

PENGARUH PENAMBAHAN PROPINAT DAN VALIN TERHADAP PRODUKSI ERITROMISIN

(The Influence of Addition of Propionate and Valine to
the Erythromycine Production)

Surya Dharma

ABSTRACT

The influence of addition of propionate and valine to the erythromycine production produced by Saccharopolyspora erythrea ATTC 11635 was studied. The erythromycine fermentation was carried out by using shaker method where a solution containing glucose, sucrose, tryptone and yeast extract was used as inoculation medium.

It was found that the addition of propionate or valine increased the rate of cell growth of Saccharopolyspora erythrea ATTC 11635, in this case the propionate worked better. Addition of valine increased erythromycine production but not to propionate.

PENDAHULUAN

Antibiotika merupakan satu kelompok obat yang cukup besar kebutuhannya. hal ini disebabkan masih tingginya prevalensi penyakit infeksi di Indonesia. Besarnya kebutuhan antibiotika masih belum didukung oleh kemampuan produksi di dalam negeri. Sejauh ini kebutuhan antibiotika masih diimpor dan bisnis fermentasi masih belum dimulai di Indonesia.

Eritromisin adalah suatu antibiotika golongan makrolida yang struktur kimianya terdiri dari sebuah cincin laktone bersegi 14 yang disebut eritronolid dan dua buah gula. Gula tersebut adalah gula amino, yaitu D-desosamin, dan sebuah gula deoksinetral yaitu l-kladinosa atau l-mikarosa, tergantung pada jenis eritromisinnya. Antibiotika eritromisin dihasilkan oleh beberapa genera actinomycetes, yaitu *saccharopolyspora erythrea* (dulu disebut *Streptomyces erythreus*, Kuo et al (1989), *Streptomyces griseoplavus* Artrobacter NRRL 83381 (Seno dan Hitchkinson, 1986). Namun yang merupakan penghasil utama adalah *Saccharopolyspora erythrea* NRRL 2338. Mekanisme utama antibakteri eritromisin ini adalah pengikatan ribosom

bakteri yang kekuatannya tergantung pada struktur antibiotika dan RNA ribosom. Gugus fungsional pada eritromisin seperti 11- dan 12- hidroksil dan 9-keto pada cincin lakton, 2-hidroksil dan 3- dimetilamino pada desosamin, dan 3- metoksi pada kladinosa akan berikatan dengan ribosomal bakteri subunit 50 S, sehingga mengganggu translokasi ribosom peptidil t-RNA yang berfungsi dalam sintesis protein pada bakteri tersebut (Seno dan Hitchkinson, 1986). p167

Secara garis besar, eritromisin dibentuk oleh kombinasi dua lintasan biosintesis. Lintasan pertama mengarah kepada pembentukan eritronolida yaitu aglikon dari eritromisin, sedangkan lintasan kedua mengarah kepada pembentukan gula deoksi yang nantinya mendukung biosintesis eritromisin (Corcoran, 1981; Manitto, 1981; Donadio *et al.*, 1991 dan Omura dan Tanaka, 1984).

Propionat seperti asam-asam lemak lainnya mula-mula diaktifkan dengan ATP dan KoA oleh tiokinase. Propil KoA hasil dari reaksi ini, mengalami reaksi fiksasi dengan CO₂, membentuk D-metilmalonil KoA. Reaksi ini dikatalisis oleh propionil KoA karboksilase dan memerlukan biotin sebagai koenzim. Oleh enzim metilmalonil KoA rasemase, D-metilmalonil KoA akan diubah menjadi l-metilmalonil KoA yang selanjutnya akan berisomerisasi menjadi suksinil KoA oleh enzim metilmalonil KoA isomerase, yang memerlukan vitamin B₁₂ sebagai koenzim (Harper, 1979).

