

## FRAGMENTATION STUDIES OF $\Delta^{6,7}$ -ANHIDROERITROMISIN-A BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY (LC-MS)

$\Delta^{6,7}$ -Anhydroeritromisin-A Sebagai Metabolit Baru Dalam Fermentasi *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635

Khairan<sup>1,\*</sup>, Umar A. Jenie<sup>2</sup>, and Retno S. Sudibyo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Syah Kuala University, Darussalam, Banda Aceh, 23111

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta, 55281

Received March 16, 2009; Accepted October 12, 2009

### ABSTRACT

Semisynthesis of  $\Delta^{6,7}$ -Anhydroerythromycin-A was done by biomodification technique by addition of 0.2% INH into a culture fermentation of *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635 in medium Hutchinson. The aim of this research is to studies of fragmentation pattern from new matabolite of  $\Delta^{6,7}$ -Anhydroerythromycin-A by Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS) and the ionization of mass spectroscopy is use by ESI (Electrospray ionization) pattern. The FT-IR spectrometric analyzes showed a stretching vibration of C=C conjugated group at wave number  $1602.7\text{ cm}^{-1}$ . This C=C conjugated vibration indicated the existence of double bond between C<sub>6</sub> and C<sub>7</sub> ( $\Delta^{6,7}$ ), this confirmed that isolate contained  $\Delta^{6,7}$ -Anhydroerythromycin-A (the possibility of  $\Delta^{6,7}$  was positive). For complementation, a LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) analyzes using ESI-MS (Electrospray ionization-Mass Spectroscopy) ionization pattern was conducted to the isolate which resulted Quassimolecular ions  $[M+H]^+$  of  $\Delta^{7,8}$ - and  $\Delta^{6,7}$ -Anhydroerythromycin-A. LC-MS spectrogram of the isolate, which gave two peaks of  $m/z$  732.2460 and  $m/z$  716.2522, confirmed that the  $m/z$  732.2460 possibly was  $\Delta^{7,8}$ -Anhydroerythromycin-A, while the  $m/z$  716.2502 and  $m/z$  715.2522 possibly were  $\Delta^{6,7}$ -Anhydroerythromycin-A.

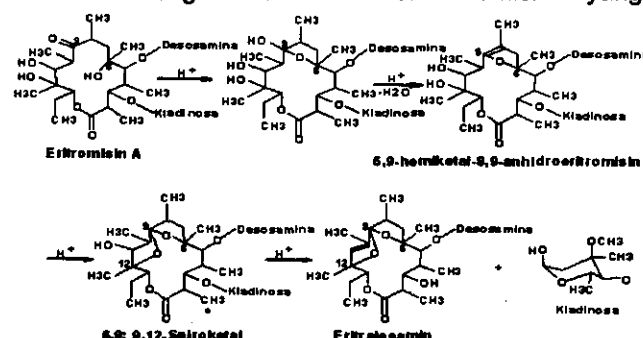
**Keywords:** isoniazid, enoyl reduction,  $\Delta^{6,7}$ -Anhydroeritromisin-A, fragmentation, LC-MS.

### PENDAHULUAN

Eritromisin merupakan salah satu antibiotik pilihan utama yang penting yang digunakan secara klinik untuk melawan infeksi bakteri Gram positif [1]. Dalam pemakaiannya secara *oral* eritromisin kurang stabil dalam kondisi asam lambung, ketidakstabilan eritromisin disebabkan karena dalam suasana asam, eritromisin akan mengalami dekomposisi. Proses dekomposisi ini diinisiasi oleh serangan nukleofilik internal gugus hidroksi C<sub>6</sub> terhadap gugus karbonil C<sub>9</sub>. Serangan ini menyebabkan terbentuknya ikatan eter internal antara C<sub>6</sub> dan C<sub>9</sub> yang terdapat pada cincin makrolakton dari eritromisin sehingga dihasilkan senyawa eritralosamin (Gambar 1) [2]. Senyawa ini bersifat tidak aktif dan menurunkan aktivitas antibiotik eritromisin dalam suasana asam lambung [2-3].

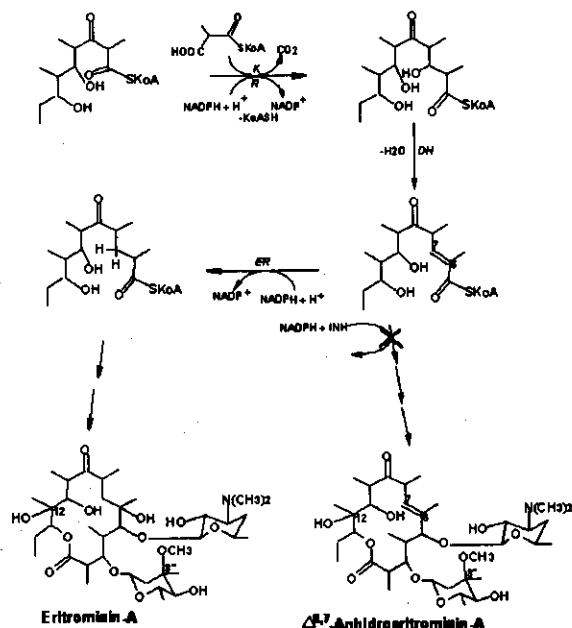
Biosintesis eritromisin terdiri dari dua lintasan yaitu pembentukan cincin makrolida 6-deoksieritronolid-B (6-DEB) dan pembentukan eritromisin A dari 6-DEB. Pada pembentukan 6-DEB terdapat enam langkah di mana pada langkah ke-4 merupakan langkah paling kompleks yaitu terdiri dari kondensasi (K), reduksi  $\beta$ -keto (R),

dehidrasi (DH) dan reduksi enoil (ER). Menurut Donadio *et al.* [4-5] proses reduksi enoil ini dikatalisis oleh enzim yang disebut reduktase enoil. Enzim ini berperan dalam reduksi gugus enoil yaitu reaksi penghilangan atau penghambatan ikatan rangkap ( $\alpha,\beta$ -karbonil tak jenuh) menjadi ikatan jenuh (Gambar 2) [6]. Teknik fermentasi dapat dilakukan dengan penambahan antimetabolit isoniazid (INH) pada *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11912 yang kemudian menghasilkan  $\Delta^{6,7}$ -anhydroeritromisin-D yang

