



MAJALAH FARMASI AIRLANGGA

(Airlangga Journal of Pharmacy)

ISSN 0852-1050

VOLUME 5 No. 1, APRIL 2005



PENERBIT
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA

DAFTAR ISI

Korelasi Kadar Propilenglikol Dalam Basis Dan Pelepasan Dietilammonium Diklofenak Dari Basis Gel Carbopol ETD 2020 Dewi Melani H, Tutiek Purwanti, Widji Soeratri	1
Daya Adsorpsi Zeolit terhadap Mikroba Penyebab Diare (1): Daya Adsorpsi Zeolit Alam Malang Selatan dan Atapulgit terhadap <i>Vibrio cholerae</i> Galur WHO (Upaya pemanfaatan zeolit sebagai bahan baku obat diare) Tristiana Erawati, Noorma Rosita, Moegihardjo, Budi Sulistyowati	7
✓Aktivitas Antifungi Krim Minyak Atsiri Lengkuas [<i>Alpinia galanga</i> (L.) Swartz] Terhadap <i>Candida albicans</i> Widji Soeratri, Riana Dwie Yuliani, Noor Ifansyah, Isnaeni	11
Bioautografi Antibiotika Hasil Fermentasi Mutan <i>Streptomyces griseus</i> ATCC 10137 Isnaeni	16
Pengaruh Senyawa Prebiotik Dari Bawang Merah (<i>Allium cepa</i>) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Probiotik. Idha Kusumawati, Noor Cholies Zaini	20
Efek Antimalaria Ekstrak Sambiloto Terstandar (Parameter Kadar Aandrografolida) Pada Mencit Terinfeksi <i>Plasmodium Berghei</i> . Dwi Kusumawardhani, Aty Widyawaruyanti*, Idha Kusumawati	25
Uji Toksisitas Subkronik Mineral Zeolit Alam Malang-2(M-2) yang Diaktivasi Secara Fisik pada Mencit Jantan. Herra Studiawan, Tutiek Purwanti, Tan Yulianik	30
RALAT Indek Judul Volume 4 No.1, 2, 3 Tahun 2004	33

Gambar sampul:

Allium cepa dan senyawa-senyawa kandungannya.

Bioautografi Antibiotika Hasil Fermentasi Mutan *Streptomyces griseus* ATCC 10137

Isnaeni

Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Unair

Bioautography of a novel antibiotic produced by fermentation process of Streptomyces griseus ATCC 10137 had been investigated by using streptomycin standard. High Performance Thin Layer Chromatography had been carried out by using KH₂PO₄ 5% solution as a solvent, and Bacillus subtilis PCI 219 as a bacterial test. Bioautogram showed that Rf value of spot derived from the antibiotic extract isolated from the fermentation filtrate is 0.65, which has significant different with Rf value of streptomycin standard 0.15. It was found that the antibiotic and streptomycin standard inhibited growth of Bacillus subtilis PCI 219.

Keywords: *Streptomyces griseus*, bioautography, streptomycin

PENDAHULUAN

Actinomycetes aerobik memiliki arti penting di kalangan para ahli bakteriologi, bioteknologi, genetika dan ekologi (Pirouz, 2005), karena kemampuannya menghasilkan molekul bioaktif. Salah satu genus Actinomycetes yang terkenal karena potensinya memproduksi senyawa aktif adalah genus *Streptomyces*. Sebagai contoh molekul bioaktif yang sangat penting dalam menunjang dunia medis atau dunia pertanian (Lividans, <http://www.turkuamk.fi/varsta/lividans.htm>), ialah golongan antibiotika tetrasiklin yang dihasilkan oleh *S. aureofaciens* dan pravastatin penurun kolesterol yang dihasilkan oleh *S. carbophilus*.

