

PENGARUH MONOSAKARIDA DAN PENGGUNAAN SUMBER KARBON LOKAL PADA PEMBENTUKAN ERITROMISIN PADA FERMENTASI *Streptomyces erythreus*

THE INFLUENCE OF MONOSACCHARIDES AND LOCAL CARBON SOURCES ON ERYTHROMYCIN PRODUCTION FROM FERMENTATION OF Streptomyces erythreus

*Haryanto Dh., Amir Musadad, Marlia Singgih dan Doddy Kustaryono
Lab Bioproses-Kimia Medisinal, Jurusan Farmasi FMIPA, Institut Teknologi Bandung*

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh beberapa monosakarida pada fermentasi eritromisin dan penggunaan sumber karbon lokal untuk produksi eritromisin dari *Streptomyces erythreus*.

Dari percobaan diamati pengaruh d-glukosa terhadap pertumbuhan sel dan produksi eritromisin. Pengaruh konsentrasi glukosa terhadap peningkatan produksi eritromisin pada medium A tertinggi pada konsentrasi 10 mg/ml sedangkan analog glukosa (2 deoksi-d-glukosa) tidak mempengaruhi pertumbuhan tetapi menghambat pembentukan antibiotik.

Efek penghambatan pembentukan eritromisin terjadi bila ditambahkan pada fase tropofase atau ketika produksi antibiotik belum terbentuk. Tepung kacang lupin dapat digunakan sebagai sumber karbon yang baik untuk produksi eritromisin dengan hasil 8,56 mg/ml cairan fermentasi.

Kata kunci : *Streptomyces erythreus*, eritromisin, monosakarida, analog glukosa, tepung kacang lupin

ABSTRACT

The study was carried out to evaluate the influence of several monosaccharides and local carbon sources for erythromycin production by *Streptomyces erythreus*. The influence of d-glucose was determined against the cell growth and the erythromycin production.

The results showed that at the level of glucose 10 mg/ml in Medium A gave a significant increase of erythromycin production, whereas the use of glucose analog (i.e. 2-deoxy-d-glucose) showed no significant effect on the cell growth but it did inhibit the antibiotic production.

The inhibition effect occurred when the glucose analog was given on tropophase prior to the stationary phase of microbial growth, or when the antibiotic was not produced yet. The Lupin starch could be used as a good carbon source and it gave a good yield of erythromycin for approximately 8.56 mg/ml fermentation broth.

Key words : *Streptomyces erythreus*, erythromycin, monosaccharides, glucose analog, lupin starch

PENDAHULUAN

Antibiotik eritromisin yang termasuk dalam golongan antibiotik makrolida adalah antibiotik spektrum luas yang sangat efektif, mempunyai toksisitas yang rendah pada manusia untuk pengobatan penyakit akibat bakteri gram positif khususnya *Staphylococcus* dan *Diphtheroids*, serta beberapa bakteri yang sudah resisten terhadap penisilin (Gale *et al.*, 1981). Eritromisin merupakan metabolit sekunder yang disintesa oleh galur *Streptomyces erythreus* pada akhir fase tropofase (Crueger and Crueger, 1984).

Pembentukan antibiotika dan beberapa metabolit sekunder ada yang ditekan produksinya karena penggunaan beberapa sumber karbon (Martin and Demain, 1980). Beberapa sumber karbon seperti glukosa dan fruktosa berpengaruh pada biosintesis antibiotika eritromisin dan glukosa merupakan sumber karbon yang paling menghambat pembentukan antibiotik (Hu and Demain, 1979).

Untuk tujuan produksi eritromisin secara komersial, dicoba penggunaan medium lokal yang murah dan menghasilkan produk yang baik. Oleh karena itu dicoba beberapa sumber karbon diantaranya penggunaan tepung kacang lupin, tepung jagung, dan tepung pisang.

Pada penelitian ini juga dilihat efek d-glukosa, fruktosa, dan analog glukosa pada pertumbuhan sel *Streptomyces erythreus* dan penekanan pembentukan eritromisannya.

METODOLOGI

Bahan. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Streptomyces erythreus* dan *Sarcina lutea* yang didapat dari Lab. Bioproses, Kimia Medisinal Jurusan Farmasi ITB yang dipelihara dalam medium Potato Dekstrose Agar (PDA-Difco). Medium pertumbuhan yang digunakan untuk penentuan efek *transient repression* pada pembentuk eritromisin adalah medium (A) yang terdiri dari : 0,4 g ekstrak ragi, 0,3 g ekstrak malt dalam setiap 100 ml larutan dapar fosfat pH 7 (Crueger and Crueger, 1984).

