

## DEGRADASI KOLESTEROL DAN KOPROSTANOL DALAM SEDIMEN SUNGAI

Iryanti Eka Suprihatin

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran*

*e-mail : iryantis@hotmail.com*

### ABSTRAK

Kolesterol dan senyawa steroid lain seperti koprostanol, kolestanol, epikoprostanol, dan lain-lain, telah lama digunakan sebagai indikator sumber pencemaran feses di perairan. Ini didasarkan pada keunikan komposisi steroid dalam feses setiap binatang. Analisis untuk menentukan sumber pencemaran dilakukan menggunakan perbandingan prosentase masing-masing senyawa dalam suatu sampel air atau sedimen. Oleh karenanya harus dipastikan ada tidaknya proses konversi satu senyawa steroid menjadi senyawa steroid yang lain di lingkungan, sehingga dapat ditentukan komposisi asli senyawa steroid dalam sampel. Makalah ini melaporkan studi mengenai degradasi kolesterol dan koprostanol dalam sedimen yang diambil dari sungai. Hasil studi menunjukkan tidak adanya konversi dari kolesterol maupun koprostanol menjadi senyawa steroid lain, sehingga komposisi senyawa steroid dalam suatu sampel akan menunjukkan komposisi awal dari sumber/pencemar, yang berarti dapat dipakai sebagai indikator sumber pencemaran. Degradasi kolesterol dan koprostanol mengikuti kinetika orde satu dengan laju berturut-turut  $0,063[\text{kolesterol}]\text{mgL}^{-1}\text{hari}^{-1}$  dan  $0,045[\text{kop}]_t \text{mgL}^{-1}\text{hari}^{-1}$ .

Kata kunci : kolesterol, koprostanol, degradasi, aerob, steroid, feses

### ABSTRACT

Cholesterol and other steroid compounds like coprostanol, epicoprostanol, have been used as source indicator for fecal pollution in aquatic environments. This is because of the unique steroid composition of animal feces. To determine the source of fecal pollution, the ratios of steroid compounds in the sample are used. Thus any reaction or changes to any steroid compound in the environment will affect the determination. In this paper a study on the interconversion of cholesterol and coprostanol in river sediments is reported. The study suggests that there is no such changes that any steroid compounds detected in a sediment sample will show their primary sources. This implies that the composition or ratio of the compounds can be used as source indicator for fecal pollution. The study also found that both cholesterol and coprostanol degradation are first order with rate constants of  $0,063[\text{kolesterol}]\text{mgL}^{-1}\text{day}^{-1}$  and  $0,045[\text{kop}]_t \text{mgL}^{-1}\text{day}^{-1}$  respectively.

Keywords : kolesterol, koprostanol, degradasi, aerob, steroid, feses

### PENDAHULUAN

Rasio kandungan senyawa-senyawa steroid (kolesterol, koprostanol, epikoprostanol, kolestanol, stigmastanol, dan lain-lain.) dalam air menunjukkan sumber kontaminasi dalam air tersebut. Sebagai contoh, apabila air hanya mengandung kolesterol, tanpa senyawa steroid

lain, maka diperkirakan sumber pencemaran feses dalam air tersebut adalah anjing. Sementara apabila rasio kolesterol:koprostanol mencapai 1:10, misalnya, maka manusialah asal dari pencemaran feses dalam air tersebut (Murtaugh & Bunch, 1967; Leeming, *et al.*, 1996; Marvin, *et al.*, 2001) . Dengan demikian setiap senyawa steroid (sterol maupun stanol) dan komposisinya

memegang peran unik dalam penentuan sumber kontaminasi feces. Oleh karena itu setiap reaksi, atau interkonversi dari satu senyawa ke senyawa lain menjadi krusial. Sebagai contoh, konversi koprostanol menjadi epikoprostanol atau kolestanol, atau sebaliknya, akan mempengaruhi perkiraan apakah 'sidik jari' steroid yang ditunjukkan jelas mengidentifikasi manusia sebagai sumber yang bertanggung jawab atas pencemaran yang terjadi.