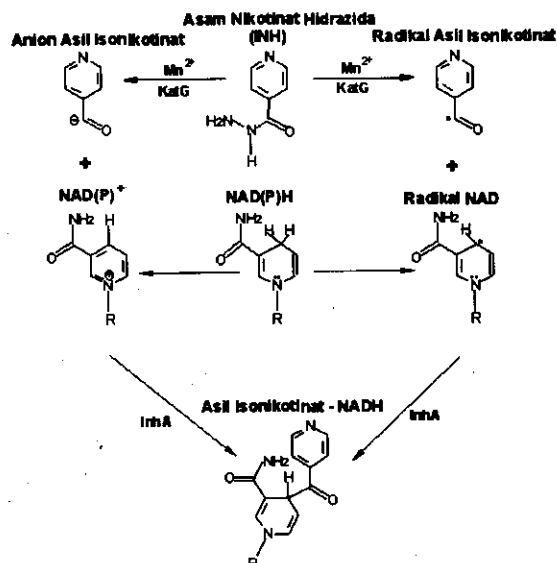


**Gambar 1.** Jalur dekomposisi eritromisin dalam suasana asam

\* Corresponding author. Tel/Fax : +62-651-7555264  
Email address : khannazia\_yusuf@yahoo.com



**Gambar 2.** Penghambatan reduksi enoil dari langkah ke-4 biosintesis eritromisin A oleh INH, sehingga dihasilkan turunan  $\Delta^{6,7}$ -anhidroeritromisin-A.



**Gambar 3.** Mekanisme pengikatan NAD(P)H oleh INH dalam penghambatan proses reduksi enoil.

lebih tahan asam dibanding eritromisin A. Karena eritromisin A jauh lebih poten dibandingkan dengan eritromisin D dan C, maka atas dasar tersebut penelitian ini dilakukan untuk menghasilkan  $\Delta^{6,7}$ -anhidroeritromisin-A melalui penambahan INH ke dalam fermentasi *Sac. erythraea* ATCC 11635 (tipe liar) dengan menggunakan

medium Hutchinson. Mekanisme aksi isoniazid terjadi dengan adanya pengikatan secara kovalen dengan NAD(P)H. Pengikatan tersebut menyebabkan NAD(P)H tidak mampu mereduksi gugus tak jenuh (Gambar 3) [7-8].

*Liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) adalah suatu teknik analisis kimia yang mempunyai kemampuan pemisahan yang sangat bagus karena mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi karena teknik ini menggunakan kombinasi tandem kromatografi cair dan spektroskopi massa. LC-MS sangat umum digunakan dalam studi farmakokinetika terutama dalam hal pengembangan obat. Disamping itu, LC-MS juga dapat digunakan untuk dereplikasi bahan alam, skrining bioafinitas, skrining *in vivo*, stabilitas metabolit, identifikasi metabolit, identifikasi kemurnian suatu obat, identifikasi degradant, kualitas kontrol dan kuantitatif bioanalisis suatu obat [9].

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pola fragmentasi dari metabolit baru  $\Delta^{6,7}$ -Anhidroeritromisin-A menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS).

## METODE PENELITIAN

### Bahan

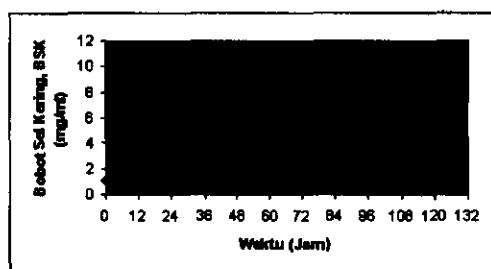
*Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635, mikroba penghasil eritromisin A dan *Micrococcus luteus* ATCC 9341 sebagai mikroba uji potensi antibiotik.

Kaldu NB (*nutrien broth*, Sigma, medium Hutchinson (Sigma), *Tryptic Soy Broth* (Sigma), sukrosa, *Antifoam B* (Sigma),

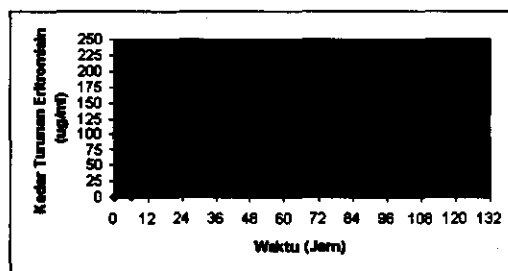
Eritromisin A (Sigma), Isoniazid/INH (Fakultas Farmasi UGM), Pelarut Organik; Etanol (Merck), Kloroform (Merck), Trietilamin (Merck), Karbonetraklorida  $\text{CCl}_4$  (Merck), Metanol (Merck) Plat Kieselgel 60 (Merck), Heksan (JT Baker), dan  $\text{CDCl}_3$ .

### Alat

Fermentor yang dilengkapi dengan *Bio Controller ADI 1030 Applikon*, Spektrometer FT-IR (Shimadzu), TLC-Scanner CAMAG dengan *Software CATS-4*, Spektrofotometer UV-Vis (Beckman DU-7400), Instrumen LC-MS ESI (Perkin Elmer Series 200), *Laminer air flow cabinet*, LAB-LINE *incubator shaker*, *Incubator LEEC*, pH meter (Methrohm 620 dan 691), Neraca analitik digital Chyo SP2-160, Sentrifus Biofuge 13 (Heraeus Sepatech), Sentrifus Megafuge 10 (Heraeus Sepatech), Sentrifus (HERMLE Z231M) dan Sentrifus (Beckman Model J-6B).



