

Sintesis Alkil N-asetilglukosamina (Alkil-GlcNAc) dengan Enzim N-asetilheksosaminidase yang diisolasi dari *Aspergillus* sp. 501

Iwan Sasakiawan & Rini Handayani

Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Jl. Raya Bogor – Jakarta Km. 46 Cibinong 16911

Email: iwanskakiawan@hotmail.com

ABSTRACT

Enzymatic Synthesis of Alkyl N-acetylglucosamine (Alkyl-GlcNAc) by Application of Transglycosylation Activity of β -N-Acetylhexosaminidase from *Aspergillus* sp. 501. β -N-Acetylhexosaminidase from *Aspergillus* sp. 501 has transglycosylation and hydrolytic activity. Transglycosylation occur through transfer of N-acetylglucosamine (GlcNAc) which was hydrolyzed from p-nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine (*p*NP-GlcNAc) to various alcohols. The transglycosylation product was determined by Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography. Using this transglycosylation activity the novel compound of Alkyl-GlcNAc was synthesized using N-acetylchitotriose as a donor and an ethanol as an acceptor.

Keywords: Alkyl N-acetylglucosamine, Transglycosylation, β -N-Acetylhexosaminidase, *Aspergillus* sp. 501

PENDAHULUAN

Kitinase (EC 3.2.1.14) merupakan enzim yang mampu menghidrolisa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamina. Enzim ini dihasilkan oleh bakteri, jamur, tanaman, dan hewan. Berdasarkan atas cara kerjanya dalam mendegradasi kitin, kitinase dibedakan ke dalam 2 kelompok utama yaitu endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase memotong polimer kitin secara acak menghasilkan dimer, trimer, tetramer, dan atau oligomer N-asetilglukosamina. Eksokitinase memotong kitin hanya dari ujung non reduksi. Bila hasil potongan berupa monomer maka enzim tersebut dinamakan N-asetilheksosaminidase. Namun, bila potongan yang dihasilkan berupa dimer

maka enzim tersebut disebut sitobiosidase (Dahiya *et al.* 2006).

Penggunaan kitin, kitinase dan produk hidrolisisnya di bidang bioindustri telah berkembang pesat dan sangat menarik perhatian. Kitin dan produk hidrolisisnya banyak digunakan dibidang industri kesehatan dan kosmetika, bahkan sebagai biokontrol hama dan penyakit tanaman (Patil *et al.* 2000). Enzim kitinase dapat dihasilkan oleh berbagai makhluk hidup diantaranya adalah mikroba, tanaman dan hewan. Mikroba yang berpotensi memproduksi enzim ini adalah *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Enterobacter*, *Streptomyces* (Omumasaba *et al.* 2001)

Enzim N-asetilheksosaminidase, salah satu kelompok dari eksokitinase dikenal mempunyai sifat transglikosilasi.

Transglikosilasi adalah suatu aktivitas pemindahan gugus karbohidrat hasil reaksi hidrolisis polisakarida ke gugus hidroksil senyawa penerima/akseptor (Gambar 1.). Akseptor yang digunakan biasanya adalah alkohol ($R-OH$) (Kadowaki *et al.* 1997) dengan menggunakan aktivitas transglikosilasi dari beberapa jenis enzim beberapa senyawa aktif telah dimodifikasi untuk memperoleh sifat-sifat yang lebih baik dari senyawa aktif sebelumnya (Bae *et al.* 2002, Haneda *et al.* 2001, Saskiawan *et al.* 2004)