Telah diketahui bahwa pembentukan epikoprostanol, baik dari hidrogenasi kolesterol maupun epimerisasi koprostanol, difasilitasi oleh mikroorganisma dalam lumpur aktif (sewage sludge) (Parmentier, & Eyssen, 1974; McCalley *et al.*, 1981). Interkonversi steroid dalam limbah maupun sedimen yang tercemar limbah juga telah dilaporkan (Gaskell & Eglinton, 1975). Menurut laporan ini, hidrogenasi kolesterol dapat menghasilkan senyawa stanol yang berbeda-beda tergantung pada jenis mikroorganisma yang berperan. Dalam sedimen yang tercemar limbah, hidrogenasi kolesterol menghasilkan koprostanol, tapi dalam sedimen yang tidak tercemar seperti sedimen dasar laut hidrogenasi tersebut menghasilkan kolestanol.

Meskipun penelitian mengenai interkonversi steroid dalam laut maupun limbah telah banyak dilakukan (Chan *et al.*, 1998; Gagosian & Heinzer, 1979; Jeng, & Han, 1994; Jeng & Huh, 2001; Jeng, *et al.*, 1996; LeBlanc, *et al.*, 1992; Venkatesan, *et al.*, 1986; Venkatesan & Kaplan, 1990) namun belum ada yang melaporkan hal serupa dalam air tawar. Penelitian ini dimaksud untuk melengkapi kekurangan itu, karena pencemaran feces di lingkungan air tawar juga penting untuk diatasi.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Kolesterol, koprostanol, kolestan, kloroform, *n*-heksan, metanol, aquades, BSTFA, NaCl., KOH dalam metanol, dan kertas saring serat kaca.

### Peralatan

Mikrokosmos/inkubator aerob, vial teflon, corong pemisah, seperangkat rotary

evaporator, alat-alat gelas seperti beaker, erlenmeyer, pipet ukur, tabung COD., pemanas listrik, seperangkat Kromatografi Gas.

## Cara Kerja

### Inkubasi

Masing-masing 24 sampel sedimen basah seberat 10 g yang diperkaya dengan 0,2 mg kolesterol atau koprostanol diinkubasi dari 7 sampai dengan 49 hari dalam penangas air pada suhu 20°C. Masing-masing sampel ditempatkan dalam vial teflon 50 mL. Selain kolesterol atau koprostanol, ke dalam sampel juga ditambahkan 0,2 mg kolestan sebagai pembanding.

### Ekstraksi

Tiga sampel berisi kolesterol atau koprostanol langsung diekstrak setelah pengayaan. Ini dilakukan untuk menentukan kandungan steroid awal. Pada hari yang telah ditentukan (yaitu hari ke 7, 14, 21, 28, 35, 42, dan 49 setelah inkubasi), masing-masing 3 buah sampel diekstrak. Ekstraksi dilakukan sesuai metode standar untuk ekstraksi lemak (Bligh & Dyer, 1949) yang dimodifikasi (Suprihatin, *et al.*, 2003), dimana sedimen basah langsung diperkolasi dalam campuran *miscible* dari pelarut metanol, kloroform, dan aquades selama 24 jam. Sampel kemudian diekstrak dengan kloroform. Lapisan kloroform dipekatkan dan disaponifikasi dengan kalium metanolat, diekstrak dengan *n*-heksan, dan diderivatisasi menggunakan BSTFA.

### Analisis

Ekstrak yang telah diderivatisasi dianalisis menggunakan Gas Kromatografi guna menentukan kandungannya. Kandungan kolesterol dan koprostanol serta senyawa lain bila ada, dibuat grafik terhadap waktu inkubasi. Dari pola kurva konsentrasi terhadap waktu tersebut dapat ditentukan kinetika laju reaksinya.

