

Isolasi dan karakterisasi senyawa metabolit sekunder dari bakteri laut *Streptomyces* sp.

Isolation and characterization of secondary metabolites from marine bacterium Streptomyces sp.

Muhammad Bahi

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, 23111 Indonesia.
Email korespondensi: bahi.usk@gmail.com

Abstract: *Streptomyces* is one of bacterial genus which has been considered as a potential source of many novel antibiotics from both terrestrial and marine microorganism. In this paper, four secondary metabolites have been isolated and characterized from a marine *Streptomyces* sp. B5798, namely *p*-hydroxyphenylacetic acid (2), indole-3-carboxylic acid (3), indole-3-acetic acid (4), and Macrolactin A (5), respectively. Two of them are common compounds, namely indole-3-carboxylic acid (3) and indole-3-acetic acid (4). The 3,4-dihydroxybenzaldehyde is a degradation product of *p*-hydroxyphenylacetic (2) in microorganism. Macrolactin A (5) showed cytotoxicity against brine shrimps test (*A. salina*). All structures of the isolated compounds were elucidated based on spectroscopic and mass spectrometry data.

Keywords: *Streptomyces*, marine bacterium, secondary metabolites, antibiotics

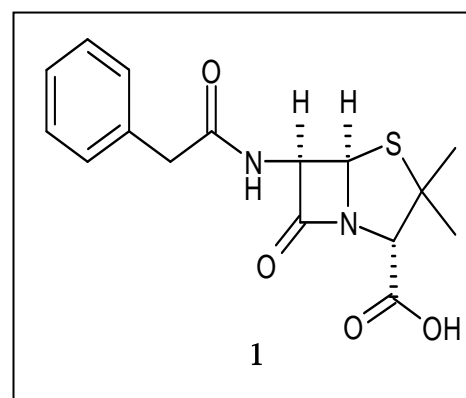
Abstrak: *Streptomyces* merupakan salah satu genus dalam kelas bakteri yang banyak terdapat baik di daratan maupun di lautan. Genus *Streptomyces* ini sangat potensial sebagai sumber bahan antibiotika yang berasal dari mikroorganisme. Dalam penelitian ini, sebanyak empat senyawa metabolit sekunder telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari *marine Streptomyces* sp. B5798 yaitu asam *p*-hidroksifenilasetat (2), asam indole-3-karboksilat (3), asam indole-3-asetat (4), dan Macrolactin A (5). Dua diantaranya merupakan senyawa trivial yaitu asam indole-3-karboksilat (3) dan asam indole-3-asetat (4). Asam *p*-hidroksifenilasetat (2) merupakan produk degradasi dari 3,4-dihidroksibenzaldehid pada mikroorganisme yang merupakan prekursor dari obat anti-Parkinson. Macrolactin A (5) menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap *A. Salina*. Elusidasi struktur senyawa hasil isolasi ditentukan berdasarkan data spektroskopi dan spektrometri massa.

Kata kunci: *Streptomyces*, laut, senyawa metabolit sekunder, antibiotika

Pendahuluan

Banyak senyawa-senyawa aktif yang bersifat antimikrobal dan berpotensi dalam penemuan dan pengembangan bahan obat (Newman *et al.*, 2000) terdapat di alam. Tanaman, dan hewan merupakan sumber dan penghasil senyawa bahan alam dengan aktivitas yang beragam (Nakanishi, 1999). Sejumlah bahan obat yang baru dan penting secara klinik telah banyak dilaporkan berasal senyawa bahan alam (Newman dan Cragg, 2007). Mikroorganisme seperti bakteri dan jamur termasuk produser biologi penghasil senyawa-senyawa bahan alam yang menunjukkan aktivitas antimikrobal dengan spektrum yang luas, pada umumnya menjadi pelindung bagi induk semangnya. Skrining mikroorganisme menjadi populer setelah penemuan penisilin (1) (Gambar 1) yang dihasilkan dari jamur *Penicillium notatum* (Fenical, 1993).

Beberapa dekade terakhir, ekosistem laut telah menarik perhatian para ahli kimia sebagai sumber baru yang potensial untuk senyawa-senyawa bioaktif alami (Saleem *et al.*, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa kimia bahan alam yang berasal dari mikroorganisme khususnya dari laut juga telah memberikan peran yang penting dalam pencarian bahan obat atau zat antibiotik (Newman dan Cragg, 2004). *Streptomyces* merupakan salah satu bakteri dari sub-klas actinomycetes juga banyak terdistribusi pada organisme laut selain dari ekosistem daratan. Lebih dari 70% senyawa antibiotik yang berasal dari mikroorganisme telah dilaporkan dalam berbagai publikasi berasal dari genus *Streptomyces* (Clardy *et al.*, 2016). Selain itu, genus *Streptomyces* dikelompokkan sebagai bakteri Gram-positif aerobik yang pada umumnya relatif kurang bersifat patogen dibandingkan dengan bakteri Gram-positif lainnya, seperti *Streptococcus* dan *Staphylococcus* (Madigan dan Martinko, 2005). Habitat *Streptomyces* di lautan secara biologis tersebar pada ikan, hewan moluska, bunga karang (*sponge*), tumbuhan bakau, dan rumput laut (*seaweeds*) (Dharmaraj, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan beberapa struktur senyawa metabolit sekunder dari *marine Streptomyces* sp. B5798. Selanjutnya, manfaat dari hasil penelitian ini adalah untuk menyebarkan informasi tentang kandungan beberapa senyawa bahan alam dari bakteri genus *Streptomyces*.



Gambar 1. Senyawa penisilin (1) yang dihasilkan dari jamur *Penicillium notatum*

Bahan dan Metode

Sampel bakteri *Streptomyces* sp. B5798 dan lokasi penelitian

Strain *Streptomyces* sp. B5798 diperoleh dari koleksi Dr. E. Helmke, Alfred-Wegener Institute of Polar and Marine Research, Bremerhaven, Germany. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium kimia organik, Institute of Organic and Biomoleculare Chemistry, University of Goettingen, Germany.

Pengukuran spektra NMR dan MS

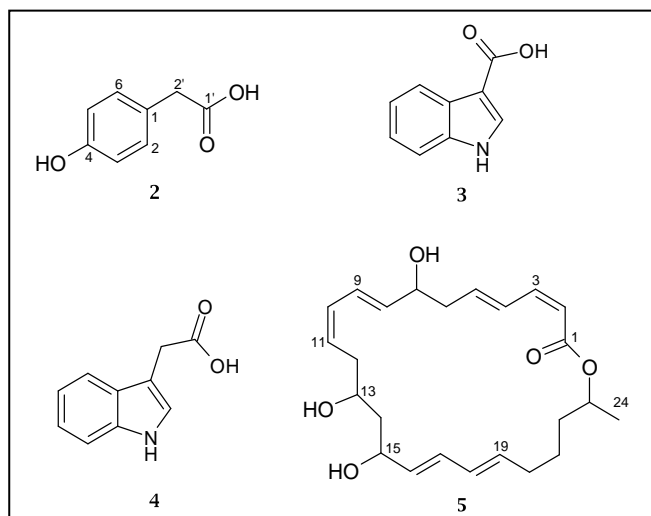
Spektra ^1H dan ^{13}C NMR masing-masing diukur dengan menggunakan alat Varian Unity 300 (300,145 MHz) dan Varian Inova 600 (599,7 MHz) dimana TMS digunakan sebagai standar internal. Sedangkan spektra spektrometri massa (SM) diukur dengan menggunakan alat spektrometri massa (SM) Finnigan MAT 95 (70 eV).

Fermentasi dan isolasi

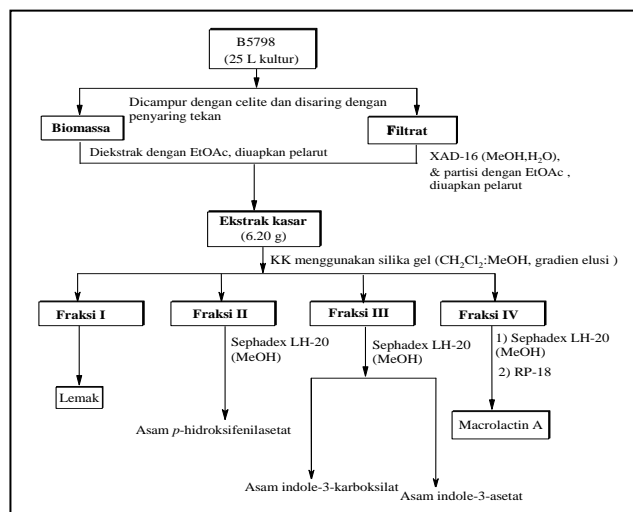
Subkultur agar *Streptomyces* sp. B5798 diinokulasi dalam 25 L medium kultur M_2^+ pada pH 7,8 yang terlebih dahulu medium kulturnya disterilisasi pada suhu 105 °C dengan autoklav selama 2 jam, dan kultur tersebut difermentasi selama 5 hari pada suhu 28 °C. *Shaker*-kultur dipanen pada hari ke-5 dan disaring dengan *celite* menggunakan penyaring tekan sehingga diperoleh filtrat berwarna coklat pekat. Filratnya kemudian dilewatkan pada kolom resin XAD-16 dan dielusi dengan pelarut metanol dan diperoleh ekstrak kasar metanol. Sedangkan campuran *celite* dan biomassa diekstraksi dengan pelarut etilasetat, sehingga diperoleh ekstrak kasar etilasetat. Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) kedua ekstrak kasar dari kedua fase metanol dan etilasetat menunjukkan pola noda yang sama, sehingga kedua ekstrak fase organik tersebut digabung, dan diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada tekanan rendah. Residu yang diperoleh sebanyak 6,20 g kemudian dihilangkan lemak (*defating*) dengan pelarut sikloheksana. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya difraksinasi secara kromatografi kolom terhadap silika gel 60 F₂₅₄ dengan menggunakan sistem gradien pelarut diklorometana dan metanol (0 sampai 50% MeOH).

Subfraksi pertama yang mengandung lemak tidak dipisahkan lebih lanjut. Subfraksi kedua dan ketiga masing-masing dimurnikan secara terpisah menggunakan kolom Sephadex LH-20 dan pelarut metanol. Hasil pemurnian dengan kolom Sephadex LH-20 dari masing-masing subfraksi ke-2 dan ke-3 diperoleh asam *p*-hidroksifenilasetat (2, 1,4 mg) dari subfraksi ke-2, dan senyawa trivial asam indole-3-karboksilat (3) dan asam indole-3-asetat (4). Subfraksi ke-4 dimurnikan dengan kolom Sephadex (MeOH) dan kolom RP-18 (15% v/v MeOH/air) sehingga diperoleh macrolactin A (5, 2,5 mg). Struktur dari masing-masing senyawa isolat dari setiap subfraksi tersebut ditunjukkan pada Gambar 2. Sedangkan proses isolasi dan pemurnian masing-masing fraksi tersebut ditunjukkan pada Gambar 3.

Asam *p*-hidroksifenilasetat (2): Padatan putih, fluoressen dibawah sinar UV pada λ 254 nm, merah jambu dengan pereaksi noda anisaldehyd/asam sulfat. – $R_f = 0.49$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/5\%$ MeOH). – ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): $\delta = 7.08$ (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2,6-H), 6.73 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 3,5-H), 3.47 (s, 2H, 2'-H). Macrolactin A (5): Minyak berwarna merah, fluoressen dibawah sinar UV pada λ 254 nm, hitam dengan pereaksi semprot anisaldehyd/asam sulfat. – $R_f = 0.25$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\%$ MeOH). – ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 7.16$ (dd, $^3J = 14.9, 11.7$ Hz, 1H, 4-H), 6.56 (dd, $^3J = 11.4, 10.9$ Hz, 2H, 3,9-H), 6.09 (m, 4H, 18,17,10,5-H), 5.75 (dd, $^3J = 15.1, 5.1$ Hz, 1H, 8-H), 5.65-5.34 (m, 4H, 19,16,11,2-H), 5.01 (m, 1H, 23-H), 4.48 (m, 1H, 15-H), 4.32 (m, 1H, 7-H), 4.17 (br s, 3H, 15,13,7-OH), 3.95 (m, 1H, 13-H), 2.43 (m, 4H, 12,6-H), 2.02 (m, 2H, 20-H), 1.62 (m, 4H, 22,14-H), 1.50 (m, 2H, 21-H), 1.26 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, 24-H). – ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 125 MHz): $\delta = 167.6$ (C-1), 144.4 (CH-3), 141.5 (CH-5), 136.8 (CH-8), 134.6 (CH-16), 134.2 (CH-19), 131.0 (CH-18), 130.9 (CH-17), 130.6 (CH-10), 129.6 (CH-4), 127.8 (CH-11), 125.3 (CH-9), 117.6 (CH-2), 71.9 (CH-23), 71.7 (CH-7), 69.5 (CH-15), 68.9 (CH-13), 42.4 (CH₂-14), 42.2 (CH₂-6), 35.8 (CH₂-12), 35.5 (CH₂-22), 32.5 (CH₂-20), 25.1 (CH₂-21), 20.1 (CH₃, C-24). – (+)-ESIMS: m/z (%) = 425 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 827 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 86). – (+)-HRESIMS: m/z 425.22980 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (calcd. 425.22970 for $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{Na}$).



Gambar 2. Isolat metabolit sekunder dari *marine Streptomyces* sp. B5798



Gambar 3. Skema isolasi senyawa dari strain *marine Streptomyces* sp. B5798

Hasil dan Pembahasan

Strain B5798 diidentifikasi sebagai genus *Streptomyces* berdasarkan hasil analisis 16S rRNAnya. *Marine Streptomyces* sp. B5798 membentuk koloni *mycelia* putih pada medium padat agar M₂⁺ setelah diinkubasi selama 3 hari pada suhu 28 °C. Uji bioassay dari ekstrak kasarnya hanya menunjukkan aktivitas biologis terhadap *Artemia salina* (*brine shrimps test*). Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dari ekstrak kasarnya juga menunjukkan empat pita noda yang menyerap sinar UV pada λ 254 nm, dan memperlihatkan warna violet, merah jambu, coklat dan hitam setelah disemprot dengan pereaksi penampak noda anisaldehyd/asam sulfat dan dipanaskan pada suhu oven 105 °C.

Asam *p*-hidroksifenilasetat (**2**) diisolasi sebagai padatan putih dan menunjukkan warna merah jambu dengan pereaksi penampak noda anisaldehyd/asam sulfat pada KLTnya. Data spektrum NMR proton senyawa **2** menunjukkan dua doublet dan satu singlet dengan intensitas yang masing-masing memiliki dua proton pada daerah aromatik dan alifatik. Dua buah doublet pada δ 7.08 dan 6.73 ppm, dengan konstanta kapling (*J*) 8.6 Hz, merupakan karakteristik sistem cincin aromatik yang terdisubstitusi pada posisi 1 dan 4. Resonansi pada δ 3.47 ppm menyarankan gugus metilen (CH₂-) yang berikatan langsung antara gugus karbonil dan cincin aromatik. Struktur senyawa **2** selanjutnya dipastikan melalui perbandingan data spektroskopik percobaan terhadap data spektroskopik dari literatur (Ayer dan Trifonov, 1995). Asam *p*-hidroksifenilasetat (**2**) merupakan produk degradasi pada mikroorganisme dari senyawa 3,4-dihidroksibenzaldehid yang merupakan prekursor dari obat anti-Parkinson, Levodopa (O'connor *et al.*, 2001). Senyawa **5** diisolasi dalam bentuk minyak berwarna merah yang menyerap sinar UV pada panjang gelombang (λ) 254 nm dan noda KLT berwarna hitam dengan pereaksi semprot anisaldehyd/asam sulfat. Hasil analisis spektrometri massa ESI-beresolusi tinggi (*high-resolution* ESI-MS) diperoleh C₂₄H₃₄O₅ sebagai rumus molekulnya yang mengindikasikan adanya 7 ikatan rangkap. Data spektrum NMR proton dari senyawa **5** menunjukkan 12 sinyal proton olefinik diantara δ 7.16–5.34 ppm. Empat sinyal gugus oksimetin (CHO-) muncul pada pergeseran kimia (δ) 5.01, 4.48, 4.32 dan 3.95 ppm. Selanjutnya, resonansi antara δ 2.43–1.26 ppm menunjukkan adanya 6 proton metilen dan satu gugus metil. Selanjutnya, data spektrum NMR karbon menunjukkan 24 atom karbon dari struktur **5** yang mengandung satu gugus karbonil lakton pada δ_C 167.6 ppm, 12 karbon olefinik antara δ_C 144.4–117.6 ppm, dan empat sinyal karbon oksimetin antara δ_C 71.9–68.9 ppm. Sedangkan enam dari tujuh sinyal karbon lainnya merupakan sinyal dari karbon metilen antara δ_C 42.4–25.1 ppm, dan satu sinyal atom karbon pada δ_C 20.1 ppm dirujuk sebagai karbon gugus metil (CH₃-, C-24). Pencarian sub-struktur dari senyawa **5** dalam AntiBase (Laatsch, 2011) berdasarkan data NMR dan SM merujuk