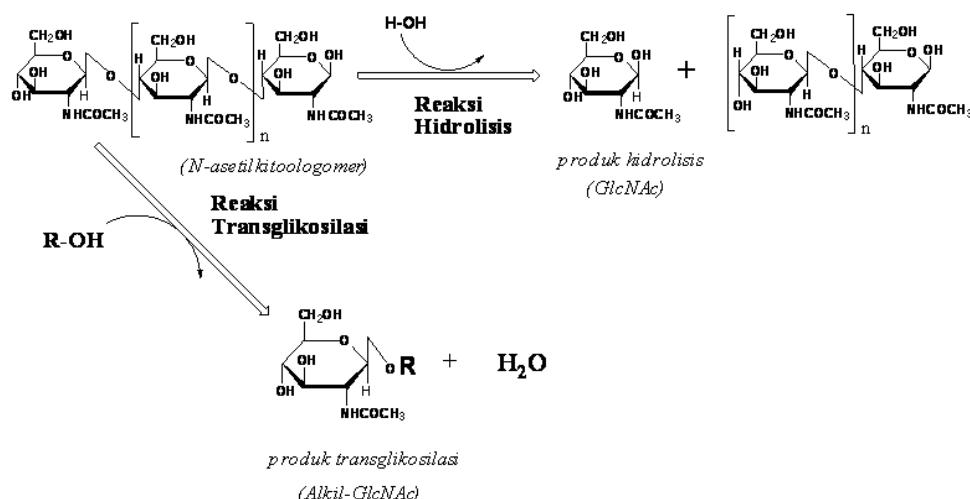
N -acetylglucosamina (GlcNAc) adalah struktur monomer dari polimer kitin yang dapat digunakan untuk terapi pengobatan osteoarthritis (nyeri sendi) dan juga digunakan sebagai makanan suplemen (Sashiwa *et al.* 2002). Penelitian yang dilakukan oleh Widhyastuti (2007) menunjukkan bahwa jamur *Aspergillus* sp. 501 memproduksi enzim

N -asetilhexosaminidase yang menghidrolisis polimer kitin dan menghasilkan monomer GlcNAc.

Penelitian ini bertujuan untuk mensintesa senyawa alkyl GlcNAc melalui aktivitas transglikosilasi enzim N -asetilhexosaminidase dari *Aspergillus* sp. 501 dengan menggunakan senyawa chitotetraose sebagai donor dan ethanol sebagai akseptor.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: enzime kasar kitinase dari *Aspergillus* sp 501 yang merupakan koleksi Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi LIPI, buffer asetat, N -propanol, H_2SO_4 20%, Na_2CO_3 , p -nitrophenyl- β - N -acetylglucosamine (p NP-GlcNAc), N -acetylchitotriose, methanol, etanol, 2-propanol, butanol, 1-oktanol, N -asetilglukosamina, p NP (p -nitrofenol), aquadest, alkohol



Gambar 1. Skema reaksi transglikosilasi dengan menggunakan N-asetilkitoooligomer sebagai senyawa donor dan alkohol ($R-OH$) sebagai senyawa akseptor. Produk transglikosilasi berupa senyawa Alkil-GlcNAc dihasilkan dalam reaksi ini.

70%, aquabidestilata, parafilm, tissue, silika gel aluminium, plastik wrap, aseton, asetonitril, dan aluminium foil.

Pengujian aktivitas N-asetilheksosaminidase dilakukan dengan mendeteksi kadar p-nitrophenol (*p*NP) sebagai hasil hidrolisis substrat *p*NP-GlcNAc oleh N-asetilheksosaminidase. Sebanyak 0,25 ml *p*NP-GlcNAc 3,5 mM ditambahkan pada 0,25 ml bufer asetat pH 5.0 kemudian di vorteks dan dilakukan pre-inkubasi selama 3 menit. Sebanyak 0.1 ml larutan enzim kasar (*crude enzyme*) ditambahkan kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0.9 ml 0.2M Na₂C0₃. Konsentrasi *p*NP yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm. Satu unit aktivitas N-asetilheksosaminidase dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang menghidrolisis substrat *p*NP-GlcNAc dan menghasilkan 1 mM *p*-nitrophenol permenit pada suhu 50°C dan pH 5.0. Dalam pengukuran ini *p*NP (*Biochemika, Fluka*) digunakan sebagai standar.

Pengujian aktivitas transglukosilasi enzim N-asetilheksosaminidase dilakukan dengan menggunakan berbagai macam jenis alkohol sebagai akseptor dan *p*NP-GlcNAc sebagai donor. Alkohol yang digunakan adalah methanol, etanol, 2-propanol, butanol dan 1- oktanol dengan konsentrasi masing-masing 2%, 5%, 7,5%, 10%; dan 20%. Komposisi campuran reaksi untuk pengukuran aktivitas transglukosilasi adalah 0.25 ml *p*NP-GlcNAc 3.5 mM, 0.25 ml buffer asetat pH 5.0 dan 0.1 ml *crude enzyme*. Sebelum penambahan enzim, campuran

divortex agar homogen dan dipre-inkubasi selama 3 menit pada suhu kamar. Setelah penambahan enzim, campuran reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0.9 ml Na₂C0₃ 0.2 M. Aktivitas transglukosilasi enzim N-asetilheksosaminidase dilakukan dengan yang sama dengan pengukuran aktivitas N-asetilglukosaminidase.