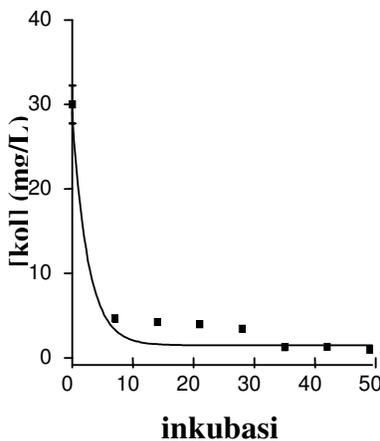
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1 menunjukkan persentase kolesterol dan koprostanol tersisa setelah inkubasi, dihitung berdasarkan konsentrasi awal yang terdeteksi oleh kromatografi gas. Konsentrasi

kolesterol berkurang dari 30 menjadi 4,7 mgL<sup>-1</sup> (kurang lebih 84 %) dalam 7 hari, kemudian berangsur-angsur berkurang menjadi 11% dari konsentrasi awal dalam 28 hari. Pada hari ke 35 konsentrasi anjlok menjadi 4% dari konsentrasi awal, kemudian hampir tidak berubah selama 14 hari. Tidak terdeteksi adanya senyawa steroid lain selama inkubasi.

Tabel 1. Sisa kolesterol dan koprostanol setelah inkubasi

Waktu inkubasi (hari)	Sisa Kolesterol (%)	Sisa Koprostanol (%)
0	100	100
7	16 ± 2.5	28 ± 6.3
14	14.4 ± 2.1	13.3 ± 2.1
21	13.5 ± 2.2	11.6 ± 1.8
28	11.8 ± 1.8	11.1 ± 1
35	4.3 ± 0.9	7.3 ± 2.3
42	4.5 ± 0.6	7 ± 1.5
49	3.3 ± 0.7	5.7 ± 1.1



Gambar 1. Konsentrasi kolesterol setelah inkubasi

Perubahan konsentrasi kolesterol ini diilustrasikan pada Gambar1. Dari diagram tersebut dapat dianggap bahwa degradasi kolesterol melalui dua tahap. Penurunan konsentrasi yang sangat cepat pada minggu pertama (dengan laju rata-rata -0,235 mgL<sup>-1</sup> hari<sup>-1</sup>), diikuti oleh perubahan lambat selama 6 minggu dengan laju rata-rata 0,06 mgL<sup>-1</sup>hari<sup>-1</sup>.

Barangkali apabila frekuensi sampling selama minggu pertama ditingkatkan akan mempertegas pola penurunannya. Secara keseluruhan penurunan konsentrasi kolesterol selama inkubasi mengikuti kurva logaritmik, menunjukkan bahwa degradasi kolesterol secara aerob ini mengikuti kinetika orde satu, yang berarti degradasi ditentukan oleh konsentrasi kolesterol, atau secara matematis dapat dituliskan :

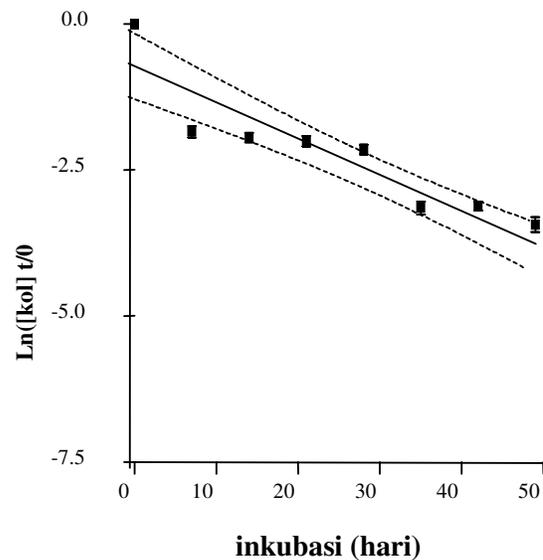
$$r = k [kol]_t$$

dengan

r = laju dedradasi

[kol]<sub>t</sub> = konsentrasi kolesterol (mgL<sup>-1</sup>) pada t hari

k = konstanta laju (hari<sup>-1</sup>)



Gambar 2. Regresi linear kurva ln [kol]<sub>t</sub>/[kol]<sub>0</sub> terhadap waktu inkubasi.