**Gambar 4a.** Profil pertumbuhan *Sac. erythraea* ATCC 11635 dengan penambahan INH 0,2% pada akhir fase eksponensial.



**Gambar 4b.** Profil produksi turunan eritromisin hasil fermentasi *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635. dengan penambahan INH 0,2% pada akhir fase eksponensial.

## Prosedur Kerja

### Fermentasi

Beberapa loop spora *Sac. erythraea* ATCC 11635 diinokulasi ke dalam 5 mL kaldu NB (*nutrien broth*, Sigma) kemudian diinkubasi pada *shaking incubator* (LAB-LINE incubator shaker) dengan temperatur 28 °C dan putaran 180 rpm. Kultur kemudian dipindahkan ke dalam 20 mL medium inokulasi I menggunakan medium Hutchinson (Sigma). Setelah 48 jam inkubasi, inokulum I dipindahkan ke dalam 100 mL medium inokulasi II. Fermentasi dengan fermentor dilakukan dengan memindahkan 100 mL inokulum II ke dalam 1 L media produksi yaitu menggunakan *Tryptic Soy Broth* (Sigma) [3g/100 mL] dan sukrosa 2%. *Antifoam B* (Sigma) ditambahkan untuk mengontrol pembentukan *foaming* selama proses fermentasi. Fermentasi di dalam fermentor (Fermentor yang digunakan dilengkapi dengan *Bio Controller ADI 1030 Applikon*) dilakukan dengan agitasi 400 rpm, suhu 28 °C dan pH 7 (menggunakan pH meter Methrohm 620 dan 691). Penambahan antimetabolit INH 0,2% (Isoniazid, Fakultas Farmasi UGM) untuk menghambat proses reduksi enoil dalam biosintesis  $\Delta^{6,7}$ -anhydroeritromisin-A dilakukan pada akhir fase eksponensial (sekitar jam ke-72 fermentasi dalam media produksi) yaitu saat eritronolid belum terbentuk. Profil pertumbuhan dihitung berdasarkan berat sel kering (BSK), sedangkan profil produksi turunan eritromisin dilakukan dengan mengukur zona hambatan dari bakteri uji *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Semua peralatan gelas dan media fermentasi disterilkan menggunakan *Autoclave* (All American Model 26x, EA 630 Eastern, VEB MLW Medizinische).

### Pemurnian dan Isolasi

Supernatan yang diperoleh dari pencuplikan dalam fermentor dipisahkan dengan melakukan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 15 menit (menggunakan Sentrifus Biofuge 13 Heraeus Sepatech) dan disaring

(menggunakan kertas saring Wattman). Supernatan yang diperoleh diatur hingga pH 7 dan diekstraksi dengan kloroform (Merck), yang selanjutnya diuapkan dengan menggunakan *rotavapor vakum* (Rotavapor vakum Büchi 461) sehingga diperoleh sari kering/isolat hasil pemisahan. Hasil sari kering ini dianalisis dengan KLT (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck) dengan eluen etanol:metanol:triethylamin (170:30:1). Hasil analisis dengan KLT selanjutnya diamati di bawah lampu UV (Spektrofotometer UV-Vis, Beckman DU-7400) sementara nilai Rf nya ditentukan menggunakan *TLC-Scanner* CAMAG dengan *Software* CATS-4.

### Penegasan Struktur

Penegasan strukturnya dianalisis menggunakan spektrometer FT-IR (Spektrometer FT-IR Shimadzu). Bobot massanya dilakukan menggunakan spektrometer LC-MS, *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (Instrumen LC-MS ESI Perkin Elmer Series 200) dengan pola ionisasi spektroskopi massanya menggunakan pola ionisasi ESI (*Electrospray Ionization*).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Fermentasi

Profil pertumbuhan *Sac. erythraea* ATCC 11635 dalam fermentor menggunakan medium Hutchinson dengan penambahan INH 0,2% menunjukkan produksi sel yang tinggi yaitu sebesar 9,7 mg/mL yang dihasilkan pada hari ke-2 fermentasi (jam ke-48). Sementara produksi turunan eritromisin memberikan hasil yang sangat tinggi yaitu sebesar 228,71 µg/mL yang dihasilkan pada fermentasi hari ke-3 fermentasi (jam ke-65) (Gambar 4a dan Gambar 4b).

Sementara itu, profil produksi turunan eritromisin dilakukan dengan mengukur zona hambatan dari bakteri uji *M. Luteus* ATCC 9341 (Gambar 5).

**Pemurnian dan Isolasi**

Scanning kromatogram metabolit campuran hasil fermentasi *Sac. erythraea* ATCC 11635 menunjukkan bahwa setelah penambahan INH munculnya komponen baru yaitu komponen I dan II, dengan Rf berkisar dari 0,31 – 0,54 dengan Rf optimum 0,45 untuk komponen I dan Rf 0,57 – 0,63 dengan Rf optimum 0,58 untuk komponen II. Metabolit kedua komponen ini diduga adalah metabolit baru yang lebih polar yang masih bercampur, muncul setelah penambahan INH (Tabel 1).

