PERBANDINCAN FERMENTASI ANTIBIOTIK OLEH *STREPTOMYCES SP.* S-34 DAN DUA REKOMBINASINYA PADA BEBERAPA MEDIUM

Oleh :

Edy Djauhari Purwakusumah *)

ABSTRAK

Sampai saat ini penelitian mengenai antibiotik masih tetap menarik karena selain pemakaiannya yang cukup luas dalam dunia pengobatan juga karena adanya kemungkinan suatu mikroorganisme menjadi resisten/kebal terhadap suatu jenis antibiotik.

Berbagai usaha terus dilakukan untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas antibiotik meliputi optimasi komposisi kandungan medium, kondisi fermentasi, dan pencarian mikroorganisme penghasil yang baru. Salah satu cara untuk mendapatkan rnikroorganisme baru adalah fusi frotoplas yang diperkenalkan oleh Hopwood pada tahun 1977.

Perbandingan proses fermentasi antibiotik ***Streptomyces sp.*** S-34 dengan dua rekombinannya hasil fusi dengan ***Pseudemonas fluorescens*** yang disebut ***HFSP-1*** dan ***HFSP-2*** yang dilakukan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa proses biosintesis antibiotik oleh ketiga mikroorganisme terscbut secara umum adalah sama. Kandungan medium berupa nitrogen dan berbagai kadar glukosa berpengaruh untuk mempercepat pembentukan dan jumlah antibiotik yang dihasilkan.

PENDAHULUAN

Di negara yang beriklim tropis seperti Indonesia, penyakit yang disebabkan oleh infeksi mikroorganisme merupakan kasus yang banyak sekali terjadi. Oleh sebab itu penggunaan obat semacam antibiotik menduduki persentase yang tinggi dalam pemakaian obat-obatan. Selain digunakan untuk pengobatan, antibiotik juga digunakan untuk peternakan, pertanian dan hal-hal lain terutama yang berhubungan dengan Ilmu Biologi. Melihat kenyataan ini dan mengingat adanya kemungkinan mikrooraganisme lama-kelamaan akan resisten/kebal terhadap antibiotik tertentu, maka penelitian untuk peningkatan dan pengembangan antibiotik sampai saat ini masih tetap menarik.

*) staf Pengajar Jurusan Kimia IPB

Dari sekitar 3.000 jenis antibiotik yang dikenal, kurang lebih 70% dihasilkan oleh actinomycetes, terutama oleh genus *Streptomyces*, 20% dihasilkan oleh jamur dan 10% dihasilkan oleh bakteri (1). Selain dipengaruhi oleh faktor genetik dari mikroorganisme, produksi antibiotik juga dipengaruhi oleh kondisi fermentasi seperti : pH awal medium, temperatur fermentasi, aerasi, pemilihan biakan, dan yang terpenting adalah komposisi nutrien dalam medium untuk pertumbuhan sel dan untuk produksi antibiotik.

Berbagai usaha untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas antibiotik terus diiakukan, mulai dari optimasi komposisi nutrien dalam medium dan kondisi fermentasi mikroorganisme penghasil antibiotik tertentu sampai pada mencari mikroorganisme baru penghasil antibiotik.

Pencarian mikroorganisme baru penghasil antibiotik meliputi isolasi mikroorganisme baik dari udara maupun tanah dan manipulasi/mutasi genetik mikroorganisme penghasil antibiotik yang sudah ada. Cara mutasi faktor genetik meliputi mutasi oleh zat-zat mutagen tertentu dan mutasi oleh radiasi sinar tertentu seperti sinar ultra violet (UV), sinar-X, partikel-α, sinar-β, neutron berkecepatan tinggi dan lain-lain (Hash, 1975). Termasuk kedalam cara mutasi ini adalah fusi protoplas yang baru dikembangkan pada tahun 1977 oleh Hopwood (Hopwood, 1977).

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan proses dan hasil fermentasi oleh *Streptomyces* sp. *S-34* sebagai mikroorganisme parental dengan fermentasi oleh dua jenis mikroorganisme rekombiiannya, ***HFSP-1*** dan ***HFSP-2***, pada berbagai jenis dan komposisi medium fermentasi.

