

HUBUNGAN AKTIVITAS ENZIM DAN KONSENTRASI SUBSTRAT PADA POLA DETEKSI SECARA HPLC HASIL TRANSGLIKOSILASI PINOCEMBRIN OLEH ENZIM SELULASE *Trichoderma asperellum* LBKURCC1

Fifira Safitri¹, Titania T. Nugroho², Hilwan Y. Teruna³

¹Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

²Bidang Biokimia Jurusan Kimia

³Bidang Kimia Organik Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau

Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

fifirasafitri@gmail.com

ABSTRACT

Enzymatic transglycosylation of pinocembrin was successfully carried out by cellulase from *Trichoderma asperellum* LBKURCC1. However, the reproducibility of the reaction is low, making detection by reverse phase HPLC (High Performance Liquid Chromatography) difficult when the enzyme activity decreases. It is believed that the initial flavonoid concentration used in the transglycosylation reaction influences the detection pattern of transglycosylation product by HPLC, when the enzyme activity is low. In this research, transglycosylation of pinocembrin was done by a concentrated extract of *T. asperellum* LBKURCC1 cellulase and using CMC (Carboxymethyl Cellulose) as glycosyl donor. The reaction was carried out for 30 hours at 40°C and 170 rpm shaking. Results of HPLC analysis showed that cellulase with activity of (4.3±0.2) U/mL could only obtain 1.7% conversion of pinocembrin to its glycosylated product when the substrate concentration was 6 mg/mL. At these conditions, a barely detectable HPLC peak was observed at retention time of 8.4 minutes. This peak increased noticeably when the initial concentration of pinocembrin was decreased to 0.6 mg/mL. Percent conversion of pinocembrin to its transglycosylation product was 4.3% when the initial substrate concentration was 0.6 mg/mL and the enzyme activity was (4.3±0.2) U/mL.

Keywords: Cellulase, pinocembrin, transglycosylation.

ABSTRAK

Reaksi transglukosilasi pinocembrin secara enzimatis berhasil dilakukan menggunakan enzim selulase dari jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1, akan tetapi reaksinya kurang reproduksibel dan sulit dideteksi secara HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) fase terbalik ketika menggunakan enzim selulase dengan aktivitas yang rendah. Konsentrasi flavonoid awal yang digunakan diduga mempengaruhi pola deteksi produk transglukosilasi secara HPLC. Pada penelitian ini, reaksi transglukosilasi

pinocembrin dilakukan menggunakan enzim selulase pekat dan CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) sebagai donor glikosil. Reaksi dilakukan selama 30 jam pada suhu 40°C dengan kecepatan pengocokan 170 rpm. Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa enzim selulase dengan aktivitas (4,3±0,2) U/mL hanya mampu melakukan konversi pinocembrin menjadi bentuk glikosidanya sebesar 1,7% ketika konsentrasi awal substrat pinocembrin 6 mg/mL. Pada konsentrasi substrat ini, terlihat puncak yang sangat kecil dan hampir luput dari deteksi pada waktu retensi 8,4 menit. Puncak produk pinocembrin glikon dapat terdeteksi sebagai puncak yang lebih tinggi pada waktu retensi 8,3 menit setelah enzim direaksikan dengan substrat pinocembrin yang memiliki konsentrasi awal 0,6 mg/mL. Adapun persen konversi dari 0,6 mg/mL pinocembrin aglikon menjadi glikonnya oleh selulase *T. asperellum* LBKURCC1 dengan aktivitas (4,3±0,2) U/mL adalah 4,3%.

Kata kunci: Pinocembrin, selulase, transglikosilasi.

PENDAHULUAN

Pinocembrin adalah salah satu golongan flavonoid yang dapat ditemukan pada buah-buahan, tumbuhan hijau, madu, dan teh. Pinocembrin mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang membahayakan kesehatan mulut (Koo dkk., 2002) dan menyebabkan apoptosis pada beberapa tipe sel kanker (Rasul dkk., 2013). Hal ini menyebabkan pinocembrin memiliki potensi yang baik dalam industri farmakologi, akan tetapi pinocembrin memiliki kelarutan yang rendah di air sehingga memiliki daya serap yang relatif rendah pula oleh tubuh (Rasul dkk., 2013).