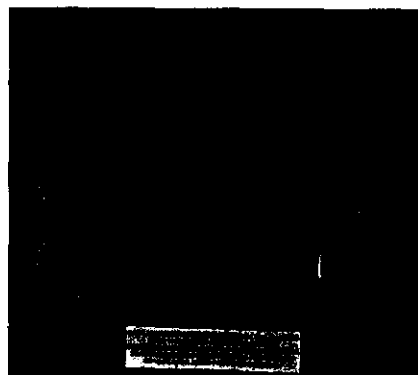
**Pengelasan Struktur**

**Analisis FT-IR**

Analisis spektra FT-IR (Gambar 7) terhadap isolat hasil fermentasi *Sac. erythraea* ATCC 11635 dalam fermentor menunjukkan adanya kemiripan dengan spektra IR eritromisin A standar (Gambar 6). Berdasarkan analisis IR eritromisin A standar kelihatannya ikatan C=C pada bilangan gelombang 1604,7 cm<sup>-1</sup> berada pada posisi Δ<sup>6,7</sup> yang mengadakan konjugasi dengan bentuk enol dari C<sub>8</sub> dan C<sub>9</sub>. Akibat efek ini menyebabkan turunnya intensitas puncak vibrasi beserta nomor bilangan dari gugus C=O keton. Vibrasi ulur ikatan C=O keton cincin aglikon muncul pada bilangan gelombang 1714,6 cm<sup>-1</sup>. Puncak vibrasi ulur dari gugus C=O lakton tidak jelas pada spektrum IR eritromisin A baku. Menurut Silverstein et al [10] vibrasi ulur gugus C=O lakton *conjugated* berada pada bilangan gelombang 1750 – 1720 cm<sup>-1</sup>, sedangkan gugus C=O lakton *non conjugated* memberikan virasi ulur pada bilangan gelombang 1800 – 1760 cm<sup>-1</sup>. Pada umumnya intensitas puncak vibrasi ulur gugus keton jauh lebih kuat dibandingkan dengan intensitas gugus lakton [10]. Sementara itu, spektra IR isolat hasil fermentasi menunjukkan bahwa vibrasi ulur ikatan gugus C=O keton pada bilangan gelombang 1670,2 cm<sup>-1</sup>, sementara gugus C=O lakton muncul berupa 'bahu'

sekitar 1700 cm<sup>-1</sup>. Vibrasi C-O yang *H-bonded* pada bilangan gelombang 1456,2 cm<sup>-1</sup>. Sedangkan puncak yang berasal dari vibrasi ulur gugus C=C besarnya adalah 1667 – 1640 cm<sup>-1</sup> untuk C=C *unconjugated*, dan 1600 cm<sup>-1</sup> untuk C=C *conjugated*. Dari data IR terlihat adanya vibrasi C=C pada bilangan gelombang 1604,7 cm<sup>-1</sup>.

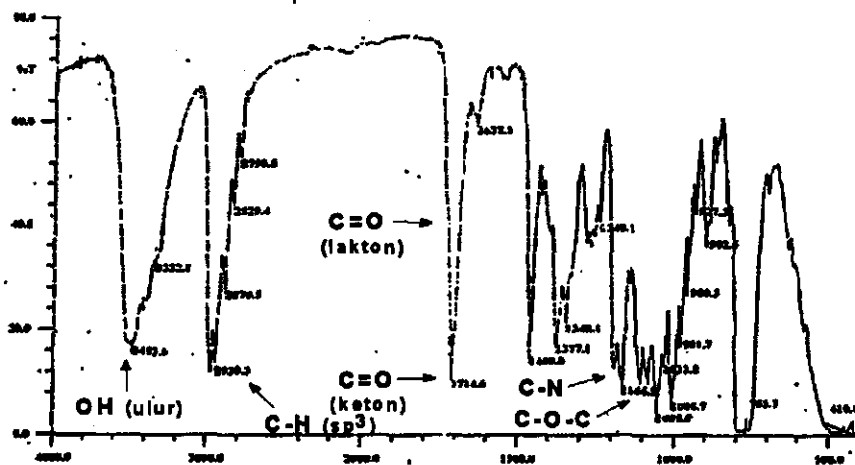
Berdasarkan analisis ini kelihatannya ikatan C=C berada pada posisi Δ<sup>6,7</sup> yang mengadakan konjugasi dengan bentuk enol dari C<sub>8</sub> dan C<sub>9</sub> (Gambar 8). Akibat



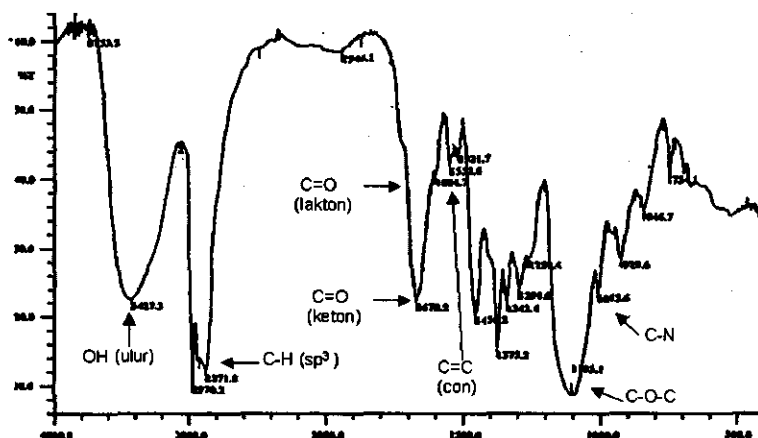
**Gambar 5.** Hasil uji potensi turunan antibiotik hasil fermentasi menggunakan media Hutchinson dengan penambahan INH 0,2%

**Tabel 1.** Perbandingan harga Rf antara komponen I, II, III dan IV dengan eritromisin A dan eritronolid B.

No.	Komponen	Rf optimum	Keterangan
1.	Eritromisin A	0,72	
2.	INH baku	0,51	
3.	Komponen I	0,45	Muncul setelah + INH
4.	Komponen II	0,58	Muncul setelah + INH
5.	Komponen III	0,66	Muncul sebelum + INH
		0,69	Muncul setelah + INH
6.	Komponen IV	0,76	Muncul sebelum + INH
7.	Eritronolid B	0,81	



**Gambar 6.** Spektra IR eritromisin-A baku



Gambar 7. Spektrum IR isolat hasil fermentasi *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635 dalam fermentor menggunakan medium Hutchinson dengan penambahan INH.