Jalan penelitian. Untuk pembuatan inokulum, sekitar 10^8 spora *Streptomyces erythreus* (dari kultur padat yang berumur 7 hari) diinokulasikan dalam 10 ml medium A dalam tabung erlenmeyer 50 ml dan diinkubasi pada suhu 29°C selama 28 jam pada pengocok orbital dengan kecepatan 160 rpm. Untuk produksi antibiotik, 5% inokulum ditambahkan ke dalam 50 ml medium A pada tabung erlenmeyer 250 ml dan diinkubasi pada suhu 29°C selama 3 hari. Glukosa, fruktosa, dan galaktosa disterilisasi terpisah dan ditambahkan pada medium A sesuai dengan konsentrasi yang akan dicoba. Pada jam ke 24 ditambahkan n-propanol sebagai penginduksi sebanyak 0,2%.

Untuk Percobaan bahan baku lokal sebagai medium produksi eritromisin digunakan 3 macam komposisi fermentasi medium, sedangkan untuk media pertumbuhan digunakan satu macam saja yaitu dengan komposisi : Cairan rendaman jagung (CSL) 16 g, Sukrosa 30 g, Amonium Sulfat 2 g, Kalsium karbonat 7 g untuk setiap 1 liter. Untuk media Fermentasi digunakan media seperti yang tercantum dalam tabel I.

Penentuan kualitatif eritromisin dilakukan dengan penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (Weinstein and Wagman, 1973), dan penetapan potensinya dilakukan dengan cara penentuan diameter hambat cairan fermentasi terhadap mikroorganisme *Sarcina lutea*, dengan baku pembanding Eritromisin A (PPOM).

Tabel I. Medium fermentasi eritromisin dengan menggunakan *Streptomyces erythreus*

| Medium B | | Medium C | | Medium D | |
|-------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------|---------|
| Tepung kacang | | Tepung jagung | 50 g | Tepung pisang | |
| Lupin | 40 g | | | Kepok | 50 g |
| CSL | 5 g | | | CSL | 5 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2 g | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2 g | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 g |
| CaCO ₃ | 6 g | CaCO ₃ | 6 g | CaCO ₃ | 6 g |
| Minyak kelapa | 6,7 ml | minyak kelapa | 6,7 ml | Minyak kelapa | 6,7 ml |
| Aquadest ad | 1 liter | Aquadest ad | 1 liter | Aquadest ad | 1 liter |

Penetapan pertumbuhan dilakukan dengan cara mengukur *packing micelle volume* (PMV) dengan cara mensentrifugasi cairan fermentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, atau dengan menghitung kadar protein sel dengan cara miselia yang telah dikumpulkan dicuci dengan air suling dan ditambahkan asam trikloroasetat 0,3 M setelah disentrifugasi diresuspensikan kedalam 0,4 ml NaOH dan kadar protein ditetapkan secara metode Lowry, dengan serum albumin sebagai standar.

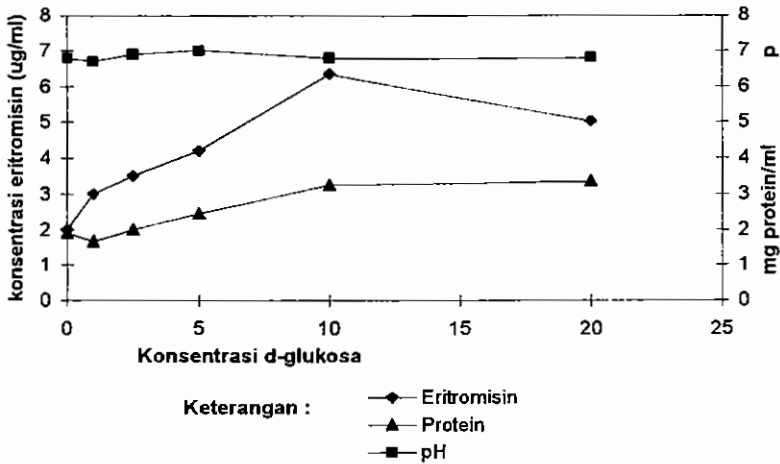
Penetapan kadar gula total dilakukan dengan menggunakan pereaksi Antron, dan penetapan kadar gula pereduksi digunakan pereaksi Nelson-Somogyi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

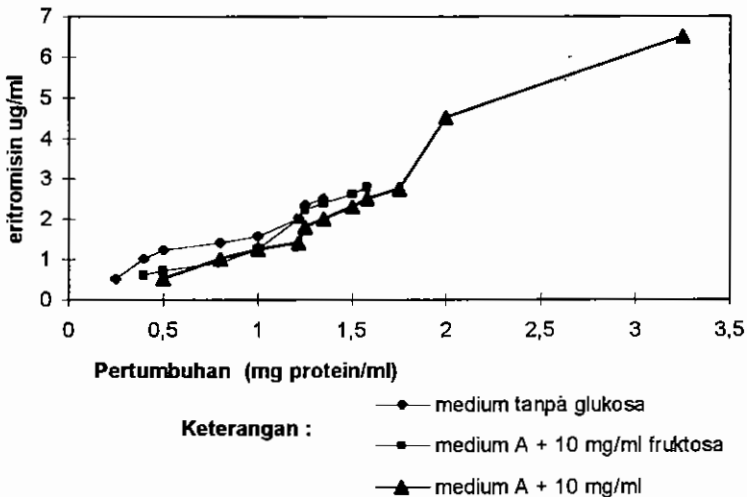
Streptomyces erythreus memproduksi eritromisin pada kondisi temperatur 29° C. Mulai pada jam ke 48 sampai jam ke 72, terjadi peningkatan jumlah mikroorganisme diikuti dengan peningkatan produksi eritromisin. Disini dilihat pula adanya suatu hubungan antara ketersediaan glukosa dengan peningkatan pertumbuhan dari miselium, terlihat dari meningkatnya jumlah kadar protein sel. Ketersediaan glukosa membuat sel lebih besar yang mengakibatkan terjadi peningkatan produksi eritromisin (gambar 1).

Untuk melihat pengaruh efek glukosa maka dicoba beberapa konsentrasi monosakarida kemudian dilihat pertumbuhan bakteri dan pembentukan eritromisiny. Glukosa dapat menstimulasi pembentukan eritromisin tapi juga dapat menekan pembentukan eritromisin tanpa terjadi perubahan pada pH medium. Efek maksimum glukosa untuk merepresi pembentukan eritromisin pada adalah 20 mg/ml (gambar 2). Pengaruh supresi glukosa diamati baik pada awal fermentasi, selama fase eksponensial dan selama produksi eritromisin.





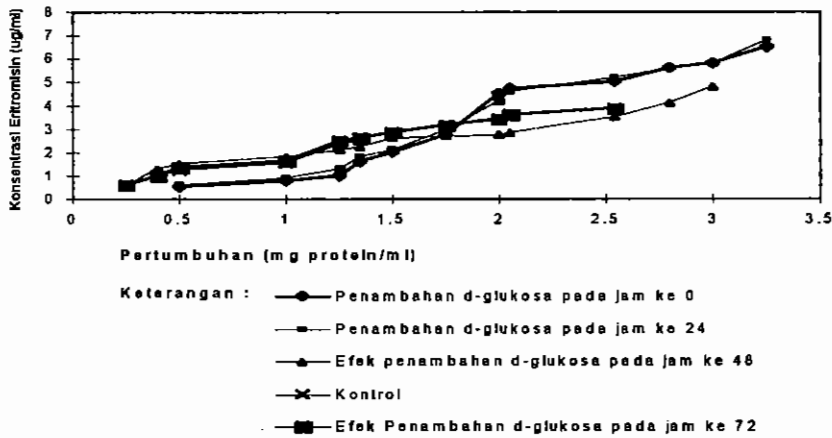
Gambar 1. Efek konsentrasi d-glukosa pada pertumbuhan maksimum



Gambar 2. Efek pembentukan eritromisin akibat penambahan monosakarid pada medium A

Untuk membuktikan pengaruh glukosa terhadap pertumbuhan dan produksi eritromisin dilakukan percobaan mengganti glukosa dengan analog glukosa. Analog glukosa yang dipergunakan adalah 2-deoxy-d-glukosa (Tyler, et. al, 1967). Dari tabel II dapat dilihat bahwa analog glukosa tidak mempunyai efek yang berarti terhadap pertumbuhan mikroorganisme tetapi dapat menghambat pembentukan eritromisin secara berarti, pada konsentrasi analog glukosa yang

lebih tinggi lagi ternyata dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme walaupun tidak secara berarti.



Gambar 3. Efek penambahan d-glukosa pada saat pertumbuhan mikrobahan pembentukan eritromisin

Tabel II. Pengaruh Analog Glukosa Pada Pertumbuhan dan Pembentukan Eritromisin

| Kadar 2-Deoxy-d-glukosa | Pertumbuhan (mg protein/ml) | Jumlah Eritromisin µg/ml |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 0 | 1,8 | 2500 |
| 10 | 1,9 | 1500 |
| 20 | 1,85 | 30 |

Hasil percobaan menunjukkan bahwa efek supresi glukosa terhadap pembentukan eritromisin lebih besar jika penambahan glukosa diberikan sebelum fase produksi antibiotik dibandingkan dengan pemberian pada fase lainnya. Hal ini terjadi karena pada sintesis eritromisin kadar glukosa tertentu dapat menghambat produksi asam lemak dinding sel dan tilosin dengan cara menginduksi pengurangan Asetil CoA yang mempunyai peranan dalam sintesis eritromisin (Hu and Demain, 1979, dan Sawitri, 1989).

Pada pemberian sumber karbon lainnya (fruktosa dan galaktosa) tidak terjadi peningkatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme tetapi pembentukan eritromisin sedikit, hal ini disebabkan karena sintesis eritromisin membutuhkan d-glukosa untuk membentuk d-desosamin dan l-mycarosyl eritrolid B yang akan membentuk eritromisin D (Crueger and Crueger, 1984, Martin and Goldstein, 1980, dan Ostrwska, et.al, 1970).

Percobaan penggunaan bahan baku lokal untuk produksi eritromisin dilakukan dengan cara mengubah komposisi medium berdasarkan data penelitian pendahuluan, yaitu konsentrasi awal gula mereduksi pada fermentasi eritromisin adalah 150 mg/L dan dipertahankan kadarnya agar tetap 90-110 mg/L selama fase tropofase atau selama bakteri memproduksi antibiotik (Sawitri, 1989 dan Martin and Goldstein, 1980). Pada penggunaan bahan baku lokal terlihat bahwa tepung kacang lupin (medium B) memberikan hasil eritromisin yang lebih besar dibandingkan dengan tepung jagung dan tepung pisang, dan efek pemberian glukosa 10 mg/ml setiap 12 jam pada setelah fase pembentukan eritromisin meningkatkan produksi eritromisin. Hal ini disebabkan

karena penambahan glukosa memperpanjang fase tropofase sehingga mikroorganisme terus memproduksi antibiotik.

Dari hasil fermentasi diatas maka dicoba komposisi medium B ke fermentor 5 L. Proses fermentasi medium B dilakukan ketika bakteri pada kultur pertumbuhan mencapai PMV 15% dan segera dipindahkan ke dalam medium produksi dengan jumlah 10% dari volume medium produksi antibiotik

Tabel III. Perbandingan Produksi Eritromisin Menggunakan Bahan Baku Lokal dalam Kultur Kocok yang Diamati Pada Jam ke 72

| Parameter | Medium B (kacang lupin) | Medium C (Tepung jagung) | Medium D (tepung pisang) |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| PH | 6,9 | 6,8 | 6,8 |
| PMV | 30 % | 28 % | 25 % |
| Gula total | 12 g/l | 14 g/l | 16 g/l |
| Gula mereduksi | 0,05 g/l | 0,3 g/l | 0,08 g/l |
| Kadar Eritromisin | 6,2 mg/ml | 5,88 mg/ml | 4,2 mg/ml |

Selanjutnya pH dibuat konstan 6,8-6,9, oksigen terlarut diatur 30% dengan kecepatan aliran 0.6 vvm. Penambahan n-propanol ditambahkan ketika cairan fermentasi mencapai PMV 25-30% kemudian ditambahkan berlanjut setiap 24 jam sampai hari ke 3 untuk meningkatkan hasil produk antibiotik Fermentasi menggunakan medium B ini menghasilkan eritromisin dengan kadar 8.56 mg/ml pada hari ke 7. Pada proses ini terlihat penambahan glukosa 10 mg/ml setiap 24 jam sangat mempengaruhi pertumbuhan dan memperpanjang tropofase sehingga produksi antibiotik meningkat. Pada saat kandungan glukosa menurun terlihat adanya peningkatan pH hingga mencapai 7,2 dan peningkatan kelarutan oksigen. Hal ini terjadi mulai jam ke 36 dan selanjutnya setelah ditambahkan glukosa sehingga beberapa jam kemudian cairan fermentasi kembali pada pH 6,8-6,9.

Pada fermentasi ini ditambahkan propanol 0,2% karena dapat menginduksi sintesis Asetil CoA karboksilase yang menyebabkan peningkatan produksi eritromisin (Martin and Demain, 1980, Sawitri, 1989, dan Martin and Goldstein, 1980)

Tabel IV. Hasil fermentasi *S.erythreus* menggunakan medium B dalam fermentor 5 L

| Jam | pH | PMV (% b/v) | dO ₂ (%) | Total gula (g/l) | gula mereduksi (g/l) | Flow rate (vvm) | Kadar Eritromisin (µg/ml) |
|-----|-----|----------------|------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------------|
| 0 | 7,0 | 15 | 100 | 45 | 0,15 | 0,5 | 0 |
| 12 | 6,8 | 25 | 55 | 35 | 0,12 | 0,6 | 0 |
| 24 | 6,9 | 27 | 35 | 25 | 0,1 | 0,5 | 0 |
| 36 | 6,7 | 30 | 35 | 20 | 0,1 | 0,5 | 0 |
| 48 | 6,7 | 34 | 38 | 15 | 0,1 | 0,5 | 1200 |
| 72 | 6,8 | 38 | 40 | 15 | 0,1 | 0,6 | 2800 |
| 96 | 6,8 | 38 | 40 | 12 | 0,1 | 0,5 | 4500 |
| 120 | 6,8 | 38 | 35 | 12 | 0,1 | 0,5 | 6100 |
| 144 | 6,8 | 38 | 35 | 12 | 0,1 | 0,6 | 7500 |
| 168 | 6,8 | 35 | 32 | 15 | 0,1 | 0,8 | 8560 |

KESIMPULAN

1. Penggunaan glukosa dapat mempengaruhi produksi eritromisin. Peningkatan produksi terjadi pada konsentrasi glukosa 10 mg/ml untuk medium A sebelum proses terjadinya pembentukan eritromisin dan penekanan produksi terjadi bila penambahan d-glukosa diteruskan.
2. Fruktosa tidak menghambat pertumbuhan sel tetapi menurunkan produksi eritromisin secara berarti.
3. Dibandingkan dengan tepung jagung dan tepung pisang kepok, tepung kacang lupin dapat digunakan sebagai sumber karbon yang lebih baik untuk produksi eritromisin dengan hasil eritromisin 8,56 mg/ml pada fermentor 5 L.

DAFTAR PUSTAKA

- Crueger, W. and Crueger, A., 1984, *Biotechnology, A Textbook Industrial Microorganism*, Science Technology Inc., Madison, 217-230
- Gale, E.F., Cundlife. E, Reynolds. P.E, Richmond, M.H, Waring, M.J., *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, 1981, 2nd ed, John Wiley&Sons, NewYork, 467-552
- Hu, W.S., and Demain, A. L., 1979, Regulation of Antibiotic Biosynthesis by Utilizable Carbon Sources, *Process of Biochemistry*, 14, 2-6
- Martin, M and Demain, A. L., 1980, Control of Antibiotic Biosynthesis, *Microbiological Reviews* 44, 230-251
- Martin, J.R and Goldstein, A. W, 1980, Final Steps in Erytromicin Biosynthesis, In Progress in Antimicrobial Agents and Anticancer, *Chemotherapy*, vol 2, 1112-1116
- Ostrowska, K. B, Roszkowski, J., Gaworowska, M.J, and Sawnor, K.D, 1970, Precursor and Control in Erytromicin Biosynthesis, *Acta Microbiologica Polonica*, 2, 103-110
- Sawitri, L, 1989, Studi Penggunaan Na Propionat dan n-butanol Dalam Biosintesis Eritromisin Menggunakan *Streptomyces erytreus* ATCC 11635, *Skripsi Tugas Akhir*, Jurusan Farmasi – FMIPA, ITB.
- Tyler, B., Loomis, W.F., and Magasanik, B., 1967, Transient Repression of Lac Operon, *Journal of Bacteriology*, 94, 2001-20011
- Weinstein, M.J. and Wagman, G. H, 1973, *Antibiotics : Isolation, Separation and Purification*, Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam, 273-305