Hal ini dipertegas dengan mengamarkan degradasi tersebut melalui grafik antara harga log [kol]<sub>t</sub> / [kol]<sub>0</sub> terhadap lama inkubasi (Gambar 2) yang berupa kurva linier dengan persamaan:

$$\ln[kol]_t / [kol]_0 = -0,063t - 0,016$$

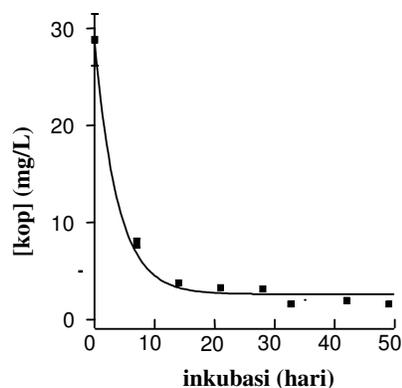
dengan R<sup>2</sup> = 0.914 (P<0.0001)

Dari kurva ini diperoleh konstanta laju (k) = - slope = 0.063 hari<sup>-1</sup>, serta laju degradasi

$(r) = 0,063 [kol]_t \text{ mgL}^{-1}\text{hari}^{-1}$  dimana  $[kol]_t$  adalah konsentrasi kolesterol pada 't' hari.

Tabel 2. Sisa kolesterol dan koprostanol ( $\text{mgL}^{-1}$ ) setelah inkubasi

Waktu inkubasi (hari)	$[kol], \text{mgL}^{-1}$	$[kop], \text{mgL}^{-1}$
0	$30 \pm 1.9$	$28.8 \pm 2.3$
7	$4.7 \pm 0.1$	$7.9 \pm 0.4$
14	$4.3 \pm 0.1$	$3.8 \pm 0.1$
21	$4 \pm 0.2$	$3.3 \pm 0.03$
28	$3.5 \pm 0.1$	$3.2 \pm 0.2$
35	$1.3 \pm 0.1$	$2 \pm 0.2$
42	$1.3 \pm 0$	$2 \pm 0.1$
49	$0.9 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.03$



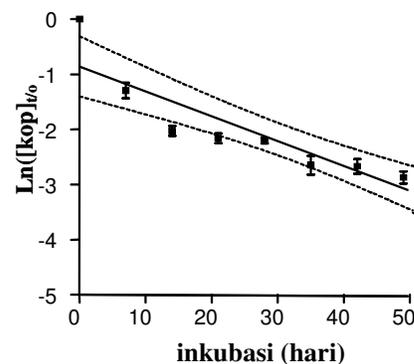
Gambar 3. Kurva konsentrasi koprostanol setelah inkubasi terhadap waktu inkubasi.

Penurunan konsentrasi koprostanol selama inkubasi diilustrasikan pada Gambar 3 dan Tabel 2. Dengan menganggap konsentrasi mula-mula yang terukur sebesar  $28,8 \pm 4,6 \text{ mgL}^{-1}$  sebagai 100%, setelah tujuh hari terdegradasi menjadi  $28,0 \pm 6,3\%$  dari konsentrasi awal. Konsentrasi koprostanol turun lagi menjadi  $3,8 \pm 0,2 \text{ mgL}^{-1}$  (kurang lebih 13% dari konsentrasi awal) setelah 14 hari inkubasi. Selanjutnya turun sedikit demi sedikit selama 14 hari untuk kemudian tetap sampai akhir inkubasi pada konsentrasi kurang lebih  $1,6 \text{ mgL}^{-1}$ .

