



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UNIVERSITAS SRIWIJAYA
Jl. Palembang-Prabumulih Km.32 Indralaya, Ogan Ilir
Sumatera Selatan
INDONESIA

Untuk Invensi dengan Judul : METODE SKRINING BAKTERI, OPTIMASI DAN EKSTRAKSI
LOVASTATIN DARI *Lactobacillus acidophilus*

Inventor : Rinto, S.PI, M.P
Dr. Ace Baehaki, S.PI, M.Si

Tanggal Penerimaan : 25 November 2015

Nomor Paten : IDP000053959

Tanggal Pemberian : 11 Oktober 2018

Perlindungan Paten untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun dihitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611161994031001

Deskripsi

METODE SKRINING BAKTERI, OPTIMASI DAN EKSTRAKSI LOVASTATIN DARI *Lactobacillus acidophilus*

5

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan cara skrining mikroorganisme penghasil inhibitor HMG-KoA reduktase, optimasi produksi inhibitor HMG-KoA reduktase dan ekstraksi inhibitor HMG-KoA reduktase dari
10 *Lactobacillus acidophilus*.

Latar Belakang Invensi

Kandungan kolesterol yang tinggi dalam plasma darah merupakan faktor resiko tertinggi pada aterosklerosis dan penderita penyakit
15 jantung. Enzim HMG-KoA reduktase merupakan enzim kunci dalam biosintesis kolesterol, sehingga penghambatan terhadap aktivitas HMG-KoA reduktase untuk menurunkan kolesterol dalam plasma darah banyak dikaji dalam 2 dekade terakhir.

Statin merupakan komponen bioaktif utama yang mampu menghambat
20 aktivitas HMG-KoA reduktase. Statin diketahui merupakan sekelompok obat yang berfungsi sebagai inhibitor kompetitif bagi enzim HMG-KoA reduktase sehingga statin dapat membatasi biosintesis kolesterol dalam hati. Beberapa jenis statin yang sudah ditemukan saat ini adalah lovastatin, simvastatin, compactin dan pravastatin.
25 Lovastatin biasanya disintesis oleh kapang yaitu *Monascus purpureus* (**Paten No. CN102010831 B**); *Pleurotus* (**Paten No. DE4402591**); serta kapang jenis *Aspergillus terreus* (**Paten No. WO1997005269**). Penemuan lovastatin dari bakteri belum dilaporkan dan invensi ini menyajikan metode skrining bakteri penghasil lovastatin sebagai inhibitor HMG-
30 KoA reduktase.

Lovastatin merupakan inhibitor HMG-KoA reduktase yang sudah dikomersialisasikan. Permasalahannya adalah bahan baku untuk pembuatan lovastatin di Indonesia masih diimpor dari Amerika, Eropa, maupun Jepang, sehingga harga obat lovastatin di Indonesia

tergolong mahal, oleh sebab itu invensi ini menyediakan metode untuk melakukan skrining bakteri sebagai sumber baru produsen inhibitor HMG-KoA reduktase (lovastatin), optimasi produksi lovastatin dan ekstraksi lovastatin dari metabolit ekstraseluler bakteri.

Ringkasan Invensi

Invensi yang diusulkan ini pada prinsipnya berhubungan dengan metode isolasi dan skrining mikroorganisme yang menghasilkan lovastatin dengan menggunakan lovastatin 1 - 3 mg/mL media kultur sebagai agen seleksi, optimasi produksi lovastatin pada kisaran suhu 25-30 °C; pH 6,5 - 7,5; gliserol 0-5%, serta ekstraksi lovastatin dari metabolit ekstraseluler bakteri dengan ultrafiltrasi bertingkat menggunakan MWCO *cut of* 10 kD; 3 kD dan *syringe filter* 0,02µm.

Uraian Lengkap Invensi

Aspek pertama dalam invensi ini adalah metode skrining terhadap mikroorganisme penghasil lovastatin. Skrining bakteri penghasil lovastatin dilakukan dengan menguji kemampuan tumbuh/berkembang mikroorganisme di dalam media MRS cair yang ditambahkan dengan lovastatin, dengan asumsi bahwa bakteri yang memproduksinya harus bersifat resisten terhadap lovastatin. Program skrining terhadap bakteri yang diisolasi menghasilkan bakteri yang resisten terhadap lovastatin. Uji produksi dan daya inhibisi metabolit ekstraseluler bakteri yang di-skrining terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase menghasilkan mikroorganisme penghasil lovastatin. *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri yang dihasilkan dalam invensi ini. Metode skrining yang diklaim dalam invensi ini adalah sebagai berikut: Sampel sebanyak 10% dilarutkan dalam akuades steril dan dihomogenisasi. Homogenat dimasukan ke dalam media MRS cair dengan perbandingan 1:9, kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 48 jam. Setelah itu 1 mL kultur dipindahkan kedalam 9 mL media MRS cair berisi lovastatin 1 mg/mL dan

