

HUBUNGAN AKTIVITAS ENZIM DAN KONSENTRASI SUBSTRAT PADA POLA DETEKSI SECARA HPLC HASIL TRANSGLIKOSILASI NARINGENIN OLEH ENZIM SELULASE *Penicillium* sp. LBKURCC27

Puspita Sari¹, Titania Tjandrawati Nugroho², Andi Dahliaty²

¹Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

²Bidang Biokimia Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau

Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

puspitasari.iii@gmail.com

ABSTRACT

Transglycosylation of naringenin was carried out by concentrated cellulase enzyme of *Penicillium* sp. LBKURCC27. Enzymatic transglycosylation of naringenin was successfully carried out by cellulase from *Penicillium* sp. LBKURCC27, 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 believe that the flavonoid concentration used in the transglycosylation naringenin by cellulase *Penicillium* sp. LBKURCC27 influences the detection pattern of transglycosylation product of HPLC. The reaction was carried out for 30 hours at 40°C with acetate buffer 0.05 M pH 5.5 and 170 rpm shaking. Carboxymethyl Cellulose (CMC) was used as glycosyl donor. Results of HPLC analysis showed that cellulase *Penicillium* sp. LBKURCC27 with an activity of (0.670±0.023 U/mL) were not able to convert naringenin to a detectable glycosylated product when the initial substrate concentration was 6 mg/mL. In the 0.6 mg/mL of naringenin concentration, the glycosylation product was formed with 100% of percent conversion.

Keywords: cellulase, naringenin, *Penicillium* sp., transglycosylation.

ABSTRAK

Reaksi transglukosilasi naringenin dilakukan menggunakan enzim pekat selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27. Reaksi transglukosilasi naringenin secara enzimatik berhasil dilakukan menggunakan enzim selulase dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27, namun reaksinya kurang reproduktif dan sulit dideteksi secara HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) fase terbalik ketika menggunakan enzim selulase dengan aktivitas yang rendah. Konsentrasi substrat flavonoid yang digunakan diduga mempengaruhi pola deteksi secara HPLC hasil reaksi transglukosilasi naringenin oleh selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27. Reaksi dilakukan selama 30 jam pada suhu 40°C menggunakan buffer asetat 0,05 M pH 5,5 dan kecepatan pengocokan 170 rpm. *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) digunakan sebagai donor glikosil. Hasil analisis HPLC menunjukkan enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27 dengan aktivitas

(0,670±0,023 U/mL) tidak mampu melakukan konversi naringenin menjadi bentuk glikosida yang terdeteksi secara HPLC ketika konsentrasi awal substrat naringenin 6 mg/mL. Pada konsentrasi substrat naringenin 0,6 mg/mL, produk glikosilasi terbentuk dengan persen konversi sebesar 100%.

Kata kunci: naringenin, *Penicillium* sp., selulase, transglikosilasi

PENDAHULUAN

Flavonoid adalah salah satu kelompok polifenol yang ditemukan dalam tanaman sebagai metabolit sekunder. Flavonoid memiliki berbagai aktivitas, seperti antioksidan, anti-inflamasi, anti alergi, antiulcer, antibiotik dan sifat anti kanker. Bukti epidemiologis menunjukkan bahwa konsumsi tinggi flavonoid yang diturunkan dari tanaman dapat memberikan perlindungan terhadap penyakit jantung koroner, stroke, dan kanker paru-paru. Peran utama dari flavonoid pada tanaman dan manusia adalah perlindungan terhadap stres oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Flavonoid banyak ditemukan dalam buah beri dan anggur merah yang merupakan antosianin dan flavonol yang secara khusus berada dalam bentuk glikosilasi (Cho dkk., 2004).

Pada umumnya flavonoid memiliki kelarutan yang rendah serta tidak stabil terhadap pengaruh cahaya, oksidasi, dan perubahan kimia. Apabila teroksidasi, strukturnya akan berubah dan fungsinya sebagai bahan aktif akan berkurang dan bahkan hilang. Kestabilan dan kelarutan senyawa flavonoid dapat ditingkatkan dengan cara mengubah senyawa flavonoid menjadi bentuk glikosida melalui reaksi transglikosilasi secara enzimatis (Handayani dan Sulisty, 2008). Transglikosilasi enzimatis terutama dikatalisis oleh glikosil

transferase (GT) dan glikosida hidrolase (GH) (Noguchi dkk., 2008).

