

AKTIVITAS ANTIMIKROBA FLAVONOID - GLIKOSIDA HASIL SINTESIS SECARA TRANSGLIKOSILASI ENZIMATIK [Antimicrobial Activity of Synthesized Flavonoid - Glycoside through Enzymatic Transglycosylation]

Yati Sudaryati Soeka^c, Elidar Naiola dan Joko Sulisty
Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong.

ABSTRACT

Flavonoid-glycoside was synthesized enzymatically using CGT-ase (EC.2.4.1.19) of indigenous *Bacillus licheniformis* in a phosphate buffer pH 6.0 at 45°C for 24 h, through transglycosylation reaction in the present of flavonoid those were extracted from rhizomes such as ginger, flngerroot, turmeric, white turmeric and white curcuma as natural acceptors, and commercial rice, cassava, corn and wheat flour as substrates.

The result showed that CGT-ase of *B. licheniformis* transferred a glycosyl moiety in a bilayer enzymatic reaction system of n-hexanol and phosphate buffer yielding glycosides as transfer products in the present of wheat flour as substrate and white curcuma extract as its acceptor.

An inhibitory effects of the synthesized flavonoid glycosides against microbial growth was furthermore examined. It was found that flavonoid-glycoside, as the transfer product, exhibited high antimicrobial activity at MIC 200 ppm on the growth of *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, however no effect when it was assayed on *Candida tropicalis*, while arbutin and flavonoid-aglycon showed very low inhibitory activity on the growth of two out of four tested microbial strains.

Kata kunci: CGT-ase, *Bacillus licheniformis*, transglukosilasi enzimatis, flavonoid glikosida, aktivitas antimikroba.

PENDAHULUAN

Flavonoid merupakan senyawa fenol terbesar di alam, terdapat pada semua tumbuhan hijau, termasuk pada ekstrak temu-temuan yang banyak dikonsumsi masyarakat sebagai obat tradisional (Suradikusumab.,1989). Flavonoid telah dikenal luas memiliki aktivitas sebagai senyawa antioksidan, antimelanogenesis dan antimikroba yang potensi (Sulisty dan Soeka, 1999). Akan tetapi flavonoid umumnya memiliki kelarutan yang rendah serta tidak stabil terhadap pengaruh cahaya, oksidasi dan perubahan kimia. Karena itu, apabila teroksidasi, strukturnya akan berubah dan fungsinya sebagai bahan aktif akan berkurang bahkan hilang (Kitao dan Sekine, 1993).

Salah satu cara untuk meningkatkan sifat kelarutan dan kestabilan senyawa flavonoid adalah dengan mengubah senyawa tersebut menjadi bentuk glikosida sebagai flavonoid-glikosida melalui reaksi transglukosilasi secara enzimatis dengan bantuan enzim transferase (Kometani *et al.*, 1994). Reaksi transglukosilasi adalah reaksi pemindahan unit gula ke akseptor yang memiliki gugus-OH.

Penggunaan enzim dalam sintesis glikosida belum dikembangkan secara luas, walaupun memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan metode kimiawi, antara lain adalah biaya produksi yang relatif

rendah serta metode yang mudah dan sederhana. Funayama *et al.* (1994) menyatakan bahwa sintesis senyawa polifenol glikosida secara kimiawi selain tidak ekonomis, juga tidak mudah karena memerlukan perlindungan terhadap beberapa gugus -OH untuk pembentukan regioselektifnya, sehingga akan menghasilkan produk campuran dengan konfigurasi α - dan β -glikosida.

Salah satu enzim yang memiliki aktivitas reaksi transfer adalah siklodekstrin glukotransferase (CGT-ase). Enzim ini mampu mengubah pati menjadi siklodekstrin melalui reaksi transglukosilasi intramolekuler dan mentransfer gugus glukosil ke akseptor yang memiliki gugus-OH melalui reaksi intermolekuler. Selain memiliki kemampuan untuk menghidrolisis pati dan siklodekstrin menjadi senyawa yang lebih sederhana (Kometani *et al.* 1996), enzim tersebut berperan penting dalam reaksi transglukosilasi polifenol-glikosida menggunakan substrat pati.

Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi mengenai beberapa jenis biakan mikroba yang memiliki aktivitas reaksi transfer yang berperan penting dalam mensintesis flavonoid-glikosida sebagai bahan baku industri farmasi, pangan dan kosmetika, menggunakan substrat pati alami dan ekstrak temu-temuan.

BAHANDAN CARA KERJA

Produksi Enzim CGT-ase

Biak yang telah diremajakan pada agar miring PDA (*potato dextrose agar*), diinokulasikan pada media produksi mengandung 2 % pati terlarut, 0,5 % pepton, 0,1 % K_2HPO_4 , 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0001 % $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dalam bufer Na-fosfat untuk biakan yang berasal bakteri dan Na-sitrat untuk biakan yang berasal dari kapang atau khamir pada pH 7,0. Media produksi selanjutnya digoyang selama 6 hari, dan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C dan supernatannya digunakan sebagai sumber enzim CGT-ase kasar.

Optimasi pH dan suhu aktivitas CGT-ase

Penentuan kondisi optimum aktivitas enzim CGT-ase meliputi optimasi pH dan suhu. Hal ini dilakukan untuk menguji aktivitas hidrolitik enzim CGT-ase. Suhu dan pH yang menunjukkan aktivitas hidrolitik tertinggi merupakan kondisi optimum aktivitas enzim CGT-ase.

Campuran reaksi yang terdiri dari 50 i 1 larutan enzim CGT-ase kasar, dan 450 i 1 bufer Na-fosfat atau Na-sitrat 50 Mm yang mengandung 0,5% pati terlarut, diinkubasikan pada suhu 45°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan HCl 10,5 % sebanyak 1 ml. Campuran reaksi kemudian direaksikan dengan pewarna iodine 2,5 ml (KI 0,05 % mengandung I_2 0,005 %). Serapannya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah enzim yang dapat menurunkan unit serapan sebanyak 0,5 pada ϵ 660 nm (Funayamae/fl/. 1993).

Uji Aktivitas Transglikosilasi

Campuran reaksi sebanyak 2 ml, terdiri dari 1,5 ml bufer Na-fosfat atau Na-sitrat 0,05 M pH 7,0 yang mengandung 5 % pati terlarut dan resorsinol 2 % serta 0,5 ml enzim CGT-ase kasar dari beberapa macam biakan, masing-masing diinkubasikan pada suhu 45°C selama 24 jam. Aktivitas enzim CGT-ase dihentikan pada suhu 100°C selama 10 menit, setelah dingin ditambahkan enzim α -amiloglukosidase sebanyak 0,005% dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 45 menit.

Produk transfer yang dihasilkan dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KIT) menggunakan

larutan pengembang 1-propanol 85 %. Piat KLT dikeringkan pada suhu 120°C selama 1 jam, kemudian disemprot dengan larutan pembangkit H_2SO_4 20 % dalam metanol. Selanjutnya plat KLT dipanaskan pada suhu 150°C selama 5-10 menit. Sebagai standar digunakan larutan arbutin, metil- α -glukosida, maltosa, dan glukosa. Biakan yang memiliki nilai R_f sama atau mendekati standar arbutin merupakan biakan yang memiliki aktivitas transfer.

Setelah didapatkan biakan yang mempunyai aktivitas transfer, lalu dilakukan uji aktivitas transfer dengan mengganti substrat otentik dengan berbagai macam pati yang ada dipasaran antara lain tepung terigu, tepung beras, tepung kanji dan tepung maizena, sehingga didapatkan substrat yang memberikan aktivitas transfer tertinggi, kemudian dilakukan uji aktivitas transfer dengan mengganti akseptor otentik dengan ekstrak temu-temuan (jahe, temu kunci, kunir putih, kencur, dan temu putih), sehingga didapatkan akseptor alami yang menunjukkan aktivitas transfer tertinggi.

Sintesis Flavonoid-Glikosida

Dua ratus ml larutan mengandung 5g substrat, 4g akseptor, 50 ml enzim CGT-ase, 75 ml larutan bufer fosfat, dan 75 ml 1-heksanol diinkubasikan selama 24 jam pada suhu optimum. Aktivitas enzim CGT-ase dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 10 menit, setelah dingin ditambahkan enzim α -amiloglukosidase sebanyak 0,005g dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 45 menit. Produk transfer yang dihasilkan dipekatkan hingga volume mencapai ± 10 ml, kemudian diidentifikasi dengan KLT.