Valin yang merupakan salah satu asam amino esensial akan mengalami metabolisme. Seperti halnya dengan metabolisme propionat, dapat dilihat bahwa suksinil KoA dan metilmalonil KoA juga dihasilkan dari metabolisme valin. Metilmalonil KoA dapat mengalami dekarboksilasi menjadi propionil KoA.

Sehubungan dengan hal tersebut, telah dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan kedua senyawa ini yaitu propionat dan Valin terhadap produksi eritromisin dengan menggunakan metoda "Shaker" dengan asumsi bahwa kedua senyawa ini merupakan prekursor pembentukan eritromisin. Dari penambahan kedua senyawa ini diharapkan akan memacu produksi eritromisin dengan hasil lebih banyak.

BAHAN DAN METODA

Saccharopolyspora erythraea difermentasikan dengan 3 macam perlakuan masing-masing diperlakukan duplo yaitu fermentasi *Saccharopolyspora erythraea* dengan memakai prekursor valin (V) fermentasi *Saccharopolyspora erythraea* dengan prekursor propionate (P) dan fermentasi *Saccharopolyspora erythraea* blanko (B)

Sebagai media dasar dari inokulasi untuk produksi antibiotika digunakan campuran larutan yang terdiri dari glukosa 0,5%, sukrosa 1%, tripton 0,5%, ekstrak ragi 0,25% dan air suling sampai 100 ml. Media ini dibuat 400 ml dengan menimbang glukosa 2 gram, sukrosa 4 gram, tripton 2 gram dan ekstrak ragi 1 gram. Larutan ini dibagi atas 8 bagian, masing-masing adalah 50 ml dalam erlemeyer 250 ml yakni 2 erlemeyer untuk media produksi, masing-masing ditambahkan valin 250 mg (0,5%), 2 erlemeyer, 2 erlemeyer untuk media produksi masing-masing ditambahkan natrium propionat 250 mg (0,5%), dan erlemeyer untuk media produksi blanko(B) diseterilkan dalam autoklaf selama 30 menit pada temperatur 121° C. Kedalam masing-masing erlemeyer ditambahkan 0,5 ml inokulum secara aseptis.

Untuk pengujian berat sel kering (BSK) dilakukan cara sebagai berikut : Setiap kali melakukan sampling, sampel diambil sebanyak 2 ml dengan menggunakan tabung appengorf steril yang beratnya sudah diketahui. Sampel dipusingkan selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm kemudian filtrat dipisahkan secara aseptis ke dalam tabung appendorf lain yang steril, disimpan dalam lemari es (untuk pengujian potensi antibiotikanya). Endapan dicuci dengan air suling, kemudian dipusingkan lagi pada 10.000 rpm selama 10 menit kemudian filtrat cucian dibuang. Endapan dikeringkan pada suhu 80°C selama 24 jam. Setelah kering ditimbang. Data penimbangan setiap sampel dibuat kurva antara hubungan BSK dengan waktu.