Sebagaimana kolesterol, degradasi koprostanol juga dapat diinterpretasikan ke

dalam dua tahap: degradasi sangat cepat pada minggu pertama, diikuti pengurangan konsentrasi secara lambat pada minggu-minggu berikutnya sampai akhir inkubasi. Untuk menentukan order dan laju degradasinya, maka dibuat kurva logaritme alami dari rasio konsentrasi pada hari ke 't' dan konsentrasi awal ( $\ln [kop]_t/[kop]_0$ ), terhadap waktu inkubasi (t) sebagaimana terpampang pada Gambar 4. Dari korelasi tersebut diperoleh kurva linier dengan persamaan  $y = -0.045x - 0.863$  ( $R^2 = 0.8569, P < 0.0001$ ). Ini menunjukkan bahwa laju degradasi koprostanol adalah  $0.045[kop]_t \text{ mgL}^{-1}\text{hari}^{-1}$ , dengan  $[kop]_t$  konsentrasi koprostanol setelah inkubasi 't' hari. Dengan kata lain, laju degradasi ditentukan oleh konsentrasi koprostanol saat itu.

Hasil analisis tidak menunjukkan adanya senyawa steroid lain dengan konsentrasi yang signifikan, sehingga dapat dianggap tidak terjadi konversi koprostanol menjadi senyawa steroid lain.



Gambar 4. Regresi linear kurva  $\ln [kop]_t/[kop]_0$  terhadap waktu inkubasi.

Kebergantungan laju degradasi pada konsentrasi kolesterol mengisyaratkan bahwa mikroorganisme aerob yang berperan dalam degradasi kolesterol menggunakan senyawa tersebut sebagai sumber energinya selama proses degradasi berlangsung. Namun untuk menyatakan secara pasti mengenai hal ini perlu penelitian lebih lanjut.

Dalam studi ini, kurang lebih 99% kolesterol terdegradasi selama 7 minggu, sementara sekitar 97% koprostanol mengalami degradasi selama kurun waktu yang sama. Oleh

beberapa peneliti lain degradasi aerob diperkirakan lebih efektif dari pada anaerob, meskipun untuk senyawa dan media yang bervariasi (Bartlett, 1987; Canuel dan Martens, 1996; Sun dan Wakeham, 1998). Laju degradasi dalam studi ini lebih besar dibandingkan yang dilaporkan Sun dan Wakeham untuk degradasi kolesterol dalam sedimen dasar laut (Sun dan Wakeham, 1998).

Tidak adanya senyawa steroid lain menunjukkan degradasi kolesterol berlangsung sempurna dan terjadi mineralisasi menjadi CO<sub>2</sub>. Namun karena kesetimbangan massa tidak dipelajari dalam studi ini, maka hal tersebut perlu dikonfirmasi lebih lanjut. Namun dari penelitian lain telah dilaporkan bahwa disamping interkonversi, degradasi dalam sedimen tak tercemar didominasi oleh remineralisasi sempurna (Sun dan Wakeham, 1998). Interkonversi kolesterol dalam studi ini kemungkinan terjadi dalam jangka waktu kurang dari 7 hari, berhubung pada hari ke 7 telah terjadi mineralisasi.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Dari hasil analisis yang telah didiskusikan, dapat disimpulkan bahwa degradasi baik kolesterol maupun koprostanol dalam lingkungan air tawar mengikuti kinetika reaksi order satu (pertama) yang berarti konsentrasi kolesterol maupun koprostanol pada suatu saat menentukan laju degradasi pada saat itu. Dengan kata lain laju degradasi kolesterol maupun koprostanol berubah dengan konsentrasinya.

Tidak terdeteksinya perubahan konsentrasi senyawa steroid selain kolesterol selama inkubasi menunjukkan tidak terjadinya interkonversi antar senyawa steroid. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa konsentrasi suatu senyawa steroid di lingkungan serupa mencerminkan sumber orisinal, bukan produk dari senyawa lain. Dengan demikian komposisi steroid fekal di lingkungan tetap merupakan 'sidik jari' untuk melacak sumber pencemaran seperti yang telah disarankan oleh para peneliti.

### Saran

Degradasi selama minggu pertama perlu dipelajari secara lebih mendalam dengan memperbanyak frekuensi sampling, misalnya tiap hari selama tujuh hari pertama.