Streptomyces griseus ATCC 10137 secara alami dapat memproduksi antibiotika golongan aminoglikosida (AAG) berinti streptidin streptomisin (Vakulenko, 2003) yang memiliki daya hambat terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Berdasarkan konsep mutasi, mikroba dapat mengalami mutasi karena pengaruh bermacam-macam mutagen, antara lain senyawa kimia dan pengaruh fisika, misalnya radiasi sinar Ultra Violet (<http://trishul.sci.gu.edu.au/courses/ss12bmi/mutation.html>, 2005). Mutasi dapat pula terjadi secara alami, karena penyimpanan mikroba yang terlalu lama (Isnaeni, 1998). Manifestasi akibat mutasi bermacam-macam, dapat terjadi perubahan secara morfologis maupun fisiologis. Beberapa mutasinton telah dicoba ditambahkan ke dalam media fermentasi *Streptomyces sp.* untuk mutasi biosintesis antibiotika (Claridge, 1979).

Berdasarkan rekomendasi dari Osaka University, *Streptomyces griseus* ATCC 10137 yang digunakan dalam penelitian ini telah mengalami mutasi alami setelah disimpan selama 20 tahun. Perubahan morfologis akibat mutasi tidak ada, tetapi warna koloni yang semula putih (Buchanan, 1991) berubah menjadi putih kekuningan. Gambaran sel secara mikroskopik elektron menunjukkan bahwa antara *wild type* dan mutannya tidak ada perbedaan. Secara fisiologis ada perbedaan dalam kemampuan metabolisme karbohidrat (Busheel, 1988; Isnaeni, 1998). Dalam penelitian ini akan dilakukan fermentasi mutan *S. griseus* ATCC 10137 dan mengamati kemampuan mutan dalam menghasilkan antibiotika. Isolasi dan identifikasi serta uji daya anti bakteri antibiotika hasil fermentasi dilakukan dengan menggunakan streptomisin sebagai

pembanding. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi apakah mutan *S. griseus* ATCC 10137 mampu menghasilkan antibiotika sama dengan *wild type S. griseus* ATCC 10137.

Pemilihan metode bioautografi didasarkan atas pertimbangan bahwa dari bioautogram yang diperoleh dapat diketahui jumlah komponen atau senyawa yang ada dalam filtrat hasil fermentasi (setelah isolasi dengan kromatografi kolom) dan daya antibakteri masing-masing komponen terhadap bakteri uji (Betina, 1983). Berdasarkan harga Rf masing-masing noda pada bioautogram dapat disimpulkan, apakah antibiotika yang dihasilkan oleh mutan *S. griseus* ATCC 10137 sama atau berbeda dengan standar streptomisin.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian. Media *Nutrient Agar*, Media *Potato Dextrose Agar* (PDA), Media *International Streptomyces Project* (ISP-4), media Sg2 (media pertumbuhan) dan SgP1 (media produksi antibiotika). Larutan KH₂PO₄ 5% dan Silica Gel GF₂₅₄ masing-masing digunakan sebagai eluen dan pelat pada KLTKT. Sebagai mikroba penghasil antibiotika digunakan mutan *Streptomyces griseus* ATCC 10137 dan sebagai bakteri uji digunakan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi / Teknologi Fermentasi Jurusan Teknik Kimia Fakultas Industri ITB, sedang mikroba uji *Bacillus subtilis* PCI 219 yang diperoleh dari National Institute of Health of Japan.

Produksi biomassa *S. griseus* ATCC 10137. Kultur pada media persediaan PDA berumur empat hari dipindahkan ke dalam 10 mL media pertumbuhan ISP-4 cair, dikocok 180 putaran per menit (PPM) selama 24 jam pada suhu 28 °C. Sebanyak 5 mL suspensi dipindahkan ke dalam 50mL media pertumbuhan ISP-4 cair, dikocok 180 PPM pada suhu 28 °C dan pH awal 7,3. Pengambilan sampel untuk membuat kurva pertumbuhan dilakukan setiap tiga jam, disentrifugasi, supernatan dibuang, sel dicuci dengan air suling, dikeringkan pada suhu 105 °C sampai diperoleh berat konstan. Kecepatan pertumbuhan dinyatakan sebagai berat kering sel per satuan waktu (hari).