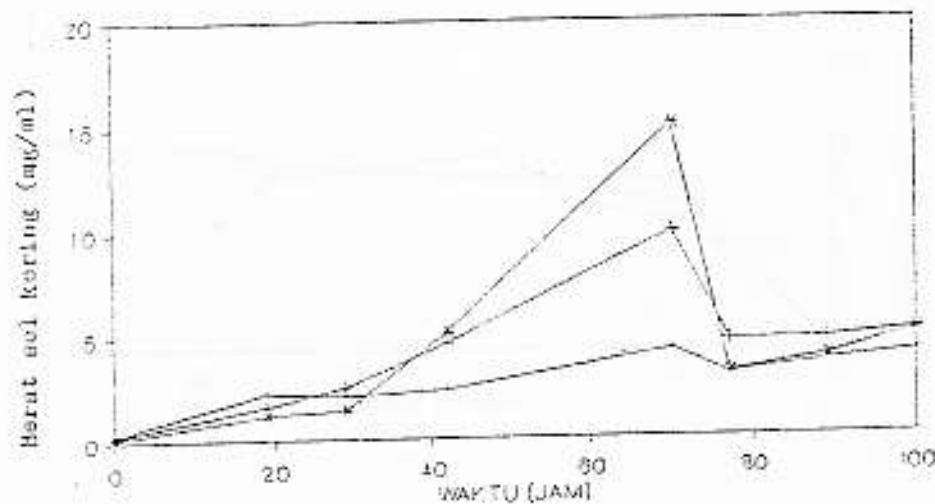
Untuk pengujian potensi hayati eritromisin dari hasil fermentasi *Saccharopolyspora erytraea* dilakukan langkah-langkah sebagai berikut: sampel steril (filtrat hasil pusingan uji BSK) diteteskan pada disk yang diletakan diatas biakan *Sarcina lutea*, masing-masing sebanyak 10 ul. Biakan diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam, hingga terlihat adanya hambatan pertumbuhan bakteri diukur pada jam ke 24, 40 dan 48. Data hasil pengukuran diameter hambatan dibandingkan dengan diameter hambatan eritromisin standar (15 ug/disk) yang dikerjakan sama dengan hasil fermentasi, kemudian dibuat kurva hubungan kadar eritromisin dengan waktu.

Untuk membuat suspensi mikroorganisme *Sarcina lutea* dapat dilakukan langkah-langkah sebagai berikut : Dibuat suspensi inokulum *Sarcina lutea* dalam media nutrien broth steril, diinkubasikan selama 1-2 hari pada temperatur 28-30° C. Kepekatan suspensi *Sarcina lutea* dalam media nutrien broth diatur, lalu diperiksa dengan spektrofotometer pada 600 nm mempunyai A=0,5. Suspensi *Sarcina lutea* ini disuspensikan kedalam media antibiotika no 1 steril (2,7% ,disterilkan selama 15 menit pada temperatur 121° C lalu digoyang-goyang hingga rata dan kemudian didinginkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap penambahan prekursor valin dan propionat, kedua bentuk senyawa ini memang memacu pertumbuhan sel bakteri sesuai dengan percobaan yang telah dilakukan oleh corcoran (1981). Penambahan propionat memberikan pengaruh yang lebih besar apabila dibandingkan dengan penambahan valin dengan uji statistik t tes pada $p < 0,01$. Pada gambar 1 terlihat bahwa sel mengalami pertumbuhan dengan pesat hingga mencapai maksimum pada jam ke 70 dan mengalami penurunan kembali pada jam ke 77 kemudian terlihat kenaikan sedikit lagi. Meskipun fase stasioner dari ketiga pertumbuhan sel tersebut tidak tampak dengan jelas, namun diperkirakan fase stasioner ini terjadi pada jam ke 70, dengan asumsi setelah itu terjadi penurunan pertumbuhan sel bakteri dengan cepat.

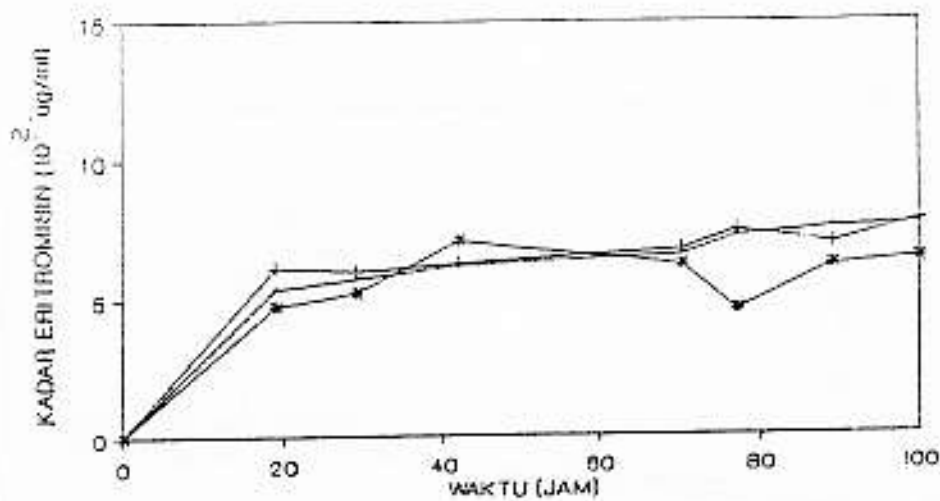
Gambar 1 Hubungan waktu dengan pertumbuhan sel pada fermentasi *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635 dalam media produksi tanpa perlakuan, perlakuan dengan propionat dan perlakuan dengan valin.