Penelitian yang dilakukan oleh Chen dkk. (2011) menunjukkan bahwa enzim selulase dari *Penicillium decumbens* dan *Trichoderma reesei* memiliki aktivitas transglikosilasi. Reaksi transglikosilasi ini mengubah flavonoid aglikon menjadi bentuk flavonoid glikosida. Hal ini terlihat dari kepolaran flavonoid yang meningkat setelah dilakukan reaksi transglikosilasi, dan *Penicillium decumbens* yang memiliki aktivitas transglikosilasi lebih tinggi dari pada *Trichoderma reesei* yang memiliki sedikit aktivitas transglikosilasi. Penelitian yang sama juga dilakukan York dan Hawkins (2000) yang menggunakan enzim selulase *T. reesei* untuk reaksi transglikosilasi dan menyatakan bahwa enzim selulase *T. reesei* memiliki aktivitas transglikosilasi. Sarip (2014) menggunakan enzim selulase dari *Penicillium* sp. LBKURCC27 juga berhasil melakukan reaksi transglikosilasi naringenin. Ternyata pada pra-penelitian oleh penulis, duplikasi reaksi transglikosilasi enzimatis naringenin yang dilakukan oleh penulis kurang stabil, dan sulit terdeteksi. Diduga hal ini disebabkan adanya hubungan antara aktivitas enzim dan konsentrasi substrat flavonoid terhadap pola deteksi hasil reaksi secara HPLC. Dugaan ini berdasarkan fakta bahwa aktivitas enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27 yang

digunakan pada pra-penelitian lebih rendah ($0,670 \pm 0,023$ U/mL) dari aktivitas enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27 yang digunakan Sarip (2014), yaitu $1,1160 \pm 0,0622$ U/mL dengan konsentrasi substrat flavonoid adalah 6 mg/mL.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis Genesys 10S (*Thermo Scientific*), HPLC Shimadzu seri UFLC sistem dengan kolom Shim Pack C18 berukuran 150 mm x 4,6 mm (Shimadzu, Kyoto, Japan), autoklaf *Electric Model* No.25x (Winconsin Aluminium Foundry Co. Inc., Monitowoc), *shaking incubator* model LSI 3016R (Daihan Lab Tech Co., LTD), *shaker* Daihan Lab Tech LSI-1, *cooled incubator* Gallenkamp, mikrosentrifuga berpendingin Hitachi CT15RE, makrosentrifuga berpendingin HermLe Z400K (*refrigerated clinical centrifuge*), *waterbath* (GRANT SUB28), dan peralatan gelas lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 koleksi laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Riau, flavonoid aglikon naringenin keluaran SIGMA-Aldrich (Cat. No. N5893), *Potato Dextrose Agar* (PDA), dekstrosa monohidrat, CMC (*Carboxymethyl Cellulose*), Avisel, reagen Nelson-Somogyi, reagen arsenomolibdat, *filter glass fiber* (Whatman GF/C Katalog No. 1822055), dan pelarut serta bahan-bahan lain yang sesuai dengan prosedur kerja.

b. Lokasi penelitian

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

c. Peremajaan isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 pada media PDA

Isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 dari tabung isolat menggunakan ose secara aseptis dan diinokulasikan ke media PDA secara zig-zag. Media PDA tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 6 hari, atau hingga spora hijau tumbuh subur.

d. Inokulasi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 dalam media produksi

Spora jamur *Penicillium* sp. LBKURCC27 yang diremajakan pada media PDA dibilas menggunakan larutan salin (NaCl 0,8%) dan dilepaskan dari media dengan menggunakan ose secara aseptis, lalu dihomogenkan menggunakan vorteks. Larutan disaring menggunakan *glass wool* sehingga diperoleh suspensi spora. Sebagian suspensi spora diencerkan hingga 32 kali pengenceran sehingga pembacaan *Optical Density* (OD) antara 0,1-0,9. *Optical Density* (OD) diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm ($OD_{660nm} = 0,34 \sim 7 \times 10^{12}$ spora/mL). Spora jamur diinokulasikan ke dalam media produksi cair dan diinkubasi pada suhu ruang menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 120 jam.

e. Produksi enzim selulase

Produksi enzim selulase dihentikan setelah 120 jam inkubasi dengan mendinginkan media cair produksi pada suhu 4°C selama 1 jam. Enzim dipisahkan dari media cair produksi dengan cara sentrifugasi dingin dengan kecepatan 9500 rpm selama 10 menit, kemudian disaring dengan *filter glass fiber* ukuran pori 1,2 µm. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim, lalu ditambahkan NaN₃ hingga konsentrasinya 0,02% untuk menghambat pertumbuhan mikroba pada enzim jika filtrat tidak digunakan langsung. Ekstrak kasar enzim dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disimpan dalam lemari pendingin (*freezer*).