Kelarutan dan kestabilan senyawa flavonoid dapat ditingkatkan dengan mengubah senyawa tersebut menjadi bentuk glikosidanya melalui reaksi transglikosilasi secara enzimatik dengan menggunakan enzim transferase. Penggunaan enzim dalam sintesis glikosida belum dikembangkan secara luas, padahal metode ini memiliki keunggulan dibandingkan dengan metode kimiawi, seperti tidak adanya

senyawa-senyawa samping yang dihasilkan karena enzim bersifat selektif dan spesifik. Pada reaksi transglikosilasi terjadi pemindahan unit gula ke akseptor yang mempunyai gugus -OH sehingga flavonoid akan berubah menjadi flavonoid glikosida (Soeka dkk., 2007). Transglikosilasi enzimatik umumnya dikatalisis oleh enzim glikosil transferase (GT) dan glikosida hidrolase (GH) (Noguchi dkk., 2008). Salah satu enzim transferase yang umum digunakan dalam reaksi transglikosilasi ini adalah enzim selulase yang memiliki sifat *retaining enzyme*, yaitu enzim hidrolisis yang mampu menahan hasil hidrolisis dalam waktu yang cukup lama untuk melakukan reaksi transfer glikosil ke akseptor sebelum melepaskan produk hidrolisis tersebut (York dan Hawkins, 2000).

Reaksi transglikosilasi telah berhasil dilakukan oleh Chen dkk (2011) pada beberapa jenis flavonoid menggunakan enzim selulase yang dihasilkan oleh *Penicillium decumbens*. Putri (2015) juga telah berhasil melakukan reaksi transglikosilasi pinocembrin menggunakan enzim selulase dari

Trichoderma asperellum LBKURCC1. Hal ini terlihat ketika kepolaran dari pinocembrin yang diujikan mengalami peningkatan setelah reaksi transglukosilasi. Pada pra-penelitian yang dilakukan oleh penulis, ternyata reaksi transglukosilasi enzimatis pinocembrin kurang reproduksibel dan produk transglukosilasi sulit dideteksi. Diduga hal tersebut disebabkan adanya hubungan antara aktivitas enzim dan konsentrasi substrat flavonoid terhadap pola deteksi hasil reaksi secara HPLC. Dugaan ini berdasarkan fakta bahwa aktivitas enzim yang digunakan pada pra-penelitian lebih rendah ($4,3 \pm 0,2$) U/mL dari aktivitas enzim yang digunakan Putri (2015), yaitu ($5,1 \pm 0,42$) U/mL dengan konsentrasi substrat flavonoid 6 mg/mL.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah HPLC Shimadzu seri UFLC system dengan kolom *Shim Pack C18* berukuran 150 mm x 4,6 mm (Shimadzu, Kyoto, Japan), spektrofotometer UV-Vis *Genesys 10S* (*Thermo Scientific*), mikrosentrifuga berpendingin Hitachi CT15RE, makrosentrifuga berpendingin HermLe Z400K (*refrigerated clinical centrifuge*), *shaking incubator* model LSI 3016R (Daihan Lab Tech Co. LTD), *cooled incubator* Gallenkamp, *shaker* Daihan Lab Tech LSI-1, dan peralatan gelas lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah flavonoid pinocembrin (koleksi Laboratorium Kimia Organik FMIPA, Universitas Riau) yang diisolasi dari tumbuhan

Goniothalamus ridleyi, CMC (*Carboxymethyl Cellulose*), Avisel, *filter glass fiber* (*Whatman GF/C* ukuran pori 1,2 μm , katalog no. 1822-055), dan pelarut serta bahan-bahan lain yang sesuai dengan prosedur kerja.