Tabel 2. Perbandingan data spektra IR [14], eritromisin A baku dengan metabolit campuran hasil fermentasi kultur *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635 dalam fermentor dengan penambahan INH 0,2%.

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang Menurut Silvester et al [10] (cm <sup>-1</sup> )	Bilangan Gelombang Eritromisin A Baku (cm <sup>-1</sup> )	Bilangan Gelombang Metabolit Campuran (setelah + INH) (cm <sup>-1</sup> )
O-H	3550-3200 (ulur)	3500-3200(ulur)	3427,3(ulur)
C-H (sp <sup>3</sup> )	1420-1330 (tekuk)	1400-1300(tekuk)	1456,2-1375,2(tekuk)
	2975-2791 (ulur)	2975-2790,8(ulur)	2970,2-2871,8(ulur)
	1300-1240 (tekuk)	1300-1240,1(tekuk)	
C=O <sub>laktan</sub>	1750-1730	1730	1670,2
C=O <sub>keton</sub>	1650-1725	1714,6	-
C=C <sub>(uncon)</sub>	1675-1640	-	-
C=C <sub>(con)</sub>	1600-1500	-	1604,7
C-O	1320-1210	1240,1	1298,0
C-N	1250-1020	1190 dan 1166,9	1022,6
C-O-C <sub>glikosidik</sub>	1150-1070	1150-950	1105,1



$\Delta^{6,7}$ -Anhydroerythromisin-A

Bentuk Enol

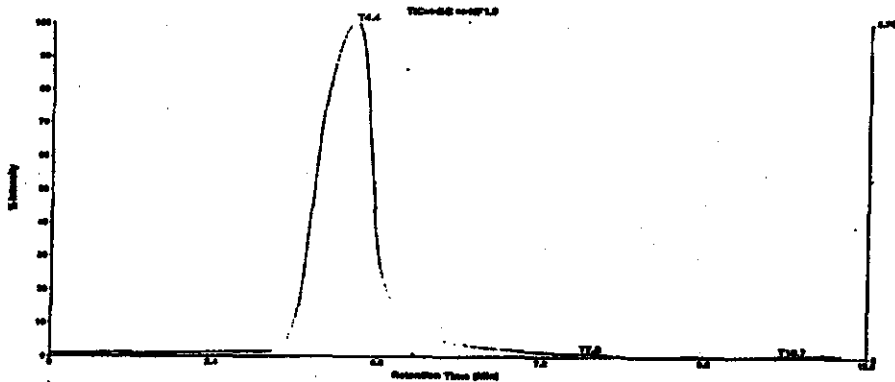
Gambar 8. Efek konjugasi ikatan C=C pada  $\Delta^{6,7}$ -anhydroerythromisin-A.

efek ini menyebabkan turunnya intensitas puncak vibrasi beserta nomor bilangan dari gugus C=O keton. Juga adanya pita vibrasi C-N pada bilangan gelombang 1022,6 cm<sup>-1</sup> dan pita vibrasi C-O-C glikosidik pada bilangan gelombang 1105,1 cm<sup>-1</sup>. Dengan demikian dapat diperkirakan bahwa metabolit ini kemungkinan besar adalah turunan eritromisin. Perbandingan data spektra IR eritromisin A dengan isolat hasil fermentasi *Sac. erythraea* ATCC 11635 dapat dilihat pada Tabel 2.

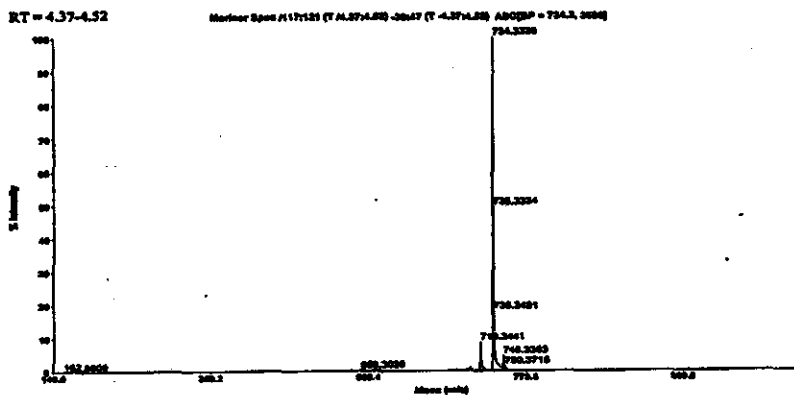
**Analisis LC-MS (ESI-MS)**

**Analisis LC-MS Eritromisin-A Standar.** Data IR isolat hasil fermentasi menunjukkan bahwa kemungkinan besar isolat tersebut mengandung senyawa  $\Delta^{6,7}$ -anhydroerythromisin-A. Untuk penegasan struktur kimia spektroskopi massanya, maka dilakukan analisis LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*). Pada analisis LC-MS ini, maka pola ionisasi spektroskopi massanya menggunakan pola ionisasi ESI (*Electrospray Ionization*). Pada ESI-MS, fragmentasi jarang terjadi, namun *quassimolecular ion*, seperti [M+H]<sup>+</sup> sering terjadi [11]. Pada penelitian ini, isolat dilarutkan terlebih dahulu dalam asam asetat encer, sehingga ion molekul akan muncul sebagai [M+H]<sup>+</sup>.

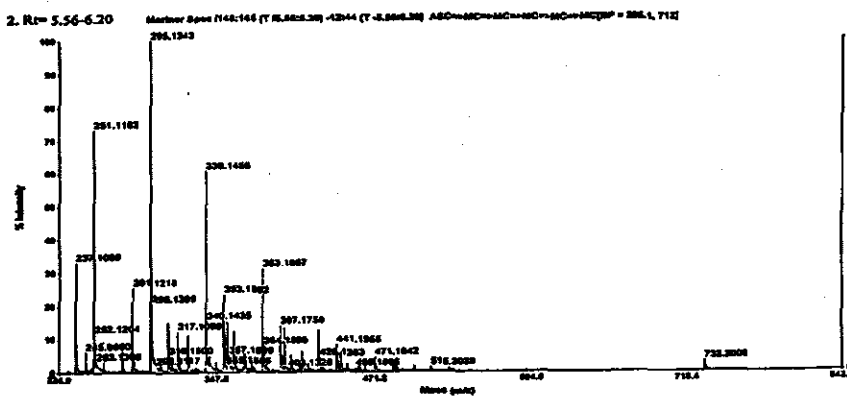
Kromatogram LC-MS eritromisin-A standar memberikan harga *retention time* (RT) sebesar 4,37-4,52 menit atau rata-rata 4,445 menit (Gambar 9). RT pada wilayah 4,37-4,52 ini memberikan satu puncak spektrogram-massa dengan *m/z* 734,3336 (Gambar 10). Puncak spektrogram massa ini jelas merupakan



Gambar 9. Hasil analisis TIC (Total Ion Current) dan retention time (RT) dari eritromisin-A baku.



Gambar 10. Spektrum fragmentasi ESI-MS dari eritromisi-A pada retention time (RT) 4, 37-4,52.

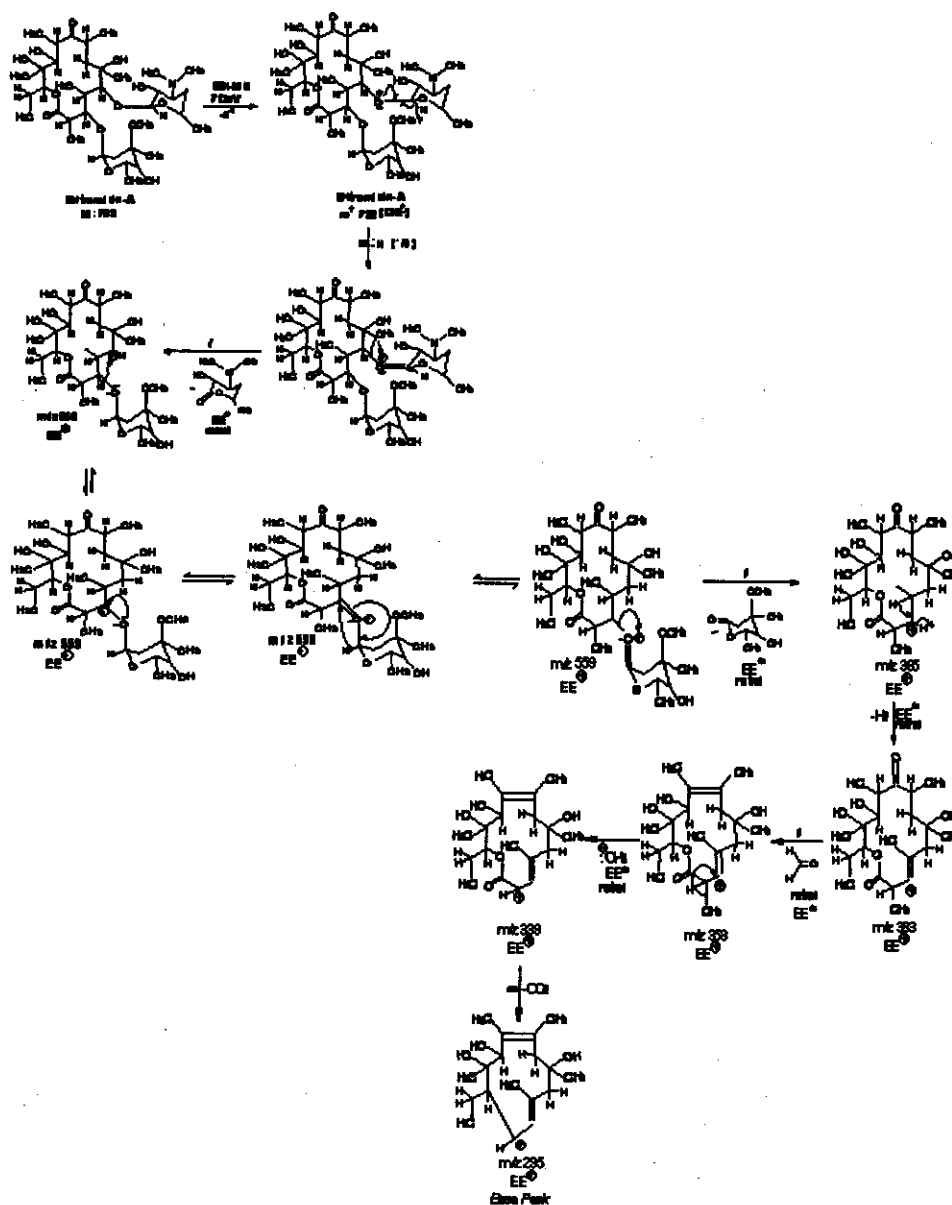


Gambar 11. Spektrum fragmentasi ESI-MS dari eritromisi-A pada retention time (RT) 5,56-6,20.

$[M+H]^+$  dari eritromisin-A baku yang mempunyai BM 733,3336.

Apabila kromatogram LC-MS eritromisin-A standar diambil pada RT 5,56-6,20 menit, yaitu pada waktu eritromisin-A mengalami degradasi, maka spektrogram-massanya menunjukkan adanya fragmentasi ion (Gambar 11). Reaksi fragmentasi eritromisin-A dipaparkan pada Gambar 12.

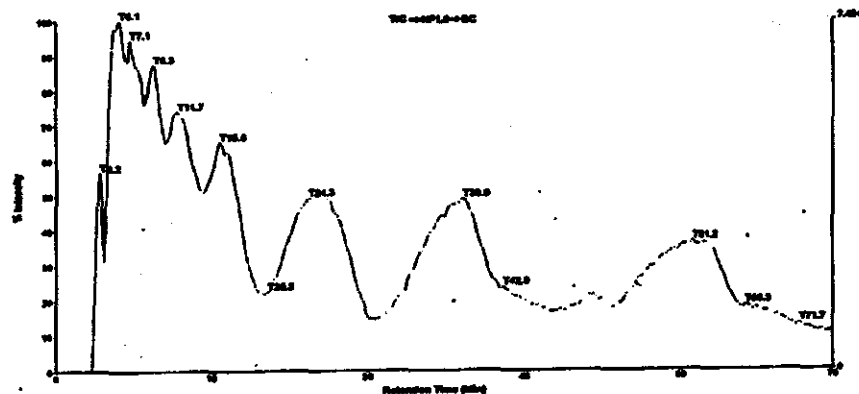
Berdasarkan hasil analisis spektrum ESI-MS dari eritromisin-A (Gambar 12), reaksi pemutusan ikatan glikosidik antara aglikon dan glikon dari eritromisin-A terjadi dalam dua cara mekanisme. Pertama terjadi pemutusan- $\alpha$  ( $\alpha$ -cleavage) dari ion molekul yang diikuti oleh pemutusan induktif (*i*-cleavage) terhadap gula desosamina menghasilkan ion fragmen  $m/z$  559. Pemecahan induktif yang kedua terjadi terhadap gula



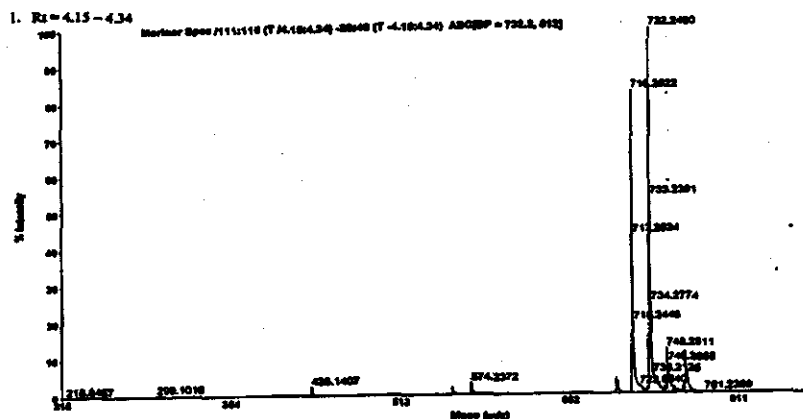
Gambar 12. Pola fragmentasi eritromisin-A baku dalam ESI-MS pada *retention time* (RT) 5,56-6,20.

kladinosa menghasilkan ion fragmen  $m/z$  385. Pemecahan glikosidik glikon terjadi pada sisi O-glikosidik sehingga menyebabkan terbentuknya aglikon tak jenuh (*unsaturated lactone*) dengan melepaskan ion fragmen formaldehid (-CH<sub>2</sub>O,  $m/z$  30). Pada spektrum ESI-MS lakton tak jenuh ini memberikan intensitas puncak yang relatif besar (60%) dengan ion fragmen pada  $m/z$  339. Selanjutnya terjadi pemecahan  $\alpha$  pada glikon tak jenuh dengan melepaskan ion fragmen CO<sub>2</sub> (-CO<sub>2</sub>,  $m/z$  44), pemecahan  $\alpha$  ini menghasilkan *base peak* pada ion fragmen  $m/z$  295 (100%).

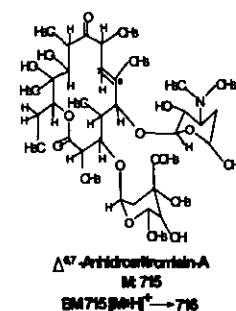
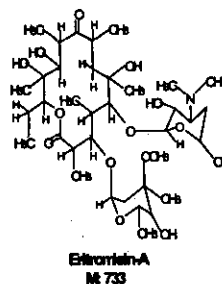
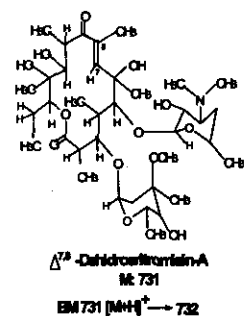
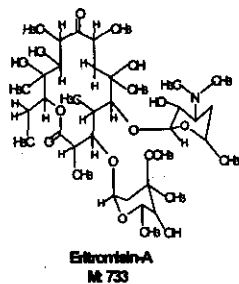
**Analisis LC-MS Terhadap Isolat Hasil Fermentasi.** Kromatogram LC-MS isolat hasil fermentasi memberikan bermacam-macam harga *retention time* (RT) (Gambar 13). RT pada wilayah 4,15-4,34 (rata-rata 4,24 dengan *abundance/intensitas* 58%) memberikan dua puncak spektrogram-massa utama, masing-masing pada  $m/z$  732,2460 dan 716,2522. Jika harga kedua puncak spektrogram-massa tersebut diasumsikan sebagai [M+H]<sup>+</sup>, maka harga  $m/z$  sebenarnya dari masing-masing puncak tersebut, berturut-turut adalah 731,2460 dan 715,2522 (Gambar 14).