Sintesis senyawa Alkil-GlcNAc secara enzimatis melalui aktivitas transglukosidasi enzim N-asetilheksosaminidase dilakukan dengan menggunakan N-asetilkotriose sebagai senyawa donor dan ethanol sebagai senyawa akseptor. Komposisi campuran reaksi tersebut adalah 0.25 ml N-asetilkotriose 3.5 mM; ethanol 7.5% 0.25 ml; 0.25 ml buffer asetat pH 5.0 dan 0.25 ml *crude enzyme*. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0.5 ml Na₂CO₃ 0.2M.

Uji khromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan cara membuat spot dari sampel yang akan diuji pada plat silika gel aluminium (*Kiesel Gel 60F₃₅₄ Plate, Merck, Darmstadt, Germany*) yang sebelumnya telah diberi garis sebagai penanda. Spot yang terbentuk kemudian dikeringkan dengan hair dryer. Setelah kering plat silika gel dimasukkan dalam wadah khusus yang sebelumnya telah diisi dengan larutan pengembang yang terdiri dari larutan *n*-propanol dan aquadest dengan perbandingan 85:15 dan diamati kenaikan larutannya hingga mencapai bagian atas dari plat silika gel tersebut. Selanjutnya plat silika gel dikeringkan dalam oven dengan suhu 120°C selama 1 jam. Setelah 1 jam plat silika gel dikeluarkan dari oven dan

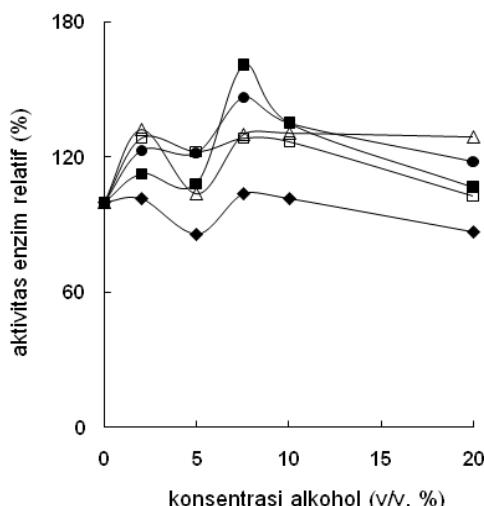
dilakukan penyemprotan dengan H_2SO_4 20% hingga merata dan di oven kembali dengan suhu 150°C selama 5-10 menit.

Campuran reaksi transglukosilasi dianalisa dengan alat HPLC Shimadzu LC 20 AB dengan detector UV VIS Shimadzu SPD 20 AV. Kolom yang digunakan adalah Shodex Asahipak NH2P-50 dengan ukuran 4.6mm x 250mm. Larutan buffer yang digunakan untuk elusi adalah asetonitril dan aquades (7:3) dengan kecepatan alir 1 ml/menit, dideteksi dengan sinar UV pada panjang gelombang 230 nm. Volume sample yang diinjeksi yaitu sebanyak 0.02 ml.

HASIL

Aktivitas transglukosilasi enzim N-asetilheksosaminidase dari kapang *Aspergillus* sp 501, pada campuran reaksi yang menggunakan substrat p-NP

GlcNAc sebagai senyawa donor dan berbagai macam alkohol dengan berbagai tingkat konsentrasi sebagai senyawa akseptor menunjukkan aktivitas relative enzim N-asetilheksosaminidase yang meningkat. Aktivitas tertinggi dicapai pada konsentrasi etanol 7.5% dengan nilai aktivitas relatif sebesar 160.6 %. Pola peningkatan aktivitas enzim N-asetilheksosaminidase untuk setiap jenis alkohol adalah sama dengan peningkatan tertinggi dicapai oleh etanol diikuti dengan propanol, oktanol, butanol dan metanol. Aktivitas enzim ini cenderung turun pada konsentrasi alkohol di atas 15%. Pola aktivitas transglukosilasi enzim N-asetilheksosaminidase dari kapang *Aspergillus* sp 501 ditunjukkan pada Gambar 2. Dari hasil ini, selanjutnya dibuat campuran reaksi dengan menggunakan pNP-GlcNAc sebagai senyawa donor dan ethanol 7.5% sebagai