Pemurnian Produk Transfer

Produk transfer yang dihasilkan kemudian dipisahkan sampai homogen dengan kromatografi kolom berisi matriks oktadesil silika (ODS), kemudian diseimbangkan dengan metanol sebanyak tiga kali volume kolom dan diseimbangkan lagi dengan asam format 1 % sebanyak tiga kali volume kolom.

Contoh yang telah dipekatkan dimasukkan ke dalam kolom ODS, kemudian dielusi menggunakan metanol dalam asam format 1 %, dengan konsentrasi meningkat (0-100 %). Hasil elusi dianalisis dengan KLT. Fraksi yang mempunyai nilai R_f yang mendekati standar

arbutin diuji aktivitasnya sebagai senyawa antimikrob.

Uji Aktivitas Antimikrob

Penentuan aktivitas antimikrob flavonoid-glikosida diuji menggunakan metode *paper disk*, dengan melibatkan empat perlakuan yang sama terhadap kontrol (aquades steril), flavonoid aglikon, flavonoid glikosida, dan arbutin sebagai senyawa pembanding.

Mikrob uji (*Candida tropicallis*, *Sacharomises cereviceae*, *Escherichia coli*, dan *Bacillus subtilis*) masing-masing diinokulasikan ke dalam media NB {*nutrient broth*) mengandung *beef extract* dan pepton. Media diinkubasi pada suhu 37°C. Sebanyak 1 ml media dipipet dan diencerkan sampai beberapa kali pengenceran. Dari masing-masing pengenceran dipipet sebanyak 0,1 ml dan dituangkan ke dalam cawan petri yang berisi media NA untuk bakteri dan PDA untuk jamur/kapang), kemudian diratakan dengan spatula. Kertas saring mengandung flavonoid-glikosida, flavonoid aglikon, kontrol dan arbutin diletakkan di atas permukaan agar. Media diinkubasi selama satu hari pada suhu kamar dan zona bening yang terbentuk kemudian diukur diameternya.

HASIL

Produksi Enzim CGT-ase

Tahap pertama penelitian ini adalah produksi enzim CGT-ase. Enzim CGT-ase diproduksi dari delapan biakan mikrob yang merupakan koleksi Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI, yaitu 01, F2, F3, F9 , SC1, SC2,483, dan RB1. Kedelapan mikrob tersebut ditumbuhkan dalam suatu media cair yang mengandung pati 2 % (Tabel 1).

Uji Aktivitas Transfer

Pengujian aktivitas transfer dilakukan terhadap enzim CGT-ase yang dihasilkan dari berbagai mikrob yang dapat mentransfer gugus glukosil ke akseptor resorsinol. Hasil reaksi berupa produk transfer resorsinol-glikosida diidentifikasi dengan KLT, ditunjukkan dengan adanya noda yang memiliki nilai Rf standar arbutin (Gambar 1).

Standar yang digunakan dalam identifikasi produk transfer adalah arbutin. Arbutin merupakan senyawa polifenol yang sudah dalam bentuk glikosida,

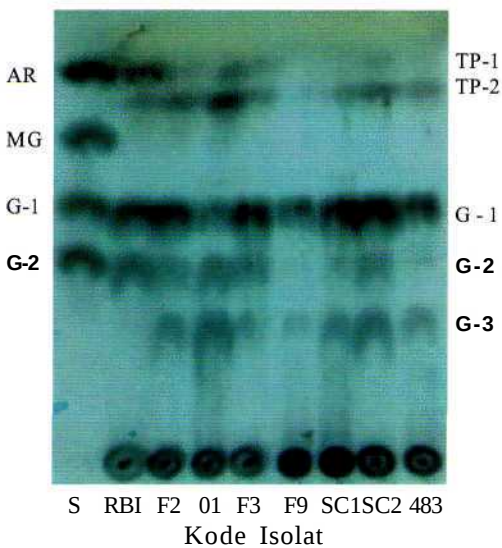
dengan nama sistematik: 4-Hidroksifenil-D-glukopiranosida dan telah diketahui memiliki aktivitas sebagai senyawa antimikrob, antiinflamatori, dan antioksidan.