Perlu pula dipelajari degradasi senyawa-senyawa steroid fekal lain, baik dalam kondisi aerob maupun anaerob.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Studi ini tidak mungkin terlaksana tanpa dukungan banyak pihak, antara lain AusAID dan Nancy Cromar. Oleh karenanya ungkapan terimakasih terutama tertuju kepada mereka, meski tanpa mengurangi rasa terimakasih kepada pihak lain yang tidak dapat disebut satu persatu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bartlett, P. D., 1987, Degradation of Koprostanol in an Experimental System, *Marine Pollut. Bull.* 18(1) : 27-29
- Canuel, E. A. and Martens, C. S., 1996, Reactivity of Recently Deposited Organic Matter : Degradation of Lipid Compounds Near the Sedimen-Water Interface, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 60(10) : 1793-1806
- Chan, K. H., Lam, M. H. W., Poon, K. F., Yeung, H. Y. and Chiu, T. K. T., 1998, Application of sedimentary fecal stanols and sterols in tracing sewage pollution in coastal waters, *Water Research* 32(1) : 225-235
- Gagosian, R. B. and Heinzer, F., 1979, Stenols and stanols in the oxic and anoxic waters of the Black Sea, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43 : 471-486
- Gaskell, S. J. and Eglinton, G., 1975, Rapid Hydrogenation of Sterols in a Contemporary Lacustrine Sediment, *Natur*, 254 : 209-211
- Gaskell, S. J. and Eglinton, G., 1976, Sterols of a Contemporary Lacustrine Sedimen., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 40 : 1221-1228

- Jeng, W. L. and Han, B. C., 1994, Sedimentary Coprostanol in Kaohsiung Harbour and the Tan-Shui Estuary, Taiwan, *Marine Pollut. Bull.*, 28(8) : 494-499
- Jeng, W. L. and Huh, C. A., 2001, Comparative study of sterols in shelf and slope sediments off northeastern Taiwan, *Applied Geochemistry*, 16(1) : 95-108
- Jeng, W. L., Wang, J. and Han, B. C., 1996, Coprostanol distribution in Marine Sediments Off Southwestern Taiwan. *Environ. Pollut.*, 94(1) : 47-52
- LeBlanc, L. A., Latimer, J. S., Ellis, J. T. and Quinn, J. G. (1992), The Geochemistry of Coprostanol in Waters and Surface Sediments from Narragansett Bay, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 34 : 439-458
- Leeming, R., Nichols, P. D., Ball, A. and Ashbolt, N., 1996, Using Faecal Sterols from Humans and Animals to Distinguish Faecal Pollution in Receiving Waters. *Wat. Res.* 30(12) : 2893-2900
- Marvin, C., Coakley, J., Mayer, T., Brown, M. and Thiessen, L. (2001). Application of faecal sterol ratios in sediments and effluents as source tracers. *Water Quality Research Journal of Canada*, 36(4) : 781-792
- Murtaugh, J. J. and Bunch, R. L., 1967, Sterols as a Measure of Fecal Pollution. *J. WPCF*, 39(3) : 404-409
- Parmentier, G. G. and Eyssen, H. J., 1974, Mechanism of biohydrogenation of cholesterol to coprostanol by *Eubacterium* ATCC 21408., *Biochim. biophys. Acta*, 348 : 279-284
- Sun, M. Y. and Wakeham, S. G., 1998, A Study of Oxic/Anoxic Effects on Degradation of Sterols at the Stimulated Sediment-Water Interface of Coastal Sediments. *Org. Geochem.*, 28(12) : 773-784
- Suprihatin, I., Fallowfield, H., Bentham, R. and Cromar, N., 2003, Determination of faecal pollutants in Torrens and Patawalonga catchment waters in South Australia using faecal sterols. *Water Science and Technology*, 47(7-8) : 283-289
- Venkatesan, M. I. and Kaplan, I. R. (1990). Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica Basin, Southern California. *Env. Sci. Technol.*, 24(2) : 208-214
- Venkatesan, M. I., Ruth, E., and Kaplan, I. R., 1986, Coprostanols in Antarctic Marine Sediments : A Biomarker for Marine Mammals and not Human Pollution, *Marine Pollut. Bull.*, 17(12) : 554-557