Gambar 2. Aktivitas relatif enzim N-asetilheksosaminidase dengan menggunakan pNP-GlcNAc sebagai substrat pada sistem reaksi yang mengandung berbagai macam alkohol (◆, metanol; ■, etanol; ●, propanol; □, butanol, dan Δ, oktanol).

akseptor. Campuran reaksi tersebut kemudian diinkubasikan pada beberapa tingkatan waktu dan dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3, munculnya spot baru pada plat silica gel alumunium di posisi paling atas setelah inkubasi selama 30 menit memberikan spekulasi adanya produk transglikosilase. Spot baru tersebut diduga merupakan Alkil-GlcNAc. Ketebalan spot baru tersebut semakin menipis menghilang pada inkubasi selama 3 jam.

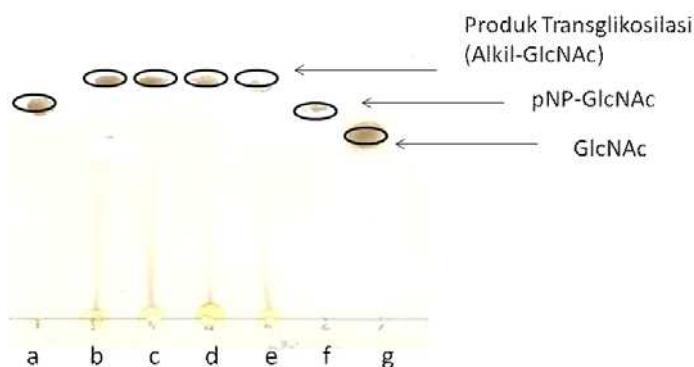
Campuran reaksi tersebut kemudian dianalisis dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hasilnya memperlihatkan adanya *peak* baru yang muncul pada campuran reaksi dengan inkubasi 20 menit dan 30 menit dengan retention time 5.8 menit. Peak ini diindikasikan sebagai senyawa baru yang merupakan produk transglikosilasi (Gambar 4).

Selanjutnya dengan aktivitas transglikosilasi dari N-asetilheksosaminidase senyawa Alkil-GlcNAc disintesa dengan menggunakan substrat alami N-asetilkitolotriose (GlcNAc)₃ sebagai donor dan ethanol sebagai akseptor. Analisa KLT dari campuran reaksi tersebut dapat dilihat di Gambar 5. Hasilnya menunjukkan bahwa produk transglikosilasi dapat dihasilkan dengan menggunakan N-asetilkitolotriose sebagai donor. Produk transglikosilasi diindikasikan dengan adalanya spot batu dengan posisi paling atas. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas transglikosilasi enzim N-asetilheksosaminidase dari *Aspergillus* sp. 501 dapat digunakan untuk mensintesa senyawa alkil GlcNAc.

