TRANSGLIKOSILASI ENZIMATIK SENYAWA ANTIOKSIDAN PINOCEMBRIN MENGGUNAKAN SELULASE *TRICHODERMA RESEEI* UNTUK PENINGKATAN BIOAVAILABILITASNYA

Nova Rianti Putri, Harni Sepriani, Hilwan Yuda Teruna, Titania Tjandrawati Nugroho

Pascasarjana Kimia, FMIPA, Universitas Riau, Pekanbaru 28293.
Alamat koresponden: r.putrinova@yahoo.co.id

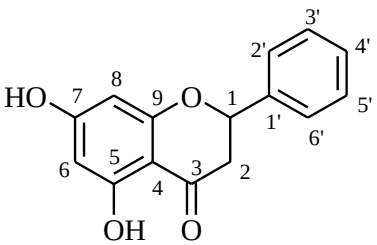
ABSTRAK

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang paling banyak terdapat di alam. Senyawa ini umumnya ditemukan dalam bentuk tidak terikat dengan gula (flavonoid aglikon). Salah satu contohnya adalah flavonoid aglikon pinocembrin. Flavonoid aglikon pinocembrin merupakan senyawa antioksidan, dan terbukti memiliki sifat anti-angiogenesis, anti-inflamasi dan anti-tumor. Senyawa ini belum digunakan dalam jumlah banyak dikarenakan kelarutannya dalam air rendah, tidak stabil terhadap pengaruh cahaya, mudah teroksidasi, dan penyerapan di dalam usus rendah, serta memiliki rasa pahit. Sifat bioavailabilitas flavonoid aglikon ini dapat ditingkatkan dengan melakukan reaksi transglikosilasi. Transglikosilasi merupakan reaksi pemindahan unit gula ke akseptor yang memiliki gugus -OH. Flavonoid aglikon pinocembrin dapat bersifat stabil dan kelarutannya dalam air meningkat apabila diubah menjadi bentuk glikosida sebagai flavonoid glikosida melalui reaksi transglikosilasi secara enzimatik. Dalam penelitian ini transglikosilasi enzimatik pinocembrin dilakukan menggunakan bantuan enzim selulase *Trichoderma reseei*. Reaksi transglikosilasi dilakukan selama 30 jam pada suhu 40^{o}C, menggunakan buffer asetat 0,05M pH 5, dan kecepatan pengocokan 170 rpm. Substrat *carboxymethylcellulose* (CMC) digunakan sebagai donor glikosil. Flavonoid glikosida hasil reaksi transglikosilasi dianalisis menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hasil analisis HPLC menunjukkan enzim *T. Reseei* mampu melakukan reaksi transglikosilasi terhadap pinocembrin yang dapat dilihat dari adanya perubahan nilai waktu retensi dari produk transglikosilasi dibandingkan sebelum reaksi.

Kata kunci: *antioksidan, pinocembrin, selulase, transglikosilasi, Trichoderma reseei*

1. PENDAHULUAN

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang banyak terdapat di alam dan digunakan sebagai obat tradisional (Wang, *et al*., 2010, Winarsih, 2007). Flavonoid dapat ditemukan pada jenis tanaman, buah, dan sayur-sayuran (Wang *et al*., 2010). Konsentrasi paling tinggi dari flavonoid terdapat pada bagian daun dan kulit kupasannya (Winarsih, 2007). Senyawa ini umumnya ditemukan dalam bentuk tidak terikat dengan gula (flavonoid aglikon). Salah satu contohnya adalah flavonoid aglikon pinocembrin. Flavonoid aglikon pinocembrin merupakan senyawa antioksidan, dan terbukti memiliki sifat anti-angiogenesis, anti-inflamasi dan anti-tumor (Soeka *et al*., 2007, Vila-Real *et al*., 2011). Senyawa ini belum digunakan dalam jumlah banyak dikarenakan kelarutannya dalam air rendah, tidak stabil terhadap pengaruh cahaya, mudah teroksidasi, dan penyerapan di dalam usus rendah, serta memiliki rasa pahit. Apabila teroksidasi, struktur senyawa ini akan berubah dan fungsinya sebagai bahan aktif akan berkurang bahkan hilang (Soeka *et al*., 2007).