Penelitian ini menggunakan isolat jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 yang merupakan koleksi dari Laboratorium Biokimia FMIPA, Universitas Riau.

b. Lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler, dan Laboratorium Kimia Organik Sintesis Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau.

c. Peremajaan isolat jamur *T. asperellum* LBKURCC1 pada media PDA

Isolat jamur *T. asperellum* LBKURCC1 diambil dengan menggunakan ose secara aseptis dan diinokulasikan ke media PDA. Media PDA tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 6 hari, atau hingga spora jamur tumbuh subur.

d. Inokulasi jamur *T. asperellum* LBKURCC1 dalam media produksi

Spora jamur *T. asperellum* LBKURCC1 yang diremajakan pada media PDA dibilas dengan larutan salin steril (NaCl 0,8%) dan dilepaskan dari media dengan menggunakan ose secara aseptis. Larutan disaring menggunakan *glasswool* sehingga diperoleh suspensi spora. Suspensi spora ini diencerkan

hingga 32 kali sehingga pembacaan OD (*Optical Density*) antara 0,1-0,9. OD diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm (OD_{660nm} sebesar 0,34 setara dengan $\sim 7 \times 10^{12}$ spora/mL). Spora jamur diinokulasikan ke dalam media produksi cair dan diinkubasi pada suhu ruang menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan putaran 150 rpm selama 72 jam.

e. Produksi enzim selulase

Spora yang telah diinokulasi ke dalam media produksi selama 72 jam didinginkan selama ± 1 jam pada suhu 4°C. Enzim dipisahkan dari campuran spora dan media produksi dengan cara sentrifugasi dingin selama 10 menit pada kecepatan 9.500 rpm, lalu disaring menggunakan *filter glass fiber*. Filtrat yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim, lalu ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasinya 0,02%. Ekstrak kasar enzim dimasukkan dalam tabung mikro dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu $\pm -20^\circ C$.

f. Pemekatan enzim selulase

Ekstrak kasar enzim dipekatan dengan menambahkan $(NH_4)_2SO_4$ secara perlahan-lahan hingga kejenuhan 80% dalam keadaan dingin sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* selama ± 30 menit. Campuran ini disentrifugasi dingin selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi menggunakan mikrosentrifuga dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 5°C. Bufer asetat 0,05 M pH 5,5 ditambahkan ke dalam endapan hingga terjadi pemekatan yang diperkirakan

mencapai 70 kali volume. Misalnya, volume enzim awal 350 mL, maka penambahan bufer pada endapan adalah 5 mL. NaN_3 ditambahkan ke dalam enzim pekat tersebut hingga konsentrasi 0,02%, kemudian enzim dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disimpan dalam lemari pendingin.

g. Penentuan aktivitas enzim

Aktivitas enzim selulase diukur menggunakan substrat CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) dengan menghitung jumlah gula pereduksi yang dihasilkan. Konsentrasi gula pereduksi ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi.

h. Transglukosilasi pinocembrin secara enzimatik dan analisis produk secara HPLC

Reaksi transglukosilasi enzimatik dilakukan dengan mereaksikan 500 μL substrat flavonoid pinocembrin, 10 mg donor glikosil CMC, dan 100 μL enzim selulase pekat. Adapun konsentrasi pinocembrin yang digunakan adalah 6 mg/mL dan 0,6 mg/mL dalam pelarut bufer asetat-etanol 40%. Campuran reaksi ini diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 170 rpm dan suhu 40°C selama 30 jam. Setelah itu, sebanyak 600 μL larutan Trikloro asetat (TCA) 2% ditambahkan ke dalam masing-masing tabung untuk menghentikan reaksi transglukosilasi, kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks selama 30 detik, dan didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar. Selanjutnya campuran dihomogenkan kembali menggunakan vorteks. Larutan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm, lalu dipisahkan