f. Pemekatan enzim selulase

Pemekatan enzim dilakukan dengan penambahan (NH₄)₂SO₄ secara perlahan dalam keadaan dingin (5-10°C) sambil diaduk menggunakan *magnetic stirer* ±30 menit hingga mencapai tingkat kejenuhan 80%. Endapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi menggunakan mikrosentrifuga dengan kecepatan 13.000 rpm, suhu 5°C selama 5 menit. Supernatan didekantir, endapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan larutan buffer asetat 0,05 M, pH 5,5 hingga terjadi pemekatan yang diperkirakan mencapai 70 kali volume. Enzim pekat yang diperoleh ditambahkan NaN₃ hingga konsentrasi 0,02% dan dimasukkan ke dalam tabung mikro.

g. Penentuan aktivitas enzim

Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan menggunakan CMC sebagai substrat dan mengukur konsentrasi gula pereduksi yang dilepaskan oleh kerja enzim dengan metode Nelson-Somogyi.

h. Transglukosilasi pinocembrin secara enzimatik dan analisis produk secara HPLC

Reaksi transglukosilasi dilakukan dengan mereaksikan 500 µL substrat flavonoid aglikon konsentrasi 6 mg/mL dan 0,6 mg/mL dalam pelarut buffer-etanol 40%, donor glikosil CMC ditambahkan sebanyak 10 mg dan enzim selulase yang telah dipekatkan sebanyak 100 µL. Semua campuran reaksi dimasukkan ke dalam tabung mikro dan diinkubasi selama 30 jam pada *shaking incubator* kecepatan 170 rpm, 40°C.

Setelah diinkubasi, sebanyak 600 µL larutan trikloroasetat (TCA) 2% ditambahkan ke dalam tabung mikro untuk menghentikan reaksi transglukosilasi enzimatik, lalu dihomogenkan menggunakan vorteks selama 30 detik dan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu semua tabung dihomogenkan kembali dan disentrifuga selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm, suhu 25°C untuk mengendapkan protein. Filtrat didekantasi ke dalam tabung mikro yang bersih. Sampel dapat disimpan di lemari es atau dapat digunakan untuk analisis *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji aktivitas enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27 menggunakan substrat CMC ditunjukkan pada Tabel 1. Rata-rata aktivitas enzim CMCase *Penicillium* sp. LBKURCC27 yang diperoleh ekstrak kasar enzim adalah sebesar $0,052 \pm 0,003$ U/mL, supernatan 0 U/mL, dan enzim selulase pekat sebesar $0,670 \pm 0,023$ U/mL. Aktivitas enzim CMCase yang dipekatkan menggunakan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kejenuhan 80% mengalami peningkatan kelipatan pemekatan sebesar 13 kali yang menunjukkan bahwa proses pemekatan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kejenuhan 80% terjadi.

Analisis hasil reaksi transglukosilasi naringenin secara HPLC fase terbalik ditunjukkan pada Tabel 2 (kromatogram ditampilkan secara utuh di dalam Sari, 2015). Waktu retensi naringenin konsentrasi 6 mg/mL sebelum reaksi adalah pada menit ke 7,655 dan produk reaksi transglukosilasi adalah 7,598. Tidak adanya perubahan waktu retensi yang signifikan menunjukkan bahwa reaksi transglukosilasi naringenin konsentrasi 6 mg/mL tidak berlangsung

dan dapat dinyatakan nilai persentase konversi naringenin 0%. Waktu retensi naringenin konsentrasi 0,6 mg/mL sebelum reaksi adalah 7,677 menit dan produk reaksi transglukosilasi adalah 6,696 menit. Perubahan waktu retensi yang cukup signifikan ini terjadi karena adanya perubahan kepolaran senyawa flavonoid. Reaksi transglukosilasi naringenin konsentrasi 0,6 mg/mL memiliki persentase konversi 100% yang menunjukkan produk glukosilasi terbentuk.

Tabel 2 menunjukkan nilai waktu retensi dan persentase konversi reaksi transglukosilasi hasil analisis HPLC pada $\lambda = 288$ nm. Persentase konversi reaksi transglukosilasi adalah persentase berkurangnya konsentrasi substrat atau persentase terbentuknya produk. Persentase konversi reaksi transglukosilasi setelah 30 jam dapat ditentukan dengan perbandingan produk glukosilasi yang terbentuk pada sampel uji terhadap produk glukosilasi pada sampel kontrol.