Gambar 1. Pinocembrin (Lindstedt, *et al*., 1951)

Sifat bioavailabilitas (kemudahan pelarutan dalam senyawa polar dan diserap usus) flavonoid aglikon ini dapat ditingkatkan dengan melakukan reaksi transglikosilasi. Transglikosilasi merupakan reaksi pemindahan unit gula ke akseptor yang memiliki gugus -OH. Flavonoid berbagai aglikon, termasuk pinocembrin, dapat bersifat stabil dan kelarutannya dalam air meningkat apabila diubah menjadi bentuk glikosida sebagai flavonoid glikosida melalui reaksi transglikosilasi secara enzimatik (Noguchi *et al.,* 2008).

Menurut Chen *et al*., (2011), *Penicillium decumbens* dan *Trichoderma reesei* memiliki aktivitas transglikosilasi. Hal ini ditunjukkan oleh hasil reaksi transglikosilasi yang memiliki kepolaran lebih tinggi dibandingkan dengan flavonoid aglikon awal pada flavonoid dari tanaman Ginkgo Biloba. Oleh Chen *et al*., (2011) reaksi transglikosilasi enzimatik flavonoid Ginkgo Biloba ditunjukkan sangat bergantung pada sumber selulase, donor, akseptor, dan kondisi reaksi (pH, suhu, dan pelarut yang digunakan). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan selulase *Trichoderma reesei* untuk mentrasglikosilasi flavonoid aglikon pinocembrin, menjadi suatu flavonoid glikon.

2. METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan peralatan

Bahan yang digunakan adalah pinocembrin isolat kulit batang *Goniothalamus ridleyi*), selulase *Trichoderma reesei* keluaran SIGMA-Aldrich (Cat. No. C8546), CMC (*carboxymethyl cellulose*) keluaran BDH Chemical Ltd. Poole England (Cat. No. 279290, dan reagen analisis lainnya pro-analisis, sesuai cara kerja.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf *Electric Model* No.25x (Winconsin Aluminium Foundry Co. Inc., Monitowoc), spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific Genesys 10S, *shaking incubator* model LSI 3016R (Daihan Lab Tech Co..LTD), mikrosentrifuga berpendingin Hitachi CT15RE, *vortex mixer* H-VM-300, tabung mikro, HPLC Shimadzu seri UFLC sistem dengan kolom Shim Pack C18 berukuran 150 mm x 4,6 mm.

Penentuan aktivitas enzim selulase

Analisis aktivitas enzim menggunakan substrat CMC (*Carboxymethyl Cellulose)*. Tabung uji diisi dengan 500 µL substrat CMC 2% dan diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* pada temperatur 40^{o}C. Tanpa mengeluarkan tabung dari *waterbath*, 500 µL larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diaduk perlahan. Larutan diinkubasi selama 30 menit dalam *waterbath*. Tabung dikeluarkan dari *waterbath,* lalu tambahkan 500 µL reagen Nelson-Somogyi. Tabung dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit dengan mulut tabung ditutup menggunakan kelereng.

Tabung kontrol dibiarkan kosong dan diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* temperatur 40^{o}C. Lalu ditambahkan 500 µL enzim tanpa mengeluarkan tabung dari *waterbath,* diaduk perlahan dan larutan diinkubasi selama 30 menit dalam *waterbath* temperatur 40^{o}C. Tabung dikeluarkan dari *waterbath,* lalu ditambahkan 500 µL reagen Nelson-Somogyi dan 500 µL substrat CMC 2%. Tabung dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit dengan mulut tabung ditutup menggunakan kelereng.