filtrat dan endapannya. Filtrat disimpan di tabung mikro yang bersih untuk analisis secara HPLC dengan metode fase terbalik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji aktivitas enzim selulase *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 menggunakan substrat CMC ditunjukkan pada Tabel 1. Ekstrak kasar enzim memiliki rata-rata aktivitas enzim selulase sebesar $(0,08 \pm 0,002)$ U/mL, sedangkan enzim pekat memiliki aktivitas rata-rata sebesar $(4,3 \pm 0,2)$ U/mL. Aktivitas enzim pekat ini meningkat 54 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim. Pada supernatan enzim diperoleh aktivitas 0 U/mL yang menandakan bahwa dalam supernatan tersebut sudah tidak terdapat selulase lagi, dan seluruh selulase telah terendapkan oleh 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Analisis hasil reaksi transglukosilasi pinocembrin secara HPLC fase terbalik dirangkum pada Tabel 2 (kromatogram ditampilkan secara utuh di dalam Safitri, 2015). Kromatogram uji untuk reaksi transglukosilasi menggunakan pinocembrin dengan konsentrasi 6 mg/mL menunjukkan puncak yang sangat kecil pada waktu retensi 8,4 menit, dengan luas area $243.164 \mu\text{m}^2$. Produk yang sangat sedikit dan substrat yang terlalu tinggi menyebabkan puncak pada waktu retensi 8,4 menit tersebut sulit terdeteksi. Pada kromatogram uji untuk pinocembrin dengan konsentrasi 0,6 mg/mL terlihat dengan jelas puncak di waktu retensi 8,3 menit. Adanya puncak pada waktu retensi 8,3-8,4 menit menandakan terjadinya reaksi transglukosilasi pada pinocembrin aglikon yang puncaknya terdapat pada waktu retensi 9,5-9,7 menit.

Tabel 1. Aktivitas enzim selulase (CMCase) *Trichoderma asperellum* LBKURCC1

Jamur <i>Trichoderma asperellum</i> LBKURCC1	Rata-rata aktivitas enzim selulase (U/mL)	Kelipatan pemekatan
Ekstrak kasar enzim	$0,08 \pm 0,002$	1x
Enzim pekat	$4,3 \pm 0,2$	54x
Supernatan	0	-

Tabel 2. Waktu retensi (t_r), luas area, dan persen konversi hasil reaksi transglukosilasi pinocembrin secara HPLC

Konsentrasi pinocembrin (mg/mL)	Waktu retensi (menit)		Luas area (μm^2)		% Konversi
	Kontrol	Uji	Kontrol	Uji	
6	9,532	9,751	7.365.499	5.736.131	1,7%
	8,420	8,399	115.131	243.164	
0,6	8,361	8,344	619.475	706.161	4,3%
	9,707	9,738	2.009.605	1.110.527	

Tabel 2 menunjukkan waktu retensi, luas area, dan persen konversi dari masing-masing kromatogram HPLC. Persen konversi terbentuknya produk transglukosilasi yang menggunakan pinocembrin tanpa pengenceran (6 mg/mL) hanya 1,7%. Pinocembrin yang diencerkan 10 kali (0,6 mg/mL) dan digunakan sebagai substrat transglukosilasi terkonversi menjadi bentuk glikosidanya sebesar 4,3%. Persen konversi ini dihitung berdasarkan luas area dari produk glikosida yang terbentuk pada uji dan kontrol lalu dibandingkan dengan substrat flavonoid yang belum terkonversi.

Hasil ini dibandingkan pula dengan penelitian Putri (2015) yang berhasil melakukan reaksi transglukosilasi enzimatis menggunakan enzim selulase yang juga berasal dari *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 terhadap pinocembrin (konsentrasi 6 mg/mL) dengan persen konversi produk sebesar 85,83%. Pada penelitian Putri (2015) terjadi perubahan waktu retensi flavonoid aglikon dari menit 9,5 menjadi 8,8. Perbedaan hasil ini diduga karena beberapa faktor, seperti aktivitas enzim selulase yang digunakan oleh penulis lebih rendah, yakni $(4,3 \pm 0,2)$ U/mL, sedangkan aktivitas enzim selulase pada penelitian Putri (2015) adalah $(5,1 \pm 0,42)$ U/mL. Rendahnya aktivitas enzim selulase yang penulis gunakan kemungkinan mempengaruhi kemampuannya dalam melakukan *retaining* dan transfer glikosil sehingga dapat mempengaruhi proses transglukosilasi. Aktivitas enzim yang rendah ini dapat disebabkan kurang terjaganya kondisi suhu dalam proses ekstraksi dan pemekatan enzim sehingga sebagian enzim terdenaturasi.