Hasil penelitian yang diperoleh ini dibandingkan dengan penelitian Sarip (2014) yang berhasil melakukan reaksi transglukosilasi naringenin menggunakan

Tabel 1: Aktivitas enzim selulase (CMCase) *Penicillium* sp. LBKURCC27

Jamur <i>Penicillium</i> sp. LBKURCC27	Rata-rata aktivitas enzim (U/mL)	Kelipatan pemekatan
Ekstrak kasar enzim	$0,052 \pm 0,003$	1
Supernatan	0	0
Enzim selulase pekat	$0,670 \pm 0,023$	13

Tabel 2: Nilai waktu retensi (t_r) dan persentase konversi reaksi transglukosilasi hasil analisis HPLC

Konsentrasi naringenin (mg/mL)	Waktu retensi (menit)		Luas area (μm^2)		Persentase konversi transglukosilasi (%)
	Kontrol	Hasil reaksi transglukosilasi	Kontrol	Hasil reaksi transglukosilasi	
6	7,655	7,598	7.549.277	4.708.651	-
0,6	7,677	6,696	6.381.471	7.424.910	100

enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27. Flavonoid naringenin yang digunakan Sarip (2014) dengan konsentrasi substrat 6 mg/mL memiliki persentase konversi sebesar $94,70 \pm 0,29\%$, atau setara dengan kecepatan reaksi 0,19 mg/mL per jam reaksi transglukosilasi.

Waktu retensi naringenin sebelum reaksi pada penelitian Sarip (2014) adalah 7,430 menit dan produk glukosilasinya pada menit ke 5,148. Hal ini kemungkinan produk transglukosilasi pada penelitian Sarip (2014) juga berbeda, yakni glikon yang dihasilkan adalah pada gugus -OH yang berbeda, atau jumlah gugus glikon per molekul berbeda. Perbedaan hasil penelitian diduga karena aktivitas enzim selulase yang digunakan penulis lebih rendah, yaitu $0,670 \pm 0,023$ U/mL. Aktivitas enzim selulase yang digunakan pada penelitian Sarip (2014) adalah sebesar $1,1160 \pm 0,0622$ U/mL. Aktivitas enzim selulase yang rendah diperoleh oleh penulis dapat disebabkan kondisi suhu pada proses ekstraksi dan pemekatan yang kurang terjaga menyebabkan sebagian enzim terdenaturasi. Aktivitas enzim selulase yang rendah ini kemungkinan dapat mempengaruhi kemampuannya dalam melakukan *retaining* dan transfer glukosil sehingga dapat mempengaruhi proses transglukosilasi.

Konsentrasi substrat flavonoid yang digunakan dengan aktivitas enzim selulase rendah menyebabkan kemampuan untuk melakukan reaksi transglukosilasi berkurang. Hal ini diduga dapat mempengaruhi pola deteksi hasil reaksi transglukosilasi secara HPLC yang menyebabkan puncak kromatogram hasil analisis HPLC sulit terdeteksi. Hasil reaksi transglukosilasi dapat

terdeteksi jelas ketika konsentrasi substrat flavonoid dilakukan 0,6 mg/mL. Hal ini disebabkan rasio puncak antara glikon dan aglikon naringenin membesar karena puncak aglikon mengecil. Rasio aglikon yang mengecil memperbesar skala pada sumbu Y (absorbansi pada panjang gelombang 280 nm) sehingga puncak glikon naringenin yang semula kecil menjadi besar. Hal ini membuktikan bahwa konsentrasi substrat flavonoid pada reaksi transglukosilasi naringenin dengan aktivitas enzim rendah memiliki peranan terhadap pola deteksi secara HPLC.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Konsentrasi substrat naringenin 6 mg/mL dapat menyulitkan deteksi hasil reaksi transglukosilasi naringenin dibandingkan dengan konsentrasi substrat 0,6 mg/mL yang digunakan, bila aktivitas enzim rendah. Persentase konversi naringenin dengan konsentrasi substrat 6 mg/mL tidak terdeteksi sehingga nilai persentase konversi naringenin adalah 0% dan konsentrasi substrat 0,6 mg/mL memiliki persen konversi sebesar 100%.

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.
- Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L., Clark, R. 2004. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **84**: 1771-1782.
- Handayani, R., Sulisty, J. 2008. Sintesis Senyawa flavonoid- α -glikosida secara reaksi transglukosilasi enzimatis dan aktivitasnya sebagai antioksidan. *Biodiversitas*. **9**: 1-4.
- 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.
- Sari, P. 2015. Hubungan aktivitas enzim dan konsentrasi substrat pada pola deteksi secara HPLC hasil transglukosilasi naringenin oleh enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27. *Skripsi*. FMIPA-UR, Pekanbaru.
- Sarip, M. 2014. Reaksi transglukosilasi enzimatis quercetin, naringenin, dan pinocembrin menggunakan enzim selulase *Penicillium* sp. LBKURCC27. *Skripsi*. FMIPA-UR, Pekanbaru.
- 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