Dengan penelitian ini diharapkan potensi dan tingkat kemampuan produksi antibiotik masing-masing mikroorganisme asal dan hasil fusi protoplas dapat dibandingkan, sehingga keuntungan dan kelebihan metoda fusi protoplas dapat ditunjukkan. Selain itu penelitian ini diharapkan dapat menunjang pengembangan pengetahuan mengenai produksi antibiotik dari mikroorganisme dan dapat menambah perbendaharaan antibiotik yang bermanfaat.

TINJAUAN PUSTAKA

Penelitian yang dilakukan oleh Herry Rechnaidy (1987) telah menghasilkan dua jenis mikroorganisme penghasil antibiotik baru yang disebut dengan ***HFSP-1*** dan ***HFW-2***. Kedua mikroorganisme ini dihasilkan dengan cara fusi protoplas menggunakan penginduksi PEG (Poli Etilena Glikol).

Sebagai rekombinan dari ***Streptomyces sp.*** S-34 dan ***Pseudomonas fluorescens***, ***HFSP-1*** dan ***HFSP-2***, mempunyai bentuk morfologis dan sifat fisiologis yang boleh dikatakan sebagai gabungan dari bentuk dan sifat mikroorganisme parentalnya. Sifat fisiologis kedua jenis mikroorganisme hasil fusi ini lebih mirip dengan *Streptomyces* terutama untuk uji gelatin, uji amilum, dan uji lipid (Rechnaidi, 1987).

Dibandingkan dengan induknya yang sama-sama menghasilkan antibiotik, yakni ***Streptomyces sp. S-34***, ***HFSP-1*** dan ***HFSP-2*** ini mempunyai keunggulan dalam kecepatan tumbuhnya. Hal ini merupakan suatu sifat yang diturunkan dari *Pseudomonas fluorescens*.

Antibiotik yang saat ini penggunaannya sudah meluas tidak saja dalam dunia pengobatan, tetapi juga untuk peternakan dan pengawetan mnkanan. merupakan hasil metabolisme sekunder pada beberapa makhluk hidup tertentu. Sebagai metabolit sekunder, pada dasarnya produksi antibiotik diatur olch kontrol regulasi keseluruhan yang berperan pada laju pertumbuhan dan efek regulasi khusus pada setiap jalur metabolisme. Hal ini berarti bahwa produksi antibiotik ditentukan oleh faktor genetik dan faktor lain dari mikroorganisme.

Selain aktivitas (faktor genetik) mikroorganisme yang digunakan, kecepatan proses fermentasi sangat bergantung pada jenis dan konsentrasi substrat/medium serta kondisi fermentasi. Komposisi medium merupakan hal yang sangat penting karena akan mempengaruhi hasil metabolisme mikroorganisme. Media merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan, sumber energi, pembentukan zat tertentu, dan pembentukan sel. Senyawa yang harus ada dalam medium adalah sumber karbon dan sumber nitrogen. Selain karbon dan nitrogen medium ini juga harus mengandung garam anorganik, air, vitamin, dan oksigen terlarut. Kondisi fermentasi meliputi aerasi dan agitasi, temperatur, dan pH. Aerasi dan agitasi sangat berguna untuk meningkatkan kandungan oksigen terlarut dan mencegah terjadinya akumulasi asam laktat pada medium fermentasi. Temperatur optimal bervariasi dan bergantung pada strain mikroorganisme yang digunakan. Walupun produksi suatu antibiotik mempunyai suatu kisaran pH optimum, sebenarnya tidak ada pengaruh langsung terhadap mekanisme reaksi biosintesis antibiotik. pH berpengaruh pada titik isolistrik protein pembentuk sel dan pada keaktifan enzim-enzim mikroba yang terlibat.

BAHAN DAN METODE

Tempat Penelitian . Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung.

Bahan-bahan :

Medium cair kentang glukosa, terdiri dari 200 gram kentang segar, 20 gram glukosa, dan 1000 ml air.