Fase diam yang digunakan dalam KLT yaitu silika yang bersifat polar, adapun fase geraknya adalah larutan pengembang yang terdiri atas 85 % 1 -propanol dalam air (v/v). Senyawa dengan tingkat kepolaran yang rendah akan terbawa oleh fase gerak sehingga memiliki nilai Rf yang tinggi, sedangkan senyawa dengan tingkat kepolaran yang tinggi akan tertahan sehingga memiliki nilai Rf yang rendah. Senyawa yang banyak memiliki gugus -OH seperti resorsinol-glukosida akan bersifat polar sehingga nilai Rf nya akan lebih rendah. Nilai Rf dari berbagai mikrob uji dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai Rf berbagai komponen hasil uji aktivitas transglukosilasi enzim CGTase dari beberapa isolat

Standar /Isolat	Nilai Rf	Senyawa	Intensitas
Standar	0,73	Arbutin	+++
	0,60	Metil-a-glukosida	+++
	0,48	Glukosa	+++
	0,38	Maltosa	+++
RB-1	0,73	Resorsinol-a-glikosida	+4+
	0,67	Resorsinol-a-glikobiosida	++
	0,47	Glukosa	+++
	0,36	Maltosa	-H-
Isolat 483	0,74	Resoisinol-a-glikosida	±
	0,69	Resorsinol-a-glikobiosida	-
	0,47	Glukosa	+++
	0,39	Maltosa	±
SC-1	0,69	Resorsinol-a-glikobiosida	±
	0,47	Glukosa	++
SC-2	0,73	Resorsinol-a-glikosida	+
	0,69	Resorsinol-a-glikobiosida	++
	0,47	Glukosa	+++
	0,36	Maltosa	++
01	0,73	Resorsinol-a-glikosida	++
	0,67	Resorsinol-a-glikobiosida	+++
	0,47	Glukosa	++
	0,35	Maltosa	+
F-2	0,72	Resorsinol-a-glikosida	±
	0,67	Resorsinol-a-glikobiosida	-H-
	0,47	Glukosa	+++
	0,35	Maltosa	+
F-3	0,73	Resorsinol-a-glikosida	±
	0,71	Resorsinol-a-glikobiosida	++
	0,46	Glukosa	+++
	0,38	Maltosa	+
F-9	0,47	Glukosa	++

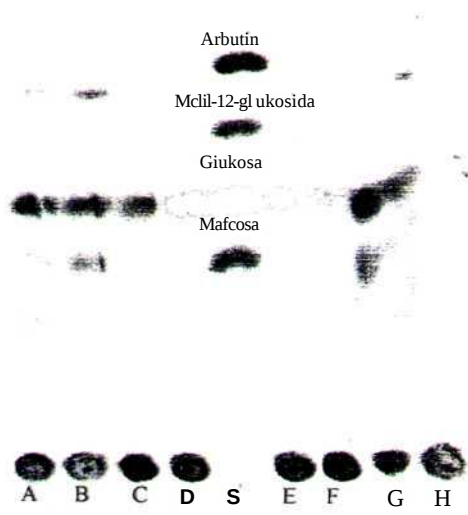
Keterangan: ± intensitas noda tidak jelas/samar-samar.



Gambar 1. Kromatogram hasil uji aktivitas transfer mikrob uji pada akseptor resorsinol. S; standar (AR; arbutin, MG; metil o-glukosida, G-1,2,3; sakharida), TP-1,2; produk transfer.

Pada Gambar 1 ditunjukkan bahwa dari delapan mikrob yang diuji, hanya satu mikrob yang tidak memiliki aktivitas transfer yaitu isolat F9. Mikrob ini hanya mampu menghidrolisis pati menjadi maltosa, sedangkan ketujuh mikrob lainnya memiliki aktivitas transfer, sebagaimana ditunjukkan oleh noda pada plat KLT yang memiliki nilai Rf mendekati standar arbutin. Dari ketujuh mikrob yang memiliki aktivitas transfer, hanya dua isolat yang mampu menghasilkan produk dalam bentuk monoglikosida dengan intensitas yang tinggi, yaitu RB1 dan 01, dengan Rf sebesar 0,73. Nilai Rf kedua biakan tersebut sama dengