

FERMENTASI DAN KARAKTERISASI ANTIBIOTIK T1O81MY1O-B ASAL *Streptoverticillium olivoreticuly*

Tadjuddin Naid¹ dan Seniwati Dali²

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar

² Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar

ABSTRAK

Sejak penemuan Streptomisin oleh Waksman 1994, maka perkembangan penelitian yang mengarah pada penemuan antibiotika baru terus dikembangkan. Hingga saat ini antibiotika masih tetap merupakan obat produk mikroorganisme pilihan dan memegang peranan yang penting dalam pengobatan penyakit infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi antibiotika yang diperoleh dari proses fermentasi, memanfaatkan jasa *Streptoverticillium olivoreticuly* dengan cara pengocokan menggunakan "reciprocal shaker", T1O81MY1O-B diperoleh dengan mengisolasi kaldu fermentasi dengan sentrifugasi dan penyaringan untuk memisahkan miselia dari filtrat. kemudian bagian miselia diekstraksi menggunakan MeOH dan AcOEt. Pemurnian dilakukan dengan kromatografi kolom, dimana aktivitas komponen aktifnya selama proses fermentasi, ekstraksi dan pemurnian dideteksi menggunakan *Candida albicans* Yu1200 sebagai mikroorganisme uji. T1O81MY1O-B berupa bubuk warna putih, titik leleh 61 – 64° C. Larut dalam etil asetat, etanol, kloroform dan eter, tidak larut dalam air, heksan dan petroleum eter. Larutannya tidak stabil pada larutan alkali. Analisis spektrofotometer ultra violet menunjukkan serapan pada 213 nm (CH₃OH) dan 236 nm (NaOH). Sedang analisis spektrofotometer infra merah menunjukkan adanya gugusan hidroksi pada bilangan gelombang 3250 cm⁻¹, metil pada 2920 cm dan ikatan rangkap -C=CH- pada 1650 cm⁻¹. Aktivitas antimikroorganisme khas pada *Trichophyton asteriodes*, *filtenaria kikuchiana* dan *Helminthosporium oryzae*.

Kata kunci : fermentasi, karakterisasi, T1O81MY1O-B, *Streptoverticillium olivoreticuly*

PENDAHULUAN

Negara-negara maju seperti Amerika Serikat dan Jepang memberikan prioritas utama untuk menemukan antibiotika baru dengan memanfaatkan sumber daya alam seoptimal mungkin, menggunakan rekayasa genetika dari mikroorganisme. Salah satu metode skrining komponen bioaktif hasil produksi mikroorganisme telah dilakukan untuk mengamati aktivitas antagonis antara antibiotika polien yang bersifat antifungi, antikoolesterol dan antikhamir (1). Kertas strip dicelupkan ke dalam kaldu fermentasi dan kertas strip lainnya yang mengandung amfoterisin-B dan kolesterol diletakkan melintang satu sama lain pada medium agar yang diinokulasikan selama 17 jam pada suhu kamar. Amfotericin-B yang digunakan hanya efektif terhadap infeksi yang serius dari fungi dan khamir, Namun beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh jenis *Candida albicans* seperti endocarbitis, meningitis dan endophthalmitis tetap sulit untuk diobati. Ini berarti penelitian mengenai antibiotika ini tetap menjadi primadona untuk mengobati penyakit yang disebabkan oleh *Candida*. Kaldu fermentasi dari strain T1O81MY1O memperlihatkan potensi terhadap amfotericin-B pada skrining di atas dan berbeda dengan penemuan lainnya seperti neoenactin dan cabazomycine (2,3,4). Oleh karena itu komponen bioaktif yang dihasilkan ditetapkan sebagai antibiotika dengan kode T1O81MY1O-B.

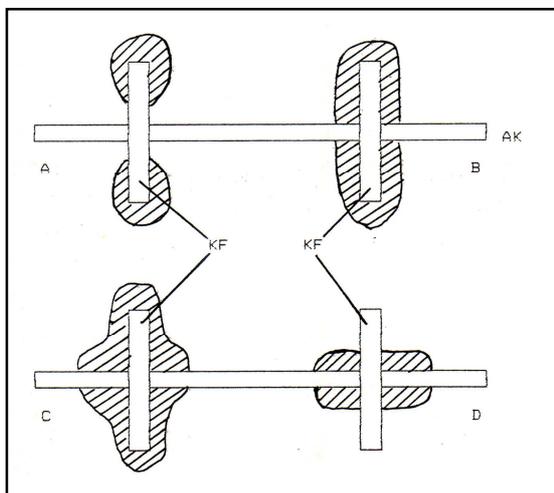
FERMENTASI

Strain T1O81MY1O diinokulasi di dalam medium yang mengandung pati larut dan ekstrak ragi 0,2% dikocok pada "reciprocal shaker" selama 18 jam pada suhu kamar dan pH 7,2. Inokulum lalu dikulturkan pada medium produksi yang mengandung pati larut 1,5%, glukosa 1%, soybean meal 2%, Ebios 0,5%, NaCl 0,25%, CaCO₃ 0,3%, MnCl₂·4H₂O 0,0008%, CuSO₄·5H₂O 0,0007%, ZnSO₄·7H₂O 0,0002% dan FeSO₄·5H₂O 0,0001% pada pH 7,6 sebelum sterilisasi. Proses fermentasi lalu dilakukan pada "reciprocal shaker" selama 60 jam pada suhu 27°C, dan akan diperoleh produk berupa kaldu fermentasi. Aktivitas antibiotika selama fermentasi ditentukan pada medium agar dengan *Candida albicans* Yu 1200 sebagai mikroorganisme uji.

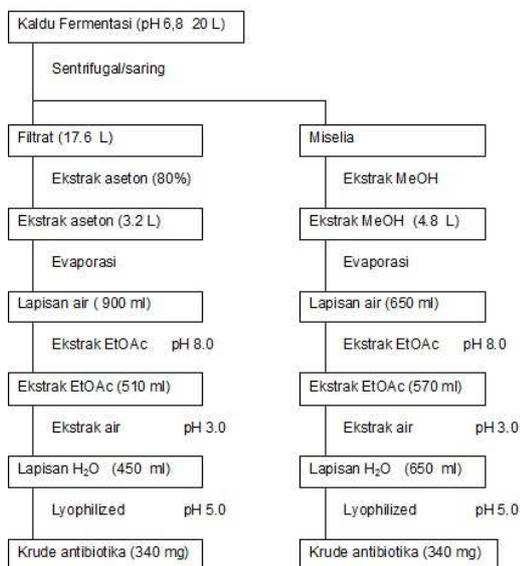
ISOLASI DAN PEMURNIAN

Kaldu fermentasi dipisahkan dengan sentrifugasi dan penyaringan untuk memisahkan bagian filtrat dari miselia. Antibiotika yang terdapat pada bagian miselia diekstraksi dengan metanol. Sedang dari bagian filtrat lebih dahulu ditarik ke dalam karbon aktif selama satu jam, kemudian diekstraksi dengan aseton pada pH 2. Ekstrak metanol dan aseton lalu dikisatkan pada evaporator. Hasilnya diekstraksi lagi dengan etil asetat pada pH 8,0,

dilanjutkan dengan air pada pH 3,0. Ekstrak air diatur pada pH 5,0, lalu dikeringkan dengan "freeze dryer". Skema pengerjaan ini dapat dilihat pada gambar 2.



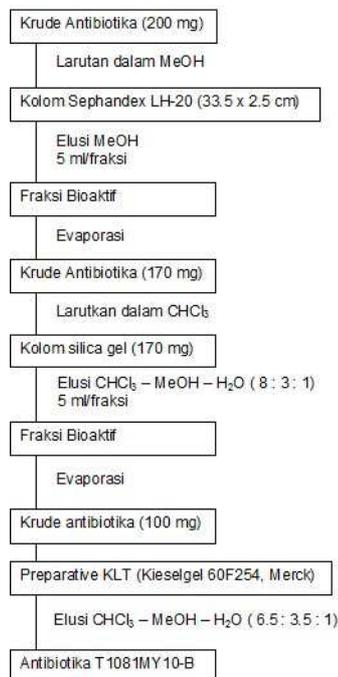
Gambar 1. Metode Skrining Komponen Antikolesterol. Mikroorganisme uji : *Candida albicans* Yu 1200. Daerah hambatan (antimikroba) : A: Antibiotika polien, E: Antibiotika nonpolien, C: Antibiotika yang poten terhadap polien, D: Antagonis terhadap kolesterol, AK: Kertas strip dari amfoterisin-B-Kolestrol, KF: Kertas strip dari kaldu fermentasi (sampel)



Gambar 2. Skema kerja ekstraksi krude antibiotika dari fermentasi

Krude antibiotika dilarutkan dalam sejumlah tertentu metanol, kemudian dimurnikan pada kromatografi kolom Sephadex LH-20 (33,5 x 2,3 cm) dengan pengembang dan pengelusi metanol. Fraksi-fraksi aktif dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan. Kemudian komponen bioaktif ini dimurni-

kan lagi dengan kromatografi lapis tipis silika gel dengan larutan pengelusi campuran dari $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (6,5:3,5:1), dan akan diperoleh komponen bioaktif senyawa murni T1081MY10-B. Hal ini dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Skema kerja pemurnian antibiotika T1081MY10-B

Di lain pihak pemurnian dapat pula dilakukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) dengan Radial Pack μ Bondapak Phenyl (100 x 8 mm) dengan larutan pengelusi $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_3\text{PO}_4$ (57:43).

Bioaktivitas antibiotik selama isolasi dan pemurnian ditentukan pada medium agar dengan *Candida albicans* Yu 1200 sebagai mikroorganisme uji, yang diinkubasikan selama 13 – 20 jam pada suhu kamar.

SIFAT FISIKA DAN KIMIA

Antibiotik T1081MY10-B berupa serbuk warna putih, titik leleh 61-64°C, $\text{Ca}^{20}_D -12,5$ (CH_3OH). Mudah larut dalam etil asetat, etanol, kloroform dan eter, tidak larut dalam air dan petroleum eter. Di samping itu T1081MY10-B memberikan reaksi yang positif terhadap iodum, ninhidrin fluorescamin. Dalam suasana alkali tidak stabil dan aktivitasnya hilang sampai sebesar 91% bila dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit pada pH 9,0. Namun aktivitas dapat dipertahankan sebesar 75 – 86 % bila berada dalam suasana dengan pH 2,0 – 6,0 dengan kondisi yang sama di atas.

Analisis spektrofotometri UV memberikan spektrum pada panjang gelombang 213 nm (dalam CH_3OH) dan 236 nm (dalam NaOH). Sedangkan analisis spektrofotometri inframerah dengan pelarut CHCl_3 menunjukkan adanya gugus hidroksil pada

bilangan gelombang 3250 cm^{-1} , metil pada bilangan gelombang 2910 cm^{-1} dan ikatan rangkap -C=CH- pada bilangan 1650 cm^{-1} .

Nilai Rf dari T1O81MY1O-B ditentukan dengan kromatografi lapis tipis dengan beberapa larutan pengelusi, kemudian dideteksi dengan cara bioautografi (5).

SIFAT BIOLOGIS

Sifat biologis dari T1O81MY1O-B ditentukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pada penentuan *in vitro* spektrum antimikroorganisme ditentukan pada medium agar yang mengandung ekstrak daging 0,5%, pepton 1%, glukosa 1%, NaCl 0,25% dan agar 1,5%, disesuaikan ada pH 7,0 sebelum sterilisasi. Daya hambat terkecil ditentukan setelah inkubasi 44 jam untuk khamir dan 66 jam untuk fungi pada suhu $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Secara *in vivo*, antibiotika T1O81MY1O-B disuntikkan pada tikus percobaan

sebanyak 50 mg/kg berat badan, dan hasilnya tidak memberikan efek toksik.

Tabel 1. Spektrum Antimikroorganisme senyawa T1O81MY1O-B

Uji mikroorganisme	MIC (mcg/ml) [*]
<i>Candida tropicalis</i>	25
<i>Candida pseudotropicalis</i>	12,5
<i>Candida albicans</i> Yu 1200	50
<i>Seccharomyces cerevisiae</i>	25
<i>Cryptococcus neoformens</i>	-
<i>Alternaria kikuchiana</i>	12,5
<i>Glomerella cingulata</i>	100
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100
<i>Trichophyton asteroides</i> 429	12,5
<i>Aspergillus niger</i> F-16	100
<i>Pyricularia oryzae</i>	25
<i>Herminthosporium oryzae</i>	12,5

* Daya hambat terkecil dilakukan pada medium glucose nutrient agar pada temperatur 27°C .

DAFTAR PUSTAKA

1. Fukuda, H., Kawakami, Y., & Nakamura, S., 1973, A Method to Screen anticholesterol substances produced by microbes and a new cholesterol oxydase produced by *Streptomyces violascens*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Japan, xxi, 2057-2060.
2. Sakano, K., Ishimeru, K. & Nakamura, S. 1980, New antibiotics, carbazomycins A and B., Fermentation, extraction and physicochemical and biological properties. *Journal of Antibiotics* 33 : 683.
3. Naid, T., Kaneda, M. & Nakamura, S., 1987, Carbazomycins C, D, E and F, minor components of the carbazomycins complex. *Journal of Antibiotics* 40:157-164.
4. Shirling, E.B., & Gottlieb, D., 1966, Method for Characterization of *Streptomyces* species. *International Journal Syst. Bacct.* 16 : 313 - 340.
5. Porter, J.N., 1976, *Cultural Condition For Antibiotic Producing Microorganism*. Academic Press, New York, 60 -78.
6. Kanede, M., Naid, T., Kitahara, T. & Nakamura, S., 1988, Carbazomycins G and H, novel Carabazomycins congeners containing a quinol moiety. *Journal of Antibiotics* 41 : 603.