Tabung blanko diisi dengan 2 mL larutan buffer asetat 0,05 M pH 5,5 dan ditambahkan 1 mL reagen Nelson-Somogyi lalu dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit. Tabung uji, kontrol dan blanko didinginkan hingga suhu kamar (boleh dalam air dingin di beaker gelas selama 5 menit). Setelah didinginkan, pada tabung blanko ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat. Untuk tabung uji dan kontrol, reagen arsenomolibdat yang ditambahkan sebanyak 500 µL. Semua tabung tersebut diinkubasi selama 5 menit. Setelah diinkubasi selama 5 menit, pada tabung blanko ditambahkan 6 mL aquades, sedangkan pada tabung uji dan kontrol ditambahkan aquades sebanyak 3 mL. Kemudian tabung tersebut (blanko, uji, dan kontrol) dihomogenkan menggunakan *vortex* hingga tercampur sempurna dan diinkubasi selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan

spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Reaksi transglikosilasi flavonoid aglikon oleh *T. reseei*

Reaksi transglikosilasi sampel dilakukan dengan menginkubasi enzim selulase komersial *T. reseei*, dengan pinocembrin dan donor glikosil CMC selama 30 jam mengikuti metode yang diuraikan oleh Chen *et al.* (2011), dengan kondisi reaksi pelarut buffer-etanol 40%, temperatur inkubasi 40^{o}C dan kecepatan 170 rpm selama 30 jam. Setelah 30 jam waktu inkubasi reaksi dihentikan dengan TCA hingga konsentrasi akhir 1% dan larutan divorteks selama 30 detik. Setelah itu larutan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Larutan disentrifugasi selama 10 menit menggunakan mikrosentrifuga dengan kecepatan 13.000 rpm untuk mengendapkan protein. Filtrat yang diperoleh didekantasi ke dalam tabung mikro yang bersih. Filtrat tersebut disimpan di lemari es dan dapat digunakan untuk analisis lanjutan. Sebagai kontrol, reaksi yang sama dilakukan, dengan menginkubasi CMC dan pinocembrin pada kondisi reaksi yang sama tanpa enzim. Setelah penambahan TCA hingga konsentrasi akhir 1%, pada tabung kontrol baru ditambahkan enzim. Perlakuan selanjutnya adalah sama antara kontrol dan sampel.

Analisis *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Analisis menggunakan HPLC Shimadzu seri UFLC *system* dengan Kolom Shim Pack C18 berukuran 150 mm x 4,6 mm (Shimadzu, Kyoto, Japan). Metode yang digunakan adalah HPLC fase terbalik dengan gradien fasa gerak air-asetonitril (gradien elusi) selama 15 menit dan kecepatan alir 1 mL/menit. Detektor sinar UV digunakan pada panjang gelombang 207 nm dan 288 nm.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

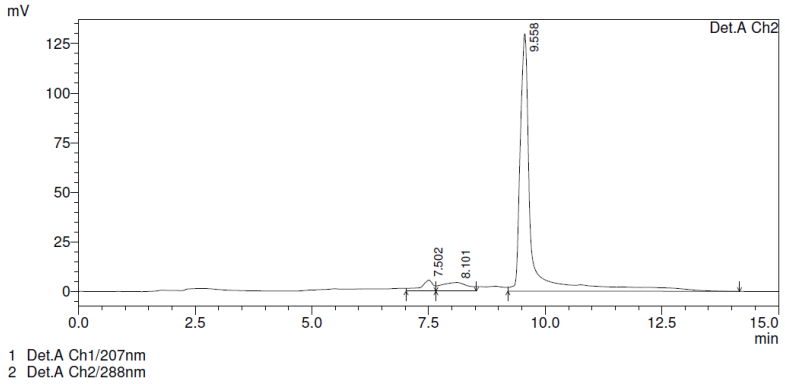
Enzim selulase yang digunakan untuk reaksi transglikosilasi adalah enzim selulase komersial dari jamur *T. reseei*. Hasil uji aktivitas enzim selulase *T. reseei* yang digunakan pada penelitian ini adalah (0,03655±0,0079) U/mL.