Medium Mc Daniel, terdiri dari 25 gram glukosa, ekstrak susu, 40 gram tepung kacang kedelai, ekstrak ragi 5 gram, 2,5 gram NaCl dan 1000 ml air.

Medium Sintetik Lumb, dengan komposisi sebagai berikut :
Glukosa, $MgSO_4$, $7H_2O$, Na-sitrat, glisin, NaCl, $CaCl_2$, $6H_2O$, KH_2PO_4, $FeSo_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, Mo (Na-molibdat).

Medium Nutrien Broth, terdiri dari 1 gram Beef ekstrak, 2 gram ekstrak ragi, 5 gram pepton, 5 gram Nacl dan 1000 ml air.

Medium taugc agar, tcrdiri dari 100 gram taugc, 60 gram dekstrosa, 17 gram agar, dan 1000 ml air.

Metode :

Ketiga jenis mikroorganisme, yaitu *Streptomyces sp.* S-34, *HFSP-1* dan ***HFSP-2***, mula-mula dibiakkan pada agar miring PDA dengan menggunakan alat Ose secara aseptis. Biakan ini digunakan scbagai sediaan.

Inokulsi dilakukan pada berbagai medium yang dipakai untuk fermentasi dengan cara rnemasukkan $\pm$ 5 ml medium cair yang steril ke dalam sediaan biakan tersebut, kemudian dikocok hingga diperoleh suspensi yang homogen. Suspensi ini dirnasukkan ke dalam 50 ml medium dalam labu erlcnmeyer 250 ml. Kocok di atas alat pengocok selama satu atau dua malam.

Fermentasi dilakukan dengan cara yang sama, hanya dilakukan dalam labu 500 ml dengan 200 ml medium dan biakan diambil dari medium inokulasi. Pengocokan dilakukan terus menerus selama 10 X 24 jam dengan kecepatan 90 rpm.

Pengamatan kurva tumbuh dan jumlah sel dinyatakan dengan kerapatan optik yang diukur dengan Spectronic-20 pada panjang gelombang 610 nm. Pengukuran dilakukan setiap 4 jam sekali pada 32 jam pertama dan kemudian 24 jam sekali sampai hari ke-10.

Potensi antibiotik dan pH medium diamati setiap 24 jam sekali selama 10 hari. Potensi antibiotik ditentukan dengan rnetoda difusi agar menggunakan kertas cakram dan diujikan pada ***Bacillus cereus.***

Sama halnya dengan penentuan potensi antibiotik dan pH medium, penentuan kadar gula pereduksi ini juga dilakukan setiap 24 jam selama 10 hari pada sentrat medium. Dalam penelitian ini, kadar gula pereduksi ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson.

HASIL DAN BAHASAN

Pengaruh Unsur Pokok dalam Medium

Dalam penelitian ini dilakukan fcrmcntasi antibiotik pada 4 jcnis mcdium dengan kandungan unsur pokok yang berbeda. Keempat jenis medium terscbut adalah : (1) kentang glukosa, suatu medium komplek yang penuh dengan karbohidrat; (2) medium Mc Daniels yang merupakan medium komplek yang sangat baik untuk fermcntasi streptomisin olch *Streptomyces griseus*. Medium ini padat dengan kandungan protein nabati; (3) medium Lumb yaitu suatu medium sintetik untuk fermentasi streptomisin; dan (4) Nutrient Broth, suatu medium kompleks dengan kandungan protein hewani yang besar, tctapi tanpa kandungan gula. Medium ini baik untuk pertumbuhan *Pseudeomonas Fluorescens*, induk yang lain dari hasil fusi protoplas.

Dari data pengamatan terhadap potensi antibiotik selama proses fermentasi 10 hari, seperti tercantum pada Tabel 1, ternyata antibiotik hanya terbentuk pada medium yang mengandung gula saja dan potensi yang terbesar diperoleh dari fermentasi pada medium dengan kandungan karbohidrat yang tinggi, yakni kentang glukosa. Hal ini wajar terjadi, karena hampir seluruh antibiotik yang dihasilkan oleh genus Streptomyces bukan oleh kelas Actinomycetes disintesis dari senyawa gula.

