

ISOLASI ANTIBIOTIK REDUKTIOMISIN DARI BAKTERI *TERRESTRIAL Streptomyces* sp

Isolation of the Antibiotic Reducomycin from a Terrestrial Bacterium Streptomyces sp.

Muhammad Bahi¹ dan Rinaldi Idroes¹

¹Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh
E-mail: bahi.usk@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi dan penentuan aktivitas mikrobial senyawa bioaktif reduktiomisin dari bakteri *Streptomyces* sp. Ank181 daratan (*terrestrial*). Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium kimia organik, Institute of Organic and Biomoleculare Chemistry, University of Goettingen, Germany. Isolat dan subkultur agar bakteri *Streptomyces* sp. Ank181 diperoleh dari koleksi sampel genus *Streptomyces* Professor Dr. H. Anke, Institute for Biotechnology and Drug Research, Kaiserslautern, Germany. Struktur reduktiomisin dalam penelitian ini dielusidasi berdasarkan data spektroskopi dan spektrometri massa. Tiga senyawa metabolit sekunder telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari bakteri tanah genus *Streptomyces* sp. Ank181, yaitu reduktiomisin, asam 2,3-dihidroksibenzoat, dan asam indole-3-karboksilat. Hasil uji antimikroba menunjukkan bahwa reduktiomisin bersifat bioaktif terhadap bakteri, jamur dan sitotoksik terhadap *Artemia salina*.

Kata kunci: antibiotik, reduktiomisin, *Streptomyces* sp., antimikroba

ABSTRACT

This research was aimed to isolate and screen antimicrobial activity of reducomycin from terrestrial bacterium *Streptomyces* sp. Ank181. The research had been conducted at organic chemistry laboratory, Institute of Organic and Biomoleculare Chemistry, University of Goettingen, Germany. Isolate and agar subculture of bacterium *Streptomyces* sp. Ank181 were received from a collection of Professor Dr. H. Anke, Institute for Biotechnology and Drug Research, Kaiserslautern, Germany. Reducomycin structure was elucidated based on spectroscopic and mass spectrometry data. In this research, three secondary metabolites has been isolated and identified from terrestrial bacterium *Streptomyces* sp. Ank181, namely reducomycin, 2,3-dihydroxybenzoic acid and indole-3-carboxylic acid. Antimicrobial bioassay of reducomycin showed activities against bacteria, fungi and cytotoxic against *Artemia salina*.

Key words: antibiotics, reducomycin, *Streptomyces* sp., antimicrobial

PENDAHULUAN

Resistensi terhadap zat antibiotik yang meningkat secara drastis pada mikroorganisme yang bersifat patogen bagi manusia telah menarik perhatian bagi para ilmuwan kimia dan farmasi untuk mencari sumber dan jenis antibiotik yang baru. Bakteri seperti genus *Streptomyces* merupakan salah satu sumber baru untuk pencarian senyawa bahan alam bioaktif dan juga telah banyak digunakan sebagai bahan obat dan bahan kimia pertanian (Williams *et al.*, 1983; Elleuch *et al.*, 2010). Streptomisin merupakan salah satu contoh bahan bioaktif yang diisolasi dari genus *Streptomyces* yang kemudian dipakai untuk pengobatan penyakit *tuberculosis* (TBC) (Buss dan Butler, 2010). Selain itu, Sayuti *et al.* (2012) juga telah melaporkan penggunaan kombinasi antibiotik dan prostaglandin untuk terapi percepatan pengeluaran leleran pada sapi.

Streptomyces merupakan salah satu genus bakteri Gram positif dari filum Actinobacteria. Bakteri *Streptomyces* dapat berkembang biak dengan cara sporalisasi atau pembentukan hifa seperti layaknya jamur. Cara perkembangbiakan melalui spora merupakan keunikan dari bakteri genus *Streptomyces*, sehingga pada awalnya digolongkan ke dalam klas jamur (Flardh dan Buttner, 2009).

Daratan dan perairan (*terrestrial and aquatic*) merupakan habitat hidup dari bakteri ini dan beberapa

jenis strain bersifat patogen pada tanaman dan hewan (Flardh dan Buttner, 2009; Dharmaraj, 2010). Ikan, hewan moluska, tumbuhan bakau, dan rumput laut merupakan habitat hidup dari bakteri genus *Streptomyces* (Dharmaraj, 2010; Bahi, 2012).