Konsentrasi substrat flavonoid juga diduga memiliki peranan terhadap pola deteksi hasil reaksi transglukosilasi pinocembrin secara HPLC. Konsentrasi substrat yang terlalu tinggi menyebabkan puncak pinocembrin glikosida yang mungkin saja terbentuk meskipun kecil tidak dapat terdeteksi. Ketika konsentrasi substrat flavonoid diturunkan hingga 10 kali, puncak dari pinocembrin glikosida pun dapat terlihat sehingga persen konversi pun dapat dihitung. Deteksi puncak yang lebih mudah pada konsentrasi awal pinocembrin yang lebih encer (0,6 mg/mL) disebabkan karena puncak aglikon mengecil sehingga memperbesar deteksi pinocembrin glikosidanya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi substrat yang terlalu tinggi dapat menyulitkan deteksi hasil reaksi transglukosilasi pinocembrin. Produk reaksi transglukosilasi dapat terdeteksi setelah konsentrasi substrat pinocembrin diencerkan 10 kali (0,6 mg/mL) dengan persen konversi sebesar 4,3%. Produk transglukosilasi pinocembrin dengan konsentrasi substrat 6 mg/mL memiliki persen konversi sebesar 1,7%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LP-Universitas Riau yang telah mendanai sebagian dari penelitian ini dengan Hibah Program Penelitian Guru Besar 2014 a.n. Titania T. Nugroho, kontrak nomor 166/UN.19.2/PL/2014, sesuai dengan DIPA Universitas Riau nomor DIPA-023.04.2.415092/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, S., Xing X., Huang, J., Xu, M. 2011. Enzyme-assisted extraction of flavonoid from Ginkgo biloba leaves: improvement effect of flavonol transglycosylation catalysed by *Penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. **48**: 100-105.
- Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Park, Y. K., Bowen, W. H. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *American Society for Microbiology*. Vol. **46** (5): 1302-1309.
- Noguchi, A., Ochiai, M. A., Ishibasi, N., Fukami, H., Nayakama, T., Nakao, M. 2008. A novel glucosylation enzyme: molecular cloning, expression, and characterization of *Trichoderma viride* JCM22452 α -amylase and enzymatic synthesis of some flavonoid monoglucosides and oligoglucosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. **56**: 12016-12024.
- Putri, N. R. 2015. Reaksi transglukosilasi enzimatik quercetin, naringenin, dan pinocembrin menggunakan enzim selulase *Trichoderma asperellum* T.N.C52 dan T.N.J63. *Tesis*. FMIPA-UR, Pekanbaru.
- Rasul, A., Milimouno, F. M., Eltayb, W. A., Ali, M. 2013. Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *Biomed Research International*. Vol. **2013**: 1-9.
- Safitri, F. 2015. Hubungan aktivitas enzim dan konsentrasi substrat pada pola deteksi secara HPLC hasil transglukosilasi pinocembrin oleh enzim selulase *Trichoderma asperellum* LBKURCC1. *Skripsi*. FMIPA-UR, Pekanbaru.
- Soeka, Y. S., Naiola, E., Sulisty, J. 2007. Aktivitas antimikroba flavonoid-glikosida hasil sintesis secara transglukosilasi enzimatik. *Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong*.
- York, W. S., Hawkins, R. 2000. Preparation of oligomeric β -glycosides from cellulose and hemicellulosic polysaccharides via the glycosyl transferase activity of a *Trichoderma reesei* cellulase. *Glycobiology*. Vol. **10**: 193-201.