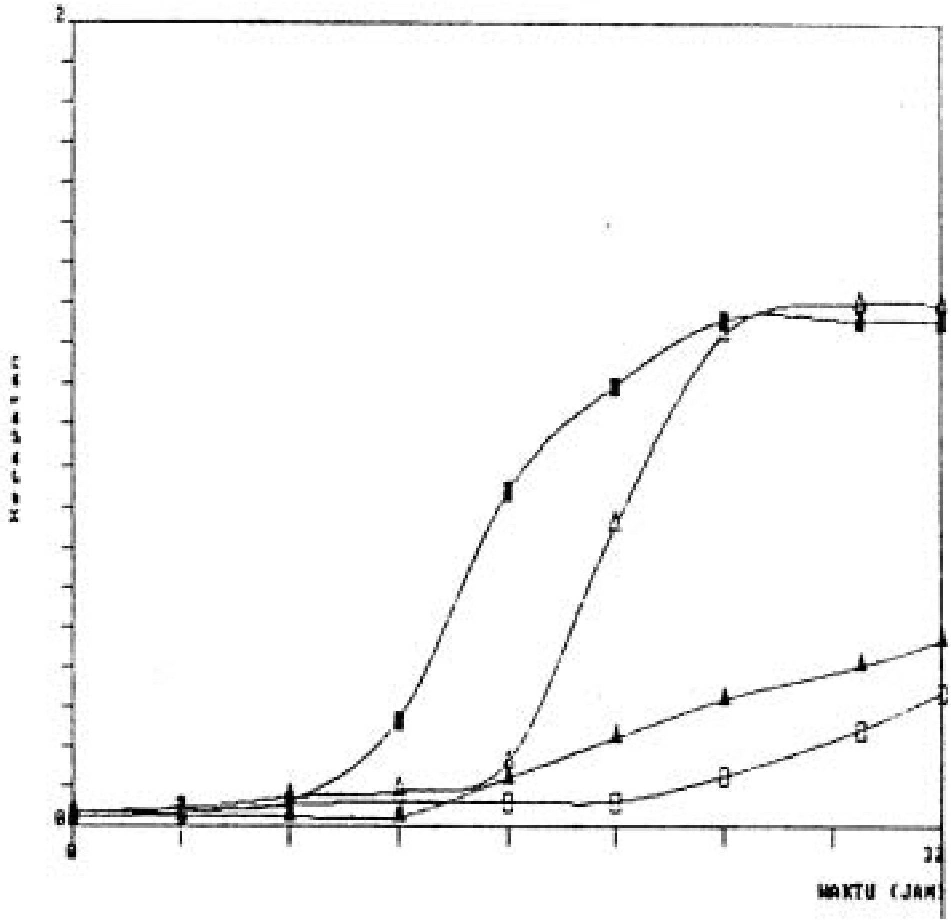
Terlihat pula bahwa kandungan nitrogen akan mempengaruhi terbentuknya antibiotik. Dari sini dapat diketahui bahwa mikroorganisme hasil fusi tidak dapat memproduksi antibiotik pada medium yang banyak mengandung nitrogen. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh pengaruh pada saat regenerasi protoplas, sehingga menjadi sel yang utuh kembali untuk HFSP-I dan HFSP-2 ini digunakan medium PDA. Oleh karena itu kemungkinan faktor-faktor genetik yang tidak sesuai dengan kondisi pada saat regenerasi tidak dapat terus tumbuh dan berkembang.

Tabel 1. Potensi Antibiotik Hasil Fermentasi pada Berbagai Jenis Medium

	Kentang Glukosa	Mc Daniels	Lumb	Nutrient Broth
S-34	+	r(3)	-	-
HFSP-1	+	-	r(4,5)	-
HFSP-2	+	-	r(4,8)	-

Keterangan :	+	=	ada antibiotik
		=	tidak ada antibiotik
	r(x,y)	=	antibiotik renik pada hari x sampai hari ke-y

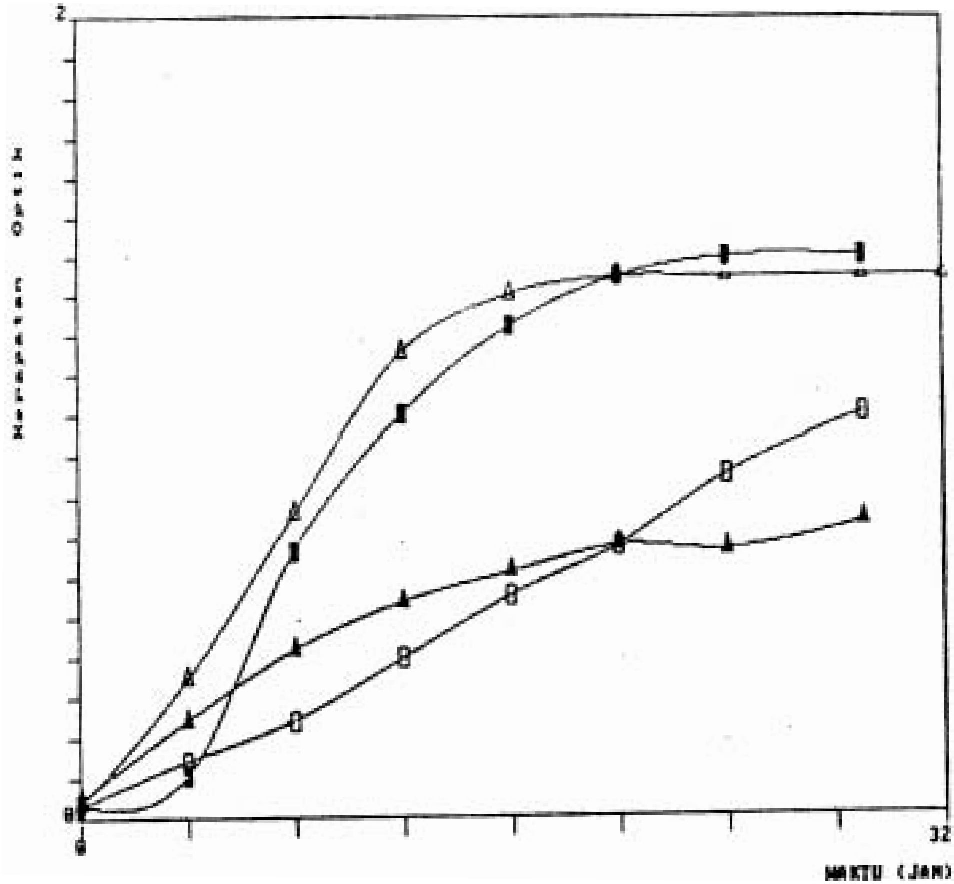
Tidak hanya itu, kandungan nitrogen ternyata juga berpengaruh terhadap kecepatan tumbuh (Gambar I) dan pada pH medium. Kecepatan tumbuh berhubungan dengan kecepatan terbentuknya antibiotik, karena seperti kita ketahui bahwa antibiotik biasanya terbentuk pada masa idiofasa (fasa produksi) yaitu pada saat pertumbuhan menjadi relatif lebih lambat. Jadi semakin cepat mencapai idiofasa, maka semakin cepat pula antibiotik terbentuk.



Keterangan :