Produksi AAG dari mutan *S. griseus* ATCC 10137. Kultur pada media persediaan PDA berumur empat hari dipindahkan ke dalam 25 mL media

pertumbuhan cair, dikocok 180 PPM selama 24 jam pada suhu 28 °C. Sebanyak 20 mL suspensi dipindahkan ke dalam 200mL media pertumbuhan Sg2, diinkubasi pada rotary shaker dengan kecepatan pengocokan 180 PPM pada suhu 28°C sampai awal fasa stasioner, disentrifugasi 6000 PPM selama 10 menit, supernatan dibuang, sel dicuci dua kali masing-masing dengan 2,5 mL NaCl 0,9%, disentrifugasi 6000 PPM selama 10 menit. Supernatan dibuang, sel dimasukkan dalam media SgP1 sebanyak 10% (b/v), diinkubasi pada rotary shaker dengan kecepatan pengocokan 180 PPM pada suhu 28°C selama empat hari.

Pemisahan dan karakterisasi antibiotika *S. griseus* Pemisahan antibiotika dari kaldu fermentasi dilakukan dengan penyerapan menggunakan arang aktif, diikuti dengan kromatografi kolom penukar kation Amberlite CG-50 (NH₄⁺) menurut Isnaeni (1998), merupakan modifikasi metode isolasi yang telah dilakukan oleh Okachi and Nara (1977).

Penapisan AAG mutan *S. griseus* ATCC 10137. Penapisan AAG ditujukan untuk mengetahui adanya inti streptidin dan 2-DOS dalam antibiotika mutan *S. griseus* ATCC 10137. Eluat kromatografi kolom filtrat hasil fermentasi ditotolkan pada kertas kromatografi, dikeringkan dan disemprot dengan pereaksi warna Sakaguchi dan Na-nitroprusid untuk identifikasi gugus guanidin dalam inti streptidin. Warna ungu kemerahan akan tampak setelah kertas dikeringkan. Sebagai penampak noda untuk 2-DOS digunakan ninhidrin. Warna biru keunguan akan tampak setelah kertas dipanaskan pada suhu 110 °C selama 10 menit (Isnaeni, 1998).

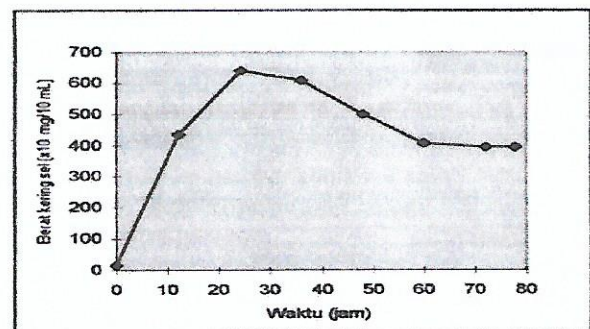
Bioautografi antibiotika mutan *S. griseus* ATCC 10137. Fraksi aktif hasil kromatografi kolom dikumpulkan, dipisahkan dengan liofilisasi menggunakan freeze dryer. Sebanyak 6 µL konsentrat ditotolkan pada lempeng KLTKT, dielus dengan larutan KH₂PO₄ 5% (Claes, 1982). Bioautogram dibuat dengan cara meletakkan hasil KLTKT (yang telah dikeringkan dengan aliran udara untuk menghilangkan sisa eluen) di atas permukaan media agar perbenihan dalam cawan petri yang berisi media Nutrient Agar mengandung bakteri uji *B. subtilis* PCI-219 (0,5 µL/15mL media), kemudian disimpan di dalam lemari es selama dua jam agar proses difusi senyawa dalam noda kromatogram ke dalam media sempurna. Cawan Petri dikeluarkan dari lemari es, lempeng KLTKT diangkat dari permukaan agar, biakan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Zona yang terbentuk pada posisi noda diamati dan diukur diameternya. (Isnaeni, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil pengamatan kecepatan pertumbuhan dan kurva pertumbuhan mutan *S. griseus* ATCC 10137 dalam media Sg2 masing-masing tersaji pada Tabel 1 dan Gambar 2. Produksi biomassa mencapai puncak pada jam ke-24 dengan jumlah sel 6,40 g/10mL, sehingga untuk pemindahan biomassa ke dalam media fermentasi atau produksi antibiotika dilakukan 24 jam setelah inokulum awal dikocok dalam media pertumbuhan. Bentuk kurva mengikuti bentuk kurva pertumbuhan secara umum; yaitu *bell shape*, seperti kurva pertumbuhan *S. fradiae* dan *S. kanamyceticus* K.J-1 yang dilaporkan oleh Hotta dan Ishikawa (1988).

Tabel 1. Hasil pengamatan berat sel kering mutan *S. griseus* ATCC 10137 per satuan waktu dalam media pertumbuhan Sg2

Waktu (jam)	Berat kering miselia (x 10 mg/10mL)
0	15,3
12	433
24	640
36	607
48	500
60	407
72	395
78	393

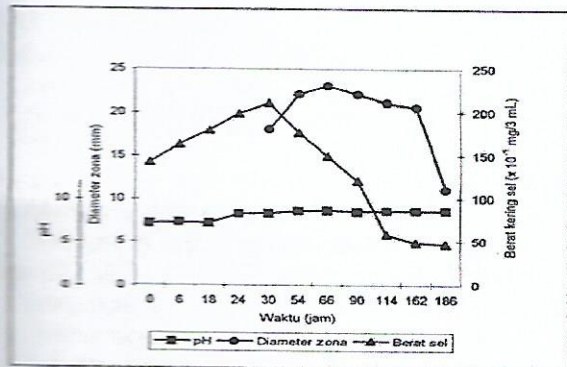


Gambar 1. Kurva pertumbuhan mutan *S. griseus* ATCC 10137 dalam media Sg2 pada suhu 28°C, kecepatan pengocokan 180 PPM

Tabel 2. Hasil pengamatan berat sel kering, pH fermentasi dan potensi antibiotika mutan *S. griseus* ATCC 10137 dalam media fermentasi SgP1 pada suhu 28°C

Waktu (jam)	pH	Diameter zona hambatan (mm)	Berat kering miselia (x10mg/3mL)
0	7,17	-	143
6	7,24	-	163
18	7,81	-	179
24	8,21	-	198
30	8,28	18,00	210
54	8,56	22,00	176
66	8,28	23,00	149
90	8,45	22,00	121
114	8,54	21,00	58
162	8,51	20,50	47
186	8,51	11,50	49

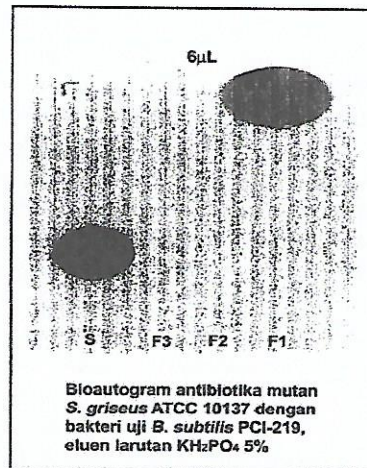
Alur waktu fermentasi dalam media SgP1 tersaji pada Gambar 3 berdasarkan data dalam Tabel 2. Kurva Gambar 3 disajikan untuk menunjukkan profil hubungan antara produksi biomassa dengan produksi antibiotika, ternyata mengikuti pola *non-associated*. Potensi antibiotika (dinyatakan sebagai diameter zona hambat) mencapai puncak pada jam ke-66, pada saat jumlah sel mulai menurun karena lisis dan pH optimal untuk fermentasi pada saat itu adalah 8,28. Fermentasi dihentikan pada jam ke-66, untuk selanjutnya dilakukan isolasi dan identifikasi antibiotika. Menurut Szabo *et al.* (1985), pembentukan AAG dalam streptomyces terjadi antara fasa sporulasi dan germinasi, untuk melindungi hifa yang masih muda dari pengaruh lingkungannya.



Gambar 3. Alur waktu fermentasi *S. griseus* ATCC 10137 dalam media SgP1

Secara umum antibiotika aminoglikosida dapat didefinisikan sebagai antibiotika turunan oligosakarida atau pseudosakarida, minimal tersusun dari satu molekul aminosiklitol atau aminosikloheksanol yang terikat secara glikosidik dengan satu molekul aminosakarida lain (Rinehart and Strosahne, 1976). Berdasarkan struktur intinya, AAG yang banyak dimanfaatkan di dunia medis adalah AAG berinti 2-deoksistreptamin (2-DOS) dan streptidin (streptomisin beserta turunannya). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan penapisan untuk mengetahui apakah mutan *S. griseus* ATCC 10137 menghasilkan AAG berinti streptidin atau 2-DOS. Apabila akibat mutasi dapat menginduksi *S. griseus* ATCC 10137 menghasilkan AAG berinti 2-DOS, akan merupakan temuan yang sangat berharga, karena perkembangan turunan streptidin selama ini jauh lebih lambat dibandingkan turunan 2-DOS, terkait dengan rigiditas struktur molekul dan efek sampingnya. Hasil penapisan menunjukkan bahwa fraksi aktif hasil kromatografi kolom menunjukkan daya hambat terhadap *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Fraksi aktif juga memberikan reaksi positif terhadap Na-nitroprusid, suatu reaksi identifikasi untuk menunjukkan adanya inti guanidin (Claes, 1983). Untuk memastikan apakah inti guanidin tersebut merupakan bagian molekul streptomisin atau molekul senyawa lain, maka dilanjutkan identifikasi dengan KLTKT.

Salah satu keuntungan metoda bioautografi adalah selain untuk pemisahan dan identifikasi, juga dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas biologis secara langsung dari matriks yang kompleks, terutama terkait dengan kemampuan suatu senyawa menghambat pertumbuhan mikroba (Rahalison, 1994). Bioautografi secara langsung pada KLT ekstrak tanaman untuk uji antifungi telah dilakukan (Rahalison, 1994), menggunakan beberapa jamur patogen sebagai mikroba uji. Dari kromatogram KLTKT dapat diketahui jumlah komponen dalam sampel yang ditotolkan berdasarkan jumlah noda (dengan penampak noda yang sesuai), sedang data bioautogram memberikan informasi jumlah komponen sampel yang memiliki aktivitas terhadap mikroba uji baik secara kualitatif maupun kuantitatif.



Gambar 4. Bioautogram filtrat hasil fermentasi antibiotika mutan *Streptomyces griseus* ATCC 10137, pada pelat KLTK dengan eluen larutan KH_2PO_4 5% dan bakteri uji *B. subtilis* PCI-219 S dan F masing-masing adalah standar streptomisin dan fraksi hasil kromatografi kolom

Bioautogram KLTKT fraksi aktif hasil kromatografi kolom filtrat hasil fermentasi antibiotika mutan *S. griseus* ATCC 10137 pada Gambar 4 menunjukkan dua noda dengan harga Rf yang jauh berbeda. Streptomisin standar (S) menghasilkan Rf 0.15, sedangkan antibiotika dalam filtrat hasil fermentasi (F1) memberikan harga Rf 0.65. Kedua noda memberikan daya hambat terhadap bakteri uji, sedang fraksi F2 dan F3 tidak menunjukkan aktivitas. Untuk meyakinkan bahwa noda F1 hanya terdiri dari satu komponen dan untuk menentukan struktur senyawa tersebut, perlu dilakukan identifikasi lanjut dengan menggunakan instrumen lain, misalnya HPLC (Claes *et al.*, 1974; Whall, 1981) dan GC-MS (Isnaeni, 1998). Hasil identifikasi lanjut akan memberikan informasi, apakah antibiotika yang dihasilkan oleh mutan *Streptomyces griseus* ATCC 10137 termasuk antibiotika baru. Penelitian ini hanya melakukan identifikasi secara kualitatif, untuk membandingkan potensi antibiotika hasil fermentasi dengan streptomisin perlu dicari terlebih dahulu Konsentrasi Hambat Minimum (*Minimum Inhibition Concentration*). Selanjutnya dibuat suatu seri konsentrasi baku streptomisin yang mewakili konsentrasi rendah, menengah dan tinggi untuk menentukan rasio potensi antibiotika analit.

Ucapan terima kasih. Penulis mengucapkan terima kasih yang tulus kepada Prof. Oei Ban Liang PhD. dan Prof. Ir. Ibrahim Sastramihardja yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama Peneliti melakukan penelitian. Ucapan terima kasih juga peneliti tujukan kepada Drs. Ahaditomo, Apt., seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi/Teknologi Fermentasi Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Industri ITB, Osaka University, Dr. Kunimoto Hotta, National Institute of Health of Japan, Tokyo dan seluruh staf Pusat Antar Universitas ITB yang telah memberikan bantuan, menyediakan sarana, prasarana dan fasilitas selama Penulis melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Betina, V., (1983) *The chemistry and biology of antibiotics, Pharmacology Library*, 5, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, pp.121, 221-227
- Buchanan, Z.e. and Gibbons, N.E. (1991) *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 8th ed., Williams Wilkins Company/Baltimore, pp. 747-840
- Bushell, M.E., (1988) Growth, product formation and fermentation technology, dalam Goodfellow (Ed), *Actinomyces in Biotechnology*, Academic Press., San Diego-New York-Boston, pp. 208-209
- Claes, P.J.; Comperonelle, F. and Vanderhaege, H. (1974) Chromatographic analysis of neomycin. Isolation and identification of minor components, *J. Antibiot.*, 27, pp. 931-942
- Claes, P.J. and Vanderhaege, H. (1982) Thin-layer chromatographic identification of aminoglycoside antibiotics, *J. Chromatogr.*, 248, pp. 483-487
- Claridge, C.A. (1979) Aminoglycoside antibiotics, dalam Rose (Ed), *Secondary products of metabolism, economic microbiology*, Academic Press, London-New York-San Francisco, pp. 3, 151-232
- Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E. and Hostettmann, K. (1994) Antifungal tests in Phytochemical investigations: Comparison of bioautographic methods using phytogenic and human pathogenic fungi, *Planta Med.* 60, pp. 41-43 <http://trishul.sci.gu.edu.au/courses/ss12bmi/mutation.html>, 2005
- <http://www.turkuamk.fi/varsta/lividans.htm>, 2005
- Isnaeni, 1998 *Mutatisntesis antibiotika mutan Streptomyces griseus* ATCC 10137, Disertasi, ITB, Bandung, pp. 43-46
- Okachi, R and Nara (1977) The aminoglycoside: Properties, biosynthesis and fermentation, dalam Vandame (Ed), *Biotechnology of Industrial antibiotics, Drug and the Pharmaceutical Science*, 22, pp. 329-356
- Pirouz, T., Karbasian, M.A. and Goodfellow, M., 1999 Isolation of some aerobic *Actinomyces* species from the soil of Zahedan Country, south-east of Iran, *J. Med Sci.*, No.24 (1&2), pp. 65-67
- Szabo, I; Benedek, A. and Barabas, G. (1985) Possible role of streptomycin release from spore cell wall of *Streptomyces griseus*, *J. Appl. Bacteriol.*, 50, pp.438-440
- Whall, T.J. (1981) Determination of streptomycin sulphate and dihidrostreptomycycin by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 219, pp. 89-100