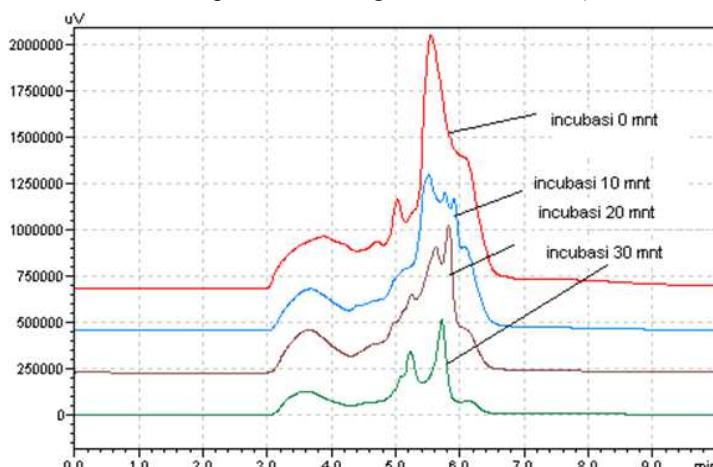
PEMBAHASAN

Di dunia obat-obatan GlcNAc dikenal sebagai salah satu bahan yang digunakan untuk terapi osteoporosis atau nyeri sendi. Bahan tersebut biasanya disintesa melalui hidrolisis secara enzimatis senyawa kitin. Enzim N-asetilheksosaminidase dari beberapa mikroba yang menghidrolisis senyawa kitin dan menhasilkan GlcNAc telah diketahui mempunyai aktivitas transglikosilasi. Melalui aktivitas transglikosilasi ini beberapa senyawa baru yang merupakan modifikasi dari monomer glikosida telah disintesa. Beberapa laporan penelitian menunjukkan bahwa penambahan gugus alkyl pada senyawa aktif monomer glikosida dapat mempengaruhi sifat-sifat fisika dari senyawa alkiglikosida tersebut misalnya stabilitas terhadap suhu, derajat keasaman dan lain sebagainya (Shinoyama *et al.* 1988, Kadowaki *et al.* 1997).

Dalam penelitian ini senyawa Alkyl-GlcNAc diduga telah berhasil disintesa dengan menggunakan aktivitas transglikosilasi N-asetilheksosaminidase dari kapang *Aspergillus* sp. 501. Hasil analisa aktivitas enzim N-asetilheksosaminidase pada campuran reaksi antara pNP-GlcNAc sebagai substrat pada sistem reaksi yang mengandung berbagai macam alkohol menunjukkan bahwa aktivitas ensim tersebut meningkat pada konsentrasi alkohol 7.5% dan cenderung mengalami penurunan pada konsentrasi alkohol 20%. Hasil ini mengindikasikan bahwa N-asetilheksosaminidase dari *Aspergillus* sp. 501 mempunyai aktivitas transglikosilasi yaitu transfer GlcNAc



Gambar 3. Kromatogram KLT hasil reaksi transglikosilasi N-asetilheksosaminidase yang mengandung pNP-GlcNAc sebagai donor dan etanol sebagai akseptor (a, inkubasi 0 menit; b, inkubasi 30 menit; c, inkubasi 60 menit; d, inkubasi 90 menit; e, inkubasi 120; f, standard pNP-GlcNAc; g, standard GlcNAc)

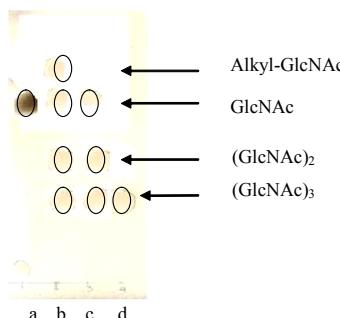


Gambar 4. Kromatogram HPLC reaksi transglikosilasi enzim N-asetilheksosaminidase yang mengandung pNP-GlcNAc sebagai donor dan etanol sebagai akseptor pada berbagai waktu inkubasi. Peak baru yang muncul pada inkubasi 30 menit diindikasikan sebagai produk transglikosilasi (Alkil-GlcNAc).

yang merupakan monomer hasil hidrolisis pNP-GlcNAc ke alkohol sebagai senyawa akseptor. Ethanol merupakan akseptor yang paling baik dibandingkan dengan jenis alkohol yang lain dalam reaksi transglikosilasi ini. Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas relative N-asetilheksosamine yang paling tinggi dibandingkan dengan beberapa jenis

alkohol lainnya (Gambar 2.). Hal ini sesuai dengan penelitian dari Nanjo *et al.* 1990 yang melaporkan bahwa beberapa enzim N-asetilhexosaminidase diduga mempunyai sifat transglikosilasi.

Hasil analisa KLT menunjukkan bahwa produk transglikosilasi, Alkil-GlcNAc diperoleh dengan adanya spot baru pada kromatogram setelah inkubasi



Gambar 5. Kromatogram KLT hasil reaksi transglukosilasi N-asetilheksosaminidase yang menggunakan N-asetilkitolotriose sebagai donor dan etanol sebagai akseptor (a, standar GlcNAc; b, campuran reaksi transglukosilasi; c, campuran reaksi tanpa etanol; d, campuran reaksi tanpa enzim)

30 menit dengan nilai Rf 0.8 dan GlcNAc dengan nilai Rf 0.5 seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Setelah inkubasi selama 2 jam, spot yang diduga senyawa Alkil-GlcNAc terlihat semakin tipis. Hal ini bisa disebabkan karena senyawa hasil reaksi transglukosilasi bisa mengalami proses rehidrolisis oleh enzim yang sama dalam satu sistem reaksi. Senyawa Alkil-GlcNAc yang disintesis dalam penelitian ini merupakan senyawa modifikasi dan belum diproduksi secara komersil. Oleh karena itu dalam analisa KLT tidak digunakan senyawa Alkil-GlcNAc sebagai standar.