Keterangan : * = Perlakuan dengan propionat
+ = Perlakuan dengan valin
. = Perlakuan dengan blanko

Pada gambar 2. terlihat bahwa produksi eritromisin dengan perlakuan valin sebagai prekursor mempunyai kemampuan yang lebih besar apabila dibandingkan dengan perlakuan propionat maupun blanko ($p < 0.05$). Produksi eritromisin dengan perlakuan propionat mencapai maksimum pada jam ke 42, valin pada jam ke 70, sedangkan tanpa perlakuan mengalami kenaikan terus. Berdasarkan gambaran diatas terlihat bahwa valin ternyata memacu produksi eritromisin, sedangkan penambahan propionat lebih memacu pertumbuhan sel dari pada pembentukan eritromisin. Dengan kata lain penambahan propionat digunakan untuk pembentukan metabolit primer pada fase eksponensial.

Gambar 2 Hubungan waktu dengan produksi eritromisin yang dihasilkan dari fermentasi *Sarcina lutea* dalam media produksi tanpa perlakuan, perlakuan dengan propionat dan perlakuan dengan valin.



Keterangan : * = Perlakuan dengan propionat
 + = perlakuan dengan valin
 . = perlakuan dengan blanko

KESIMPULAN

1. Penambahan propionat atau valin memacu pertumbuhan sel *Saccharopolyspora erythraea* ATTC 11635, tetapi pada penambahan propionat hasilnya jauh lebih besar.
2. Penambahan valin meningkatkan produksi eritromisin, tetapi tidak terjadi peningkatan pada penambahan propionat.

DAFTAR PUSTAKA

- Corcoran, J.W., 1981, *Biosynthesis Antibiotika*, IV, 132-170 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Donadio, S., M.J. Staver, J.B. Mc Alphin, S.J. Swanson, L. Katz, 1991, Modular organization of genes Required for complex Polyketide Biosynthesis, *Science*, 252, 675.
- Harper, H.A., V.W. Rodwel, P.A. Mayes, 1984, *Review of Physiological Chemistry*, 19 th, diterjemahkan oleh Aji Darma dan A.S Kurniawan, 300-303, Penerbit buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Kuo, M.S.T., D.A Yurek, J.H. Coats, G.P. Li, 1989, *J. Antibiotics*, 42, 475-478.
- Manitto, P., 1981, *Biosynthesis of Natural Products*, 10-11, 110-165, Ellisherwod Ltd., England.
- Omura, S and Y. Tanaka, 1984, Biochemistry, Regulation and genetics of Macrolide Production in Omura, S (ed), *Macrolide Antibiotics*, 200-208, 211, Academic Press, Inc., Orlando, Sandiego, New York, Toronto, London, Montreal Sydney, Tokyo.
- Seno, E.T., C.R. Hutchinson, 1986, The Biosynthesis of Tylosine and Erytromycin : Model system for studies of Genetics and Biochemistry of Antibiotics Formation in Queener, S.W. & Day, L.E. (Eds), *The Bacteria, IX, Antibiotic - Producing Streptomyces*, 252-261, Academic Press, Inc., Orlando, Sandiego, New York, Austin, London, Montreal, Sydney, Tokyo, Toronto.