Berdasarkan hasil transglikosilasi *T. reseei* pada substrat pinocembrin yang dilakukan selama 30 jam, suhu 40^{o}C, CMC sebagai donor glikosil, dan kecepatan rotasi 170 rpm, diperoleh perbedaan waktu retensi dari puncak pada analisis menggunakan HPLC. Hasil analisis HPLC, waktu retensi pada sampel kontrol dan uji adalah 9,558 dan 8,912 menit (**Gambar 2** dan **3**). Adanya perbedaan waktu retensi antara sampel kontrol dan sampel uji, yaitu 0,646 menit menunjukkan terjadinya reaksi transglikosilasi. Perbedaan waktu retensi ini membuktikan bahwa pinocembrin mampu menjadi akseptor pada reaksi transglikosilasi, dan menjadi senyawa yang lebih polar setelah diglikosilasi. Dengan demikian, reaksi transglikosilasi secara enzimatis (enzim selulase *T. reseei*) dapat meningkatkan bioavabilitas dari pinocembrin karena menghasilkan senyawa yang lebih polar.

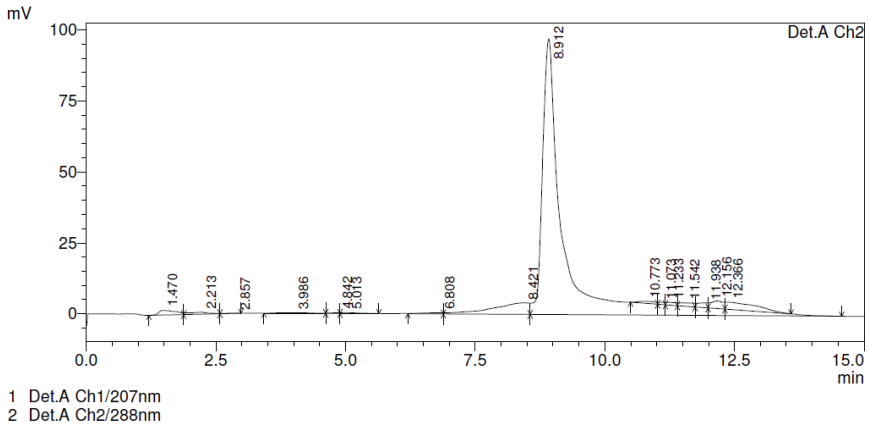
Pinocembrin mampu menjadi akseptor glikosil karena memiliki hambatan ruang yang kecil, yaitu hanya terdapat gugus akseptor –OH pada posisi 5 dan 7. Selain dipengaruhi oleh hambatan ruang (konformasi), reaksi transglikosilasi dipengaruhi oleh sifat dari asam amino penyusun enzim pada sisi pengikatan (*binding site*). Sisi pengikatan enzim selulase *T. reseei* diperkirakan mengandung gugus asam amino hidrofob. Hal ini dapat dilihat bahwa molekul pinocembrin yang kurang polar dapat bereaksi membentuk flavonoid aglikon. Menurut penelitian yang dilakukan Kwon *et al.* (2002), adanya pergantian asam amino pada sisi pengikatan enzim selulase (CMCase/endoglukanase) mempengaruhi reaksi transglikosilasi.