kepada struktur macrolactin A yang lebih lanjut strukturnya diperkuat oleh data literatur yang telah dilaporkan oleh Mohamed (2010). Hasil uji aktivitas biologis dari macrolactin A (**5**) juga memperlihatkan aktivitas sitotoksik terhadap *A. salina*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bakteri *Streptomyces* merupakan sumber baru yang potensial untuk pencarian senyawa-senyawa bahan obat atau zat antibiotik. Empat senyawa metabolit sekunder, yaitu asam *p*-hidroksifenilasetat (**2**), asam indole-3-karboksilat (**3**), asam indole-3-asetat (**4**) dan macrolactin A (**5**), telah diisolasi dari *marine Streptomyces* sp. B5798. Selain itu, macrolactin A (**5**) memperlihatkan aktivitas sitotoksik pada uji *brine-shrimps* terhadap *A. salina*.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Mr. R. Machinek, Dipl.Chem., Dr. H. Frauendorf dan Dr. E. Helmke untuk pengukuran spektra spektroskopi NMR dan spektrometri massa serta sampel strain *Streptomyces* sp. B9758. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. H. Laatsch dan DAAD sebagai pembimbing dan penyandang dana beasiswa studi program doktor di Jerman.

Daftar Pustaka

- Ayer, W.A., L.S. Trifonov. 1995. Phenolic and polyketide metabolites of the aspen blue stain fungus *Ophiostoma crassivaginata*. *Phytochemistry*, 38: 371-372.
- Clardy, J., M.A. Fishbach, C.T. Walsh. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, 24: 1541-1550.
- Dharmaraj, S. 2010. *Marine Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 2123-2139.
- Fenical, W. 1993. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem. Rev.*, 93: 1673-1683.
- Laatsch, H. 2011. *AntiBase, A Database for Rapid Dereplication and Structure Determination of Microbial Natural Products*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., Weinheim, Germany: see Internet <http://wwwuser.gwdg.de/~hlaatsc/Antibase.htm>.
- Madigan, M., J. Martinko (eds.). 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. Edisi ke-11. Prentice Hall. London.
- Mohamed, M.A.A. 2010. *ent-Homoabyssomicins A and B, two new spirotetronates, khatmiamycin, a zoosporicidal naphthoquinone, and further new biologically active secondary metabolites from marine and terrestrial Streptomyces spp.*, PhD Thesis, University of Goettingen, Germany.

- Nakanishi, K. 1999. An historical perspective of natural products chemistry. *dalam* S. Ushio (ed.), Comprehensive natural products chemistry, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 23-30.
- Newman, D.J., G.M. Cragg, K.M. Snader. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17: 215-234.
- Newman, D.J., G.M. Cragg. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, 70: 461-477.
- Newman, D.J., G.M. Cragg. 2004. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr. Med. Chem.*, 11: 16893-1713.
- O'connor, K. E., B. Witholt, W. Duetz. 2001. *p*-Hydroxyphenylacetic acid metabolism in *Pseudomonas putida* F6. *J. Bacteriol.*, 183: 928-933.
- Saleem, M., S.M. Ali, S. Hussain, A. Jabbar, M. Ashraf, S.Y. Lee. 2007. Marine natural products of fungal origin. *Nat. Prod. Rep.*, 24: 1142-1152.