Reducomisin adalah contoh lain dari senyawa antibiotik yang berasal dari bakteri genus *Streptomyces*. Shimizu dan Tamura (1981) pertama sekali mengisolasi dan melaporkan reduktiomisin dari strain Actinomycete S551 yang berasal dari sampel tanah di Osaka-shi Jepang pada tahun 1981. Senyawa tersebut merupakan senyawa antibiotik baru yang berasal dari mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi dan penentuan aktivitas antimikroba senyawa bioaktif reduktiomisin dari bakteri *Streptomyces* sp. Ank181 daratan (*terrestrial*).

MATERI DAN METODE

Sampel Bakteri *Streptomyces* sp. Ank181 dan Lokasi Penelitian

Isolat dan subkultur agar bakteri *Streptomyces* sp. Ank181 diperoleh dari koleksi sampel genus *Streptomyces* Professor Dr. H. Anke, Institute for Biotechnology and Drug Research, Kaiserslautern, Germany. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium kimia organik, Institute of Organic and Biomoleculare Chemistry, University of Goettingen, Germany.

Metode Penelitian

Pelarut organik yang digunakan untuk ekstraksi dan kromatografi kolom adalah jenis pelarut yang berkualitas analitik dan industri. Silika gel G-60 70-230 mesh ASTM (Merk 774) digunakan sebagai adsorben dalam kolom kromatografi. Plat kromatografi lapis tipis (KLT) yang digunakan untuk analisis pola noda adalah *polygram SIL G/UV₂₅₄* (Macherey-Nagel & Co.). Pereaksi semprot penampak noda pada plat KLT adalah *p*-metoksibenzaldehid/asam sulfat. Spektra ¹H dan ¹³C NMR masing-masing diukur dengan menggunakan alat varian unity 300 (300,145 MHz) dan Varian Inova 600 (599,7 MHz), TMS digunakan sebagai standar internal sedangkan spektra spektrometri massa (SM) diukur dengan menggunakan alat spektrometer massa Finnigan MAT 95 (70 eV).

Fermentasi dan Isolasi

Subkultur agar *Streptomyces* sp. Ank181 diinokulasi dalam 25 l medium kultur M₂ pada pH 7,8 yang terlebih dahulu medium kulturnya disterilisasi pada suhu 105° C dengan autoklaf selama 2 jam, dan kultur tersebut difermentasi selama 6 hari pada suhu 28° C. Kultur yang berwarna kuning dipanen pada hari ke-6 dan disaring dengan *celite* menggunakan penyaring tekan. Filtratnya kemudian dilewatkan pada kolom resin XAD-16 dan dielusi dengan pelarut metanol sehingga diperoleh ekstrak kasar metanol sedangkan campuran *celite* dan biomassa diekstraksi dengan pelarut etil asetat sehingga diperoleh ekstrak kasar etil asetat. Kromatografi lapis tipis (KLT) dari kedua ekstrak kasar, fase organik methanol, dan etil asetat, menunjukkan pola noda yang sama sehingga kedua ekstrak fase organik tersebut digabung, dan diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* bertekanan rendah. Residu yang diperoleh sebanyak 3,10 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/metanol (0 sampai 50% MeOH) sehingga diperoleh 4 fraksi kasar (fraksi I-IV). Subfraksi pertama mengandung lemak sehingga tidak dipisahkan lebih lanjut. Fraksi II, III, dan IV masing-masing dipisahkan dan dimurnikan lebih lanjut, dengan menggunakan kolom Sephadex LH-20 (pelarut metanol) dan dimonitor dengan KLT, sehingga diperoleh isolat secara berturut-turut; reduktiomisin (2, 20.10 mg), dan dua senyawa trivial yaitu asam 2,3-dihidroksibenzoat dan asam indole-3-karboksilat.

Uji antimikroba dan sitotoksik

Pengujian aktivitas antimikroba dari senyawa isolat murni dilakukan dengan metoda dilusi agar berdasarkan aktivitas daya hambat minimum pada media agar, yang menggunakan medium *potato dextrose agar* (PDA) untuk bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), dan medium *sabouraud dextrose agar* (SDA) untuk jamur (*Candida albicans*

dan antibiotik aktimonisin-D sebagai referensinya. Pengujian sitotoksik dari senyawa isolat murni dilakukan dengan menggunakan metoda *brine shrimp lethality test* (BSLT) terhadap *Artemia salina*.

Reduktiomisin

Kristal jarum berwarna kuning, bersifat semi polar, menyerap sinar lampu ultra violet (UV) pada λ 254 dan 366 nm, dan noda pada KLT berwarna hijau dengan pereaksi semprot penampak noda *p*-metoksibenzaldehid/asam sulfat (setelah dipanas pada suhu oven 105° C). – *R_f* = 0.30 (CH₂Cl₂/5% MeOH). – ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 13.76 (br s, 1 H, 3-OH), 7.68 (br s, 1 H, 2-NH), 7.50 (d, ³*J* = 15.1 Hz, 1 H, H-3"), 6.90 (s, 1 H, H-5'), 6.70 (dd, ³*J* = 7.5, 2.3 Hz, 1 H, H-2'), 5.81 (d, ³*J* = 15.1 Hz, 1 H, H-2"), 3.05 (m, 1 H, H_A-3'), 2.60 (m, 5 H, 4,5-CH₂, H_B-3'), 2.01 (s, 3H, CH₃CO-). – (–)-ESI MS: *m/z* (%) = 607 ([2M-H+Na]⁺, 100), 292 ([M-H]⁺, 77)

HASIL DAN PEMBAHASAN

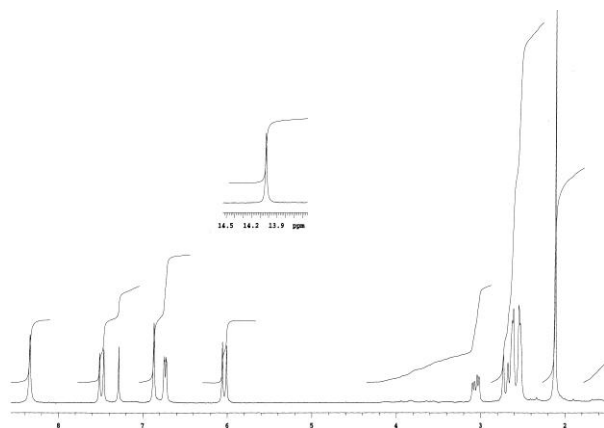
Strain Ank181 dikonfirmasi sebagai bakteri genus *Streptomyces* melalui analisis 16S rRNANYA. Skrining uji bioasai terhadap ekstrak kasar dari strain *Streptomyces* sp. Ank181 menunjukkan aktivitas daya hambat yang sedang terhadap bakteri dan jamur. Selain itu, KLT ekstraknya memperlihatkan beberapa pola noda yang berbeda di bawah sinar lampu UV pada λ 254 nm.

Senyawa reduktiomisin diisolasi dari subfraksi II dengan kolom Sephadex-LH20 dan pelarut MeOH dan diperoleh kristal jarum berwarna kuning. Senyawa reduktiomisin menunjukkan pita serapan UV pada λ 254 dan 366 nm, dan KLT nodanya berwarna hijau tua dengan pereaksi semprot penampak noda *p*-metoksibenzaldehid/asam sulfat (setelah dipanas pada suhu oven 105° C).

Spektrum ¹H NMR senyawa reductimisin (Gambar 1) menunjukkan dua singlet yang melebar dari proton yang dapat dipertukarkan (*exchangeable*) antara gugus –OH dan gugus –NH pada δ 13,76 dan 7,68 pada struktur reductiomycin. Dua sinyal *doublet* yang muncul pada δ 7,50 ppm (³*J* = 15,1 Hz) dan 5,81 ppm (³*J* = 15,1 Hz) pada spektrum ¹H NMR menunjukkan adanya fragmen α,β-tak jenuh dari senyawa turunan karbonil dengan konfigurasi *trans*-terdisubstitusi. Sinyal singlet dengan intensitas 3H pada δ 2.01 ppm menyarankan adanya gugus metil (CH₃-) yang berikatan dengan atom karbon *sp*² dari gugus karbonil. Salah satu dari dua proton diastereotopik gugus metilen (CH₂-3') menunjukkan sinyal *doublet-doublet* pada δ 3.05 ppm sedangkan, *multiplet* pada δ 2.60 ppm dengan intensitas 5 proton merupakan sinyal proton dari dua gugus metilen lainnya, serta satu proton diastereotopik dari gugus metilen (CH₂-3') yang saling tumpang tindih.