= Kentang Glukosa.
= Nutrien Broth
= Mc Daniels
= Lumb

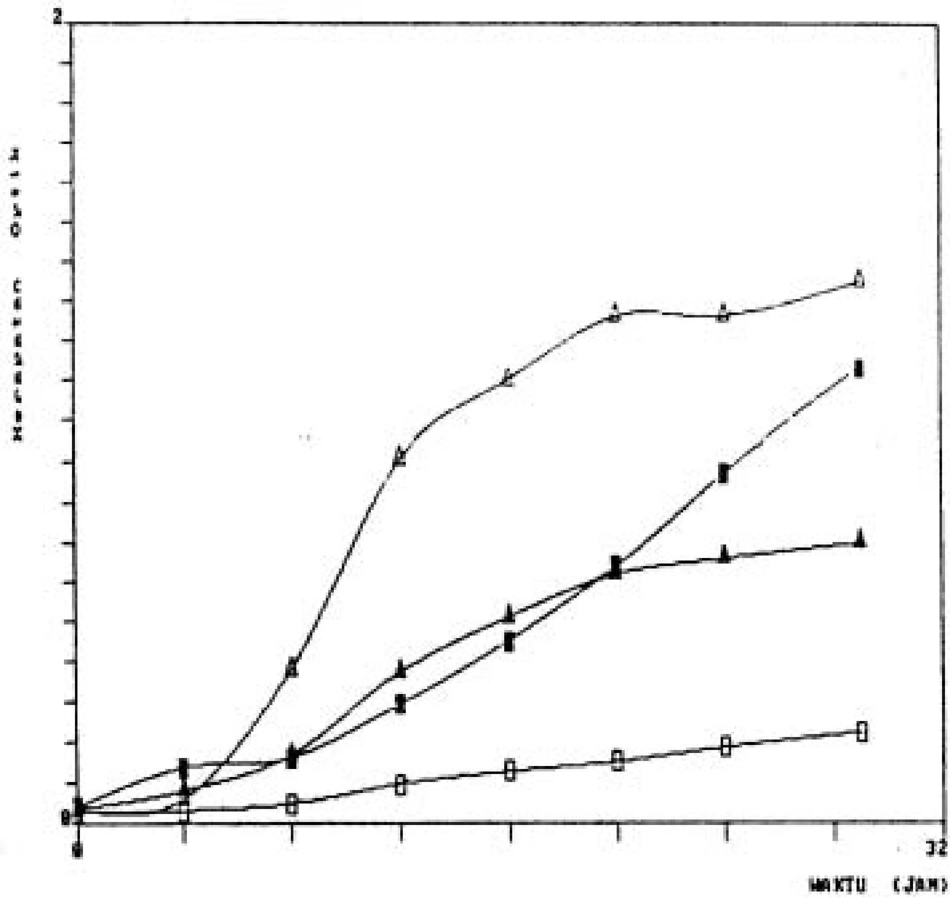
Gambar 1 (a). *Kurva Tumbuh Streptomyces sp.* **S-34 pada Berhagai Jenis Medium Fermentasi**



Keterangan :

Δ———Δ	= Kentang Glukosa	▲———▲	= Mc Daniels
▮———▮	= Nutrien Broth	▯———▯	= Lumb

Gambar 1 (b). Kurva Tumbuh *HFSP-1* yada Berbagai Jenis Medium Fermentasi.



Keterangan :