diinkubasi pada 35 °C selama 5 hari. Kultur yang berusia 5 hari diukur nilai optikal densitnya pada λ 620 nm untuk menentukan pertumbuhan kultur bakteri serta kultur bakteri yang paling tahan/resisten terhadap lovastatin. Semakin tinggi nilai OD menunjukkan bakteri semakin banyak yang tumbuh dan semakin tahan/resisten terhadap lovastatin. Kultur bakteri yang paling tahan dan dapat tumbuh dengan optimum, diremajakan dalam media MRS cair dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian, sebanyak 1 mL kultur yang berumur 24 jam dipindahkan dalam media MRS agar, berisi lovastatin 2 mg/mL dan dinkubasi pada 35 °C selama 2 hari untuk diseleksi kembali. Koloni bakteri yang tumbuh pada media MRS agar merupakan bakteri yang resisten terhadap lovastatin. Bakteri yang resisten terhadap statin digunakan untuk uji produksi statin. Hasil produksi statin oleh kultur bakteri dianalisis menggunakan spektrofotometer dan HPLC. Dalam invensi ini diajukan *Lactobacillus acidophilus* sebagai bakteri penghasil lovastatin dan metabolit ekstraselulernya mampu menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase.

Aspek kedua yang diajukan dalam invensi ini adalah metode optimasi produksi inhibitor HMG-KoA reduktase. Fermentasi produksi inhibitor HMG-KoA reduktase dilakukan dengan menggunakan kombinasi suhu, pH, dan gliserol. Tahapan metode yang diajukan dalam invensi ini adalah sebagai berikut: Bakteri *L. acidophilus* dikultur dalam media de Man Rogosa Sharpe Broth (Oxoid, Inggris). Inkubasi kultur dikondisikan pada 25 °C, pH 7.0; gliserol 0% selama 5 hari yang merupakan kondisi optimum biosintesis lovastatin. Pengukuran kandungan lovastatin menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 238 nm dan daya inhibisi terhadap enzim HMG-KoA reduktase dengan KIT HMG-KoA reduktase, panjang gelombang 238 nm.

Aspek ketiga yang diajukan dalam invensi ini adalah metode ekstraksi inhibitor HMG-KoA reduktase. Ekstraksi dilakukan dengan ultrafiltrasi bertingkat menggunakan MWCO *cut of* 10, *cut of* 3, dan *syringe filter* 0,02 μ m dengan masing-masing disentrifugasi pada 10.000 rpm, 4 °C selama 20 menit. Lovastatin merupakan metabolit

dengan berat molekul 400 D, sehingga hasil akhir dari ultrafiltrasi bertingkat merupakan ekstrak lovastatin.

Klaim

1. Metode skrining bakteri yang menghasilkan lovastatin dengan menggunakan lovastatin 1-3 mg/mL media kultur sebagai agen penseleksi.
5
2. Metode optimasi produksi lovastatin dari bakteri yang dihasilkan dari klaim 1 dengan inkubasi pada suhu 25-30 °C; pH 6,5 - 7,5; dan gliserol 0-5%.
3. Metode ekstraksi lovastatin dari metabolit ekstraseluler bakteri yang dihasilkan dari klaim 1 dan 2 dengan metode ultrafilterasi bertingkat menggunakan MWCO *cut of* 10 kD, 3 kD dan *syringe filter* 0,02µm.
10
15
20
25
30

Abstrak

Lovastatin sebagai inhibitor utama HMG-KoA reduktase selama ini dihasilkan oleh kapang. Produser lovastatin dari bakteri selama ini belum dilaporkan/dipatenkan. Invensi ini berhubungan dengan metode skrining bakteri penghasil lovastatin, optimasi produksi lovastatin serta ekstraksi lovastatin dari metabolit ekstraseluler bakteri. Skrining bakteri penghasil statin menggunakan lovastatin 1-3 mg/mL media kultur sebagai agen penseleksi. Optimasi produksi lovastatin dilakukan dengan inkubasi bakteri pada suhu 25-30 °C, pH 6,5-7,5 dan gliserol 0-5%. Ekstraksi lovastatin dari metabolit ekstraseluler bakteri dilakukan dengan ultrafilterasi bertingkat menggunakan MWCO *cut of* 10 kD, 3 kD dan *syringe filter* 0,02 µm.

15

20

25

30