Hasil analisis ESI-SM diperoleh massa molekul senyawa reduktiomisin sebesar 293 Dalton. Massa molekulnya merupakan kelipatan bilangan ganjil dan

mengindikasikan adanya atom nitrogen dalam struktur senyawa reduktiomycin. Berdasarkan analisis data spektra NMR dan SM serta *software* AntiBase (Laatsch, 2011) disarankan bahwa reduktiomisin sebagai struktur dari senyawa reduktiomycin. Selanjutnya, struktur senyawa reduktiomisin dikonfirmasi melalui perbandingan data eksperimen penelitian ini dengan data eksperimen dari literatur (Shimizu dan Tamura, 1981; Laatsch, 2011).



Gambar 1. Spektrum ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) senyawa reduktiomisin

Selanjutnya, hasil uji aktivitas biologi menunjukkan bahwa reduktiomycin bersifat antimikroba terhadap bakteri, jamur dan sitotoksik, seperti yang disajikan pada Tabel 1. Shimizu dan Tamura (1981) juga telah melaporkan bahwa reduktiomycin digolongkan sebagai zat antibiotik yang aktif terhadap bakteri Gram positif, jamur, virus penyebab penyakit *newcastle*. Penyakit *newcastle* merupakan salah satu penyakit yang banyak terjangkit pada hewan ternak ayam. Penyakit *newcastle* ini disebabkan oleh virus *Avian paramyxovirus type-1* (Kencana *et al.*, 2012).

Tabel 1. Aktivitas antimikroba reduktiomisin

Mikroorganisme uji	Diameter zona inhibisi (mm)
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	11
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	12
<i>Artemia salina</i>	100%

KESIMPULAN

Tiga senyawa metabolit sekunder telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari bakteri tanah genus *Streptomyces* sp. Ank181, yaitu reduktiomisin, asam 2,3-dihidroksibenzoat, dan asam indole-3-karboksilat. Hasil uji antimikroba menunjukkan bahwa reduktiomisin bersifat bioaktif terhadap bakteri, jamur, dan sitotoksik terhadap *Artemia salina*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Mr. R. Machinek, Diplom.Chem., Dr. H. Frauendorf dan Prof. Dr. H. Anke untuk pengukuran spektra spektroskopi NMR, spektrometri massa dan sampel bakteri *terrestrial Streptomyces* sp. Ank. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. H. Laatsch dan DAAD sebagai pembimbing dan penyandang dana beasiswa program doktor selama di Jerman.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahi, M. 2012. Isolasi dan karakterisasi senyawa metabolit sekunder dari bakteri laut *Streptomyces* sp. **Depik**. 1:159-162.
- Buss, A.D. and M.S. Butler. 2010. **Natural Product Chemistry for Drug Discovery**. RCS Publishing, Cambridge, UK.
- Dhamaraj, S. 2010. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26:2123-2139.
- Elleuch, L., M. Shaaban, S. Smaoi, L. Mellouli, I.K. Rebai, L.F. Fguira, K.A. Shaaban, and H. Laatsch. 2010. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162:579-563.
- Flardh, K. and M. J. Buttner. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature** 7:36-49.
- Kencana, G.A.Y., I.M. Kardena, dan I.G.N.K. Mahardika. 2012. Peneguhan diagnosis penyakit *Newcastle Disease* lapang pada ayam buras di Bali menggunakan teknik RT-PCR. **Jurnal Kedokteran Hewan**. 6(1):28-31.
- Laatsch, H. 2011. **AntiBase: A Database for Rapid Dereplication and Structure Determination of Microbial Natural Products**. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., Weinheim, Germany.
- Sayuti, A., J. Melia, Amrozi, Syafruddin, Roslizawaty, dan Y. Fahrimal. 2012. Gambaran klinis sapi piometra sebelum dan setelah terapi dengan antibiotik dan prostaglandin secara intra uteri. **Jurnal Kedokteran Hewan** 6(2):99-101.
- Shimizu, K. and G. Tamura, 1981, Reductiomycin, a new antibiotic. **J. Antibiot.** 34:654-657.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M. Wllington, P.H. Sneath, and M.J. Sacki. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **J. General Microbiol.** 129:1747-1813.