Gambar 13. Hasil analisis TIC (Total Ion Current) dan retention time (RT) dari isolat.



Gambar 14. Spektrum fragmentasi ESI-MS dari isolat pada retention time (RT) 4,15-4,34.



Gambar 15. Fragmen Δ<sup>7,8</sup>-Dehidroeritromisin-A (m/z 731). Berselisih 2 dengan BM eritromisin-A; puncak tersebut kemungkinan besar berasal dari Δ<sup>7,8</sup>-dehidroeritromisin-A, yaitu eritromisin-A yang kehilangan 2 atom hidrogennya pada posisi C<sup>7,8</sup>.

Puncak spektrogram-massa dengan m/z 731,336 berselisih 2 dengan BM eritromisin-A; puncak tersebut kemungkinan besar berasal dari Δ<sup>7,8</sup>-dehidroeritromisin-A (Gambar 15), yaitu eritromisin-A yang kehilangan 2 atom hidrogennya pada posisi C<sup>7,8</sup>.

Gambar 16. Fragmen Δ<sup>6,7</sup>-Anhidroeritromisin-A (m/z 715). Berselisih 18 dengan BM eritromisin-A; puncak tersebut kemungkinan besar berasal dari Δ<sup>6,7</sup>-anhidroeritromisin-A, yaitu eritromisin-A yang kehilangan molekul air (H<sub>2</sub>O) pada posisi C<sup>6,7</sup>.

Sedangkan puncak spektrogram-massa dengan harga m/z 715,222 berselisih 18 dengan BM eritromisin-A; puncak tersebut kemungkinan besar berasal dari Δ<sup>6,7</sup>-anhidroeritromisin-A (Gambar 16), yaitu eritromisin-A yang kehilangan molekul air (H<sub>2</sub>O)



pada posisi C<sup>6,7</sup>. Dari Gambar 16 juga terlihat munculnya spektrogram-massa pada  $m/z$  717,2634. Bila harga spektrogram-massa ini diasumsikan sebagai  $[M+H]^+$ , maka harga sebenarnya adalah 716,2634. Spektrogram-massa ini berselisih 17 dengan BM eritromisin-A, puncak massa ini kemungkinan besar berasal dari  $\Delta^{6,7}$ -Anhidroeritromisin-A yang kehilangan gugus OH pada posisi C<sup>6,7</sup>.

## KESIMPULAN

Fermentasi *Sac. erythraea* ATCC 11635 dalam fermentor dengan perlakuan penambahan INH 0,2% menggunakan medium Hutchinson menghasilkan turunan baru eritromisin yaitu  $\Delta^{6,7}$ -Anhidroeritromisin-A yang berdasarkan analisis FT-IR nya ikatan C=C berada pada posisi  $\Delta^{6,7}$  yang mengadakan konjugasi dengan bentuk enol dari C<sub>8</sub> dan C<sub>9</sub>. Hal ini juga diperkuat dengan data kromatogram LC-MS yang memberikan dua puncak spektrogram-massa masing-masing pada  $m/z$  732,2460 dan 716,2522 *mu*. Puncak spektrogram-massa dengan harga  $m/z$  731,2460 berselisih 2 dengan BM eritromisin-A; kemungkinan besar berasal dari  $\Delta^{7,8}$ -Dehidroeritromisin-A. Sementara puncak spektrogram-massa dengan harga  $m/z$  715,2522 dan  $m/z$  716,2634 berturut-turut berselisih 18 dan 17 dengan BM eritromisin-A; kemungkinan besar berasal dari  $\Delta^{6,7}$ -Anhidroeritromisin-A.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. Umar Anggara Jenie, M. Sc., Apt., dan Prof. Dr. Retno S. Sudibyo, M. Sc., Apt., sebagai pembimbing yang banyak membantu selama melakukan penelitian ini. Tulisan ini adalah hasil penelitian penulis dalam menyelesaikan Thesis. Terima kasih juga pada semua pihak yang telah memberikan bantuannya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Seno, E.T. and Hutchinson, R., 1986, *The Biosynthesis of Tylosin and Erythromycin in Stephen W. Queener and L.E. Day (Ed): The Bacteria: A Treatise on Structure and Function*, Academic Press Inc., Orlando, 252-270.
2. Omura, S. and Sakakibara, 1984, *Chemical Modification and Structure Activity Relationship of Macrolide in Omura S. (Ed) : Macrolide Antibiotics : Chemistry, Biology and Practise*, Academic Press, Orlando, 127-194
3. Kirst, H.A. and Sides, G., 1989, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 9, 1413-1418.
4. Donadio, S., Steven, N.J., Mc. Alpine, J.B., Swanson, S.J., and Katz, L., 1991, *Modular Organization of Genes Required for Complex Polyketide Biosynthesis*, Research Articles, 3 May 1991, 675-679.
5. Donadio, S., Mc. Alpine, J.B., Seldon, P.J., Jackson, M., and Katz, L., 1993, *Pro. Natl. Acad. Sci.*, 90, 7119-7123.
6. Jenie, U.A., Sudibyo, R.S., and Arianingrum, R., 2003, *Teknosains*, 16, 1, Januari 2003, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
7. Rozwarski, D.A., Gregory, A. Grant, and James, C.S., 1998, *Science*, 279, 98-102.
8. Magliozzo, R.S. and Marcinkeviciene, 1997, *Am. Soc. Biotechnol. Mol. Biol.*, 272, 14, 8867-8879.
9. Lee, M.S. and Kerns, E.H., 1999, *Mass Spectrom. Rev.*, 18, 187-279.
10. Silverstein, R.M., and Webster, F.X., 1998, *Spectronic Identification of Organic Compound*, Six edition, John Willey & Sons Inc., 71-110.
11. Williams, D.H. and Fleming, I., 1997, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., Mc. Graw Hill, Cambridge. UK.