Tidak semua jenis selulase yang dapat melakukan reaksi transglikosilasi akseptor. Reaksi ini dapat terjadi dengan enzim selulase yang memiliki mekanisme *retaining* (York dan Hawkins, 2000, Dinge dan Anton, 2010). Pada reaksi transglikosilasi ini, nukleofil menyerang intermediet glikosil-enzim pada karbon anomerik yang terjadi karena adanya molekul air atau molekul karbohidrat lainnya (Kwon *et al*., 2002). Berbagai faktor mempengaruhi keberhasilan reaksi transglikosilasi. Selain jenis enzim selulase, faktor-faktor yang umum

mempengaruhi reaksi enzimatis juga harus diperhitungkan. Faktor-faktor ini belum diteliti untuk transglikosilasi pinocembrin oleh selulase *T. reesei*. Begitu pula struktur pinocembrin glikon akhir yang diperoleh dari reaksi transglikosilasi tersebut.



Gambar 2. Kromatogram pinocembrin kontrol



Gambar 3. Kromatogram pinocembrin reaksi transglikosilasi menggunakan selulase *T. reseei*

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa enzim selulase *T. reseei* mampu melakukan reaksi transglikosilasi dengan substrat pinocembrin, dan donor CMC. Waktu retensi pinocembrin aglikon adalah 9,558, dan pinocembirn glikon adalah 8,912 menit. Perbedaan waktu retensi menunjukkan adanya reaksi transglikosilasi yang terjadi. Dengan demikian, reaksi transglikosilasi secara enzimatis (enzim selulase *T. reseei*) dapat meningkatkan bioavabilitas dari pinocembrin karena menghasilkan senyawa yang lebih polar.

5. DAFTAR PUSTAKA

Chen, S., Xing, X. H., Huang, J. J. & Xu, M. S. 2011. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from Ginkgo biloba leaves: improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme Microbial Technology*, 48**,** 100-5.

Dingee, J. W. & Anton, A. B. 2010. The kinetics of p-nitrophenyl-*β*-d-cellobioside hydrolysis and transglycosylation by *Thermobifida fusca* Cel5Acd. *Carbohydrate Research*, 345**,** 2507-2515.

Kwon, I., Ekino, K., Oka, T., Goto, M., Furukawa, K. 2002. Effect of amino acid alteration on the transglycosylation reaction of endoglucanase I from *Trichoderma viride* HK-75. *Biotechnology*, 66(1), 110-116.

Lindstedt, G. 1951. Constituent of pine heartwood. *Acta Chemia Scandinavica*, 5, 129-138.

Noguchi, A., Inohara-Ochiai, M., Ishibashi, N., Fukami, H., Nakayama, T., Nakao, M. (2008). A novel glucosylation enzyme: Molecular cloning, expression, and chaaracteriaztion of Trichoderma viride JCM22452 alpha-amylase and enzymatic synthesis of some flavonoid monoglucosides and oligoglucosides. J. Agric. Food Chem. 56: 12016-12024.

Soeka, Y. S., Naiola, E. & Sulistyo, J. 2007. Aktivitas antimikroba flavonoid-glikosida hasil sintesis secara transglikosilasi enzimatik. *Berita Biologi*, 8(6), 455-464.

Vila-Real, H., Alfaia, A. J., Bronze, M. R., Calado, A. R. & Ribeiro, M. H. 2011. Enzymatic Synthesis of the Flavone Glucosides, Prunin and Isoquercetin, and the Aglycones, Naringenin and Quercetin, with Selective α-L-Rhamnosidase and β-D-Glucosidase Activities of Naringinase. *Enzyme research*, 2011,692618.

Wang, A., Zhang, F., Huang, L., Yin, X., Li, H., Wang, Q., Zeng, Z. & Xie, T. 2010. New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *Journal Medicine Plants Research,* 4**,** 847-856.

Wilcox, L.J., Barradaile, N. M., Huff, M. W. 1999. Antitherogenic properties of naringenin, a citrus flavonoid. *Cardiovascular Drug Reviews*, 17, 160-178.

Winarsih, H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.

York, W.S. Hawkins, R. 2000. Preparation of oligomeric β-glycosides from cellulose and hemicellulosic polysaccharides via the glycosil transferase activity of a Trichoderma reesei cellulase. Glycobiology, 10 (2), 193-201.