= Kentang Glukoaa

= Nutrien Broth

= Mc Daniels

= Lumb

Gambar 1 (c). Kurva Tumbuh HFSP-2 pada Berbagai Jenis Mcdium Fermentasi

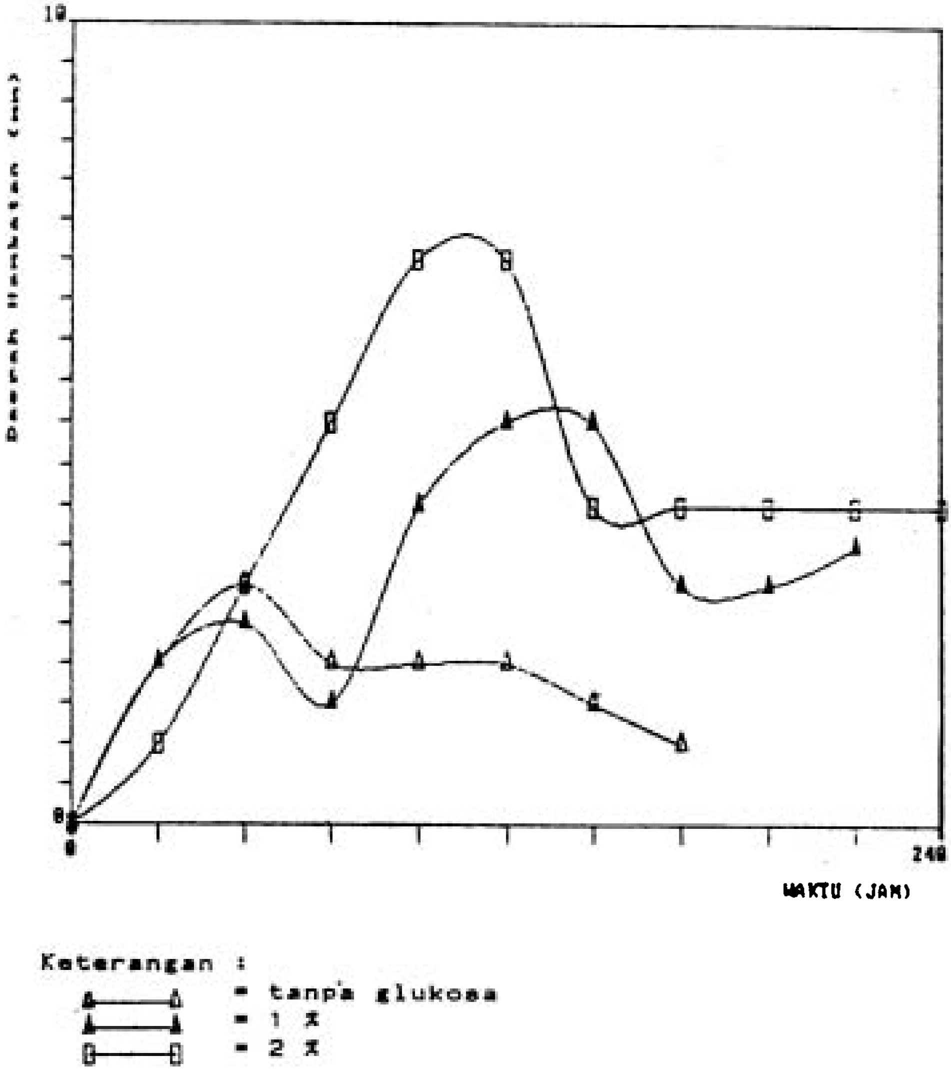
Faktor yang mungkin menyebabkan kurang baiknya pertumbuhan pada medium komplek Mc Daniels adalah ketidakmampuan mikroorganisme itu untuk menguraikan sumber protein dari tumbuhan, dalam hal ini kacang kedelai.

pH medium akan berpengaruh pada proses pembentukan dan kestabilan antibiotik yang dihasilkan. walaupun belum jelas mekanismenya, pada umumnya antibiotik akan terbentuk pada harga pH antara 7 dan 8. Sedangkan pada pH yang lebih tinggi dari harga tersebut, potensi antibiotik yang ada menjadi lebih rendah. Hal ini disebabkan oleh karena sebagian antibiotik yang sudah terbentuk terurai kembali, karena terhidrolisis dalam suasana basa. Untuk mengatasi hal ini, biasanya pada medium ditambahkan $CaCO_3$, yaitu salah satu zat yang dapat mempertahankan kestabilan pH pada daerah netral sampai sedikit basa.

Pengaruh Kadar Glukosa

Kadar glukosa dalam medium jelas berpengaruh untuk pembentukan antibiotik terutama untuk mikroorganisme yang peka terhadap kekurangan dan kelebihan kandungan glukosa. Untuk *Streptomyces sp.* S-34 (Gambar *2)* yang relatif lebih mampu menghidrolisis polisakarida, kadar glukosa yang kecil sampai optimum hanya berpengaruh pada jumlah atau potensi antibiotik yang dihasilkan, tetapi tidak berpengaruh pada kecepatan pembentukkannya.

Sedangkan pada *HFSP-1,* antibiotik tidak terbentuk pada medium tanpa glukosa dan hanya sedikit terbentuk pada medium dengan glukosa yang minimum. Hal ini besar kemungkinan karena *HFSP-1* kurang mampu menghidrolisis polisakarida yang ada dalam medium, sehingga medium kekurangan "senyawa antara" atau prekursor untuk biosistesis antibiotik. Demikian pula halnya yang terjadi pada HFSP-2 pada medium tanpa glukosa dan kadar glukosa minimum.



Gambar 2. Potensi Antibiotik hasil Fermentasi pada Medium Kentang dengan Berbagai Kadar Glukosa oleh *Streptomyces sp.* S-34