. T., Borba, C. E., Gonçalves, G. C., Fagundes-Klen, M. R., Bergamasco, R., Silva, E. A., & Suzaki, P. Y. R. (2013). Nickel(II) and zinc(II) removal using Amberlite IR-120 resin: Ion exchange equilibrium and kinetics. *Chemical Engineering Journal*, 221: 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.006>
- Goswami, R. C. D. & Kalita, M. (2011). *Scenedesmus dimorphus* and *Scenedesmus quadricauda*: two potent indigenous microalgae strains for biomass production and CO₂ mitigation—A study on their growth behavior and lipid productivity under different concentration of urea as nitrogen source. *Journal Algal Biomass Utiln.* 2(4): 42–9.
- Gour, R. S., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R. S., & Kant, A. (2016). Characterization and Screening of Native *Scenedesmus* sp. Isolates Suitable for Biofuel Feedstock, *PLoS ONE* 11(5): e0155321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155321>
- Hijaz, F. & Killiny, N. (2016). A gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of delta-aminolevulinic acid in plant leaves. *Journal of Chromatography*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.041>
- Ikushiro, H., Nagami, A., Sawai, T. T., Shimeno, Y., Hori, H., Miyahara, I., Kamiya, N., & Yano, T. (2018). Heme-dependent Inactivation of 5-Aminolevulinic Synthase from *Caulobacter crescentus*. *Scientific Reports*, 8:14228. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32591-z>
- Karekara, S. C., Srinivasa, K., & Ahring, B. A. (2020). Continuous in-situ extraction of acetic acid produced by *Acetobacterium woodii* during fermentation of hydrogen and carbon dioxide using Amberlite FPA53 ion exchange resins. *Bioresource Technology Reports*, 12:100568. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100568>
- Lamb, A. C., Federico-Perez, R. A., & Xue, Z.-L. (2015). Product in indole detection by Ehrlich's reagent. *Analytical Biochemistry*, 484: 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.04.033>
- Liu, S., Zhang, G, Li, X., & Zhang, J. (2014). Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98:7349-57; PMID:25022665. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5925-y>
- Liu, D., Kong, D. D., Fu, X. K., Ali, B., Xu, L., & Zhou, W. J. (2016). Influence of exogenous 5-aminolevulinic acid on chlorophyll synthesis and related gene expression in oilseed rape de-etiolated cotyledons under water-deficit stress. *Photosynthetica*, 54(3): 468–474. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0197-7>
- Maliszewska, I., Wawrzyńczyk, D., & Wanarska, E. (2020). The effect of glucose and human serum on 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 29:101623. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101623>
- Merclin, N. & Beronius, P. (2004). Transport properties and association behaviour of the zwitterionic drug 5-aminolevulinic acid in water A precision conductometric study. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 21: 347–350. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.10.027>
- Nesterenko, Pavel N. (2018). *Ion Exchange—Overview*, In *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, edited by Paul Worsfold, Alan Townshend and Colin Poole, Elsevier, Oxford, 2005, 440–446.

- Nicola, L. & Baath, E. (2019). The Effect of Temperature and Moisture on Lag Phase Length of Bacterial Growth in Soil After Substrate Addition, *Soil Biology and Biochemistry*, 137: 107563. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107563>
- Noh, M. H., Lim, H. G., Park, S., Seo, S. W., & Jung, G. Y. (2017). Precise flux redistribution to glyoxylate cycle for 5-aminolevulinic acid production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 43, Part A, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.07.006>
- Novak, M., Pavlečić, M., Harutyunyan, B., Goginyan, V., Horvat, P., & Šantek, B. (2017). Characteristics and selection of cultures of photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 12 (3-4), 113–119. <https://hrcak.srce.hr/197800>
- Novo, M., Huttmann, G., & Diddens, H. (1996). Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 34: 143–148. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(96\)07285-5](https://doi.org/10.1016/1011-1344(96)07285-5)
- Nunkaew, T., Kantachote, D., Kanzaki, H., Nitoda, T., & Ritchie, R. J. (2014). Effects of 5-ALA containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17: 1. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.004>
- Rasmia, S. S. D., Kareim, A. H. E. A., & Mona, H. M. (2014). Effect of Foliar Spraying With 5- Aminolevulinic Acid and Different Types Amino Acids on Growth of Date Palm of Plantlets after Acclimatization in the Green House. *International Journal of Plant & Soil Science*, 3(10): 1317-1332. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2014/8436>
- Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., & Tanaka, T. (2002). Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58: 23–29. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0858-7>
- Tan, S., You, S., Shih, I., & Ng, I. (2019). Quantification, regulation and production of 5-aminolevulinic acid by green fluorescent protein in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.10.005>
- Tripetch, P., Szrednicki, G., & Borompichaichartkul, C. (2013). Separation Process of 5-Aminolevulinic Acid from *Rhodobacter spaeroides* for Increasing Value of Agricultural Product by Ion Exchange Chromatography. *Proc. Second Asia Pacific Symp. on Postharvest Research*. 1011: 265–271. [10.17660/ActaHortic.2013.1011.32](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1011.32)
- Wu, Y., Liao, W., Dawuda, M. M., Hu, L., dan Yu, J. (2019). 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review. *Plant Growth Regulation*. 87: 357–374. doi: 10.1007/s10725-018-0463-8
- Yang, G. & Zhou, L. (2014). Zwitterionic versus canonical amino acids over the various defects in zeolites: A two-layer ONIOM calculation. *Scientific Reports*, 4: 6594. doi: 10.1038/srep06594
- Yang, P., Liu, W., Cheng, X., Wang, J., Wang, Q., & Qi, Q. (2016). A New Strategy for Production of 5-Aminolevulinic Acid in Recombinant *Corynebacterium glutamicum* with High Yield. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9): 2709-2717. [10.1128/AEM.00224-16](https://doi.org/10.1128/AEM.00224-16)
- Zhang, J. Kang, Z., Chen, J., & Du, G. (2015). Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 5: 8584. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1942-2>
- Zhen, A., Bie, Z.L., Huang, Y., Liu, Z.X., dan Fan, M. L. (2012). Effects of 5-aminolevulinic acid on the H₂O₂-content and antioxidative enzyme gene expression in NaCl treated cucumber seedlings. *Biol Plant* 56: 566–570. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0118-y>
- Zhu, Z., Su, M., Ma, L., Ma, L., Liu, D., & Wang, Z. (2013). Preparation of graphene oxide–silver nanoparticle nanohybrids with highly antibacterial capability. *Talanta*, 117: 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.017>