Dari hasil uji aktifitas transglukosilasi, analisa kromatografi lapis tipis dan analisa *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, pada penelitian ini senyawa Alkil-GlcNAc diindikasikan telah berhasil disintesis secara enzimatis. Meskipun demikian untuk mengetahui struktur kimia senyawa Alkil-GlcNAc masih perlu dilakukan analisis spektroskopi dengan *Nuclear Magnentic Resonance (NMR)*. Sedangkan analisis berat molekul produk transglukosilasi dapat dilakukan spektros-

kopi massa (MS). Selanjutnya penelitian tentang sintesis secara enzimatis senyawa Alkil-GlcNAc dengan skala yang lebih besar, karakter biokimia, dan uji aktivitas senyawa modifikasi tersebut masih diperlukan untuk mengetahui pengaruh penambahan senyawa alkil pada GlcNAc.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dengan dana DIPA Tematik Pusat Penelitian Biologi LIPI tahun anggaran 2008-2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Bae HK, SB.Lee, CS. Park, JH. Shim, HY. Lee, MJ. Kim, JS. Baek, HJ. Roh, JH. Choi, EO. Choe, DU. Ahn & KH. Park. 2002. Modification of Ascorbic Acid Using Transglycosylation Activity of *Bacillus Stearothermophilus* Maltogenic Amylase to Enhance Its Oxidative Stability. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3309-3316.

- Dahiya N, R. Tewari, & GS. Hoondal. 2006. Biotechnological Aspects of Chitinolytic Enzymes: A Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 773-782.
- Haneda K, T. Inazu, M. Mizuno , R. Iguchi, H. Tanabe, K. Fujimori, K. Yamamoto, H. Kumagai, K. Tsumori, & E. Munekata. 2001. Chemo-enzymatic Synthesis of a Bioactive Peptide Containing a Glutamine-linked Oligosaccharide and Its Characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 15265: 242-248.
- Kadowaki S, I. Saskiawan, J. Watanabe, K. Yamamoto, M. Bunno , Y. Ichihara, & H. Kumagai. 1997. Transglycosylation Activity of b-N-Acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum* and Its Application to Synthesis of a Drug Carrier. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 341-345.
- Kurakake, M., T. Goto, K. Ashiki, Y. Suenaga & T. Komaki. 2003. Synthesis of New Glycosides by Transglycosylation of N-acetylhexosaminidase from *Serratia marcescens* YS-1. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 1701-1705.
- Nanjo, F., M. Ishikawa, R. Katsumi, & K. Sakai. 1990. Purification, Properties, and Transglycosylation Reaction of b-N-acetylhexosaminidase from *Nocardia orientalis*. *Agric. Biol. Chem.* 54(4): 899-906.
- Omumasaba CA, N. Yoshida, & K. Ogawa. 2001. Purification and Characterization of a Chitinase from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47: 53-61.
- Patil, RS., V. Ghormade, & MV. Deshpande. 2000. Chitinolytic Enzymes: An Exploration. *Enzyme & Microb. Tech.* 26: 473-483.
- Sashiwa, H., S. Fujishima, N. Yamano N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, K. Hiraga, K. Oda, & S. Aiba. 2002. Production of N-acetyl-d-glucosamine form a-chitin by Crude Enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydr. Res.* 337. 761-763.
- Saskiawan, I., M. Mizuno, T. Inazu, K. Hadena, H. Kumagai, & K. Yamamoto. 2004. Enhancement of Bioactivity of *Saccharomyces cerevisiae* a-mating factor by Attachment of Sugar Moiety to Glutamine Residue. *J. Biotechnol.* 114:299-306.
- Shinoyama, H., Y. Kamiyama Y, & T. Yasui. 1988. Enzymatic Synthesis of Alkyl b-Xylosides from Xylobiose by Application of the Transxylosyl Reaction of *Aspergillus niger* b-Xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* 52 (9): 2197-2202.
- Widhyastuti, N. 2007. Produksi Kitinase Ekstraseluler *Aspergillus rugulosus* 501 Secara Optimal pada Media Cair. *Ber. Biol.* 8(6): 547-553.

Memasukkan: Oktober 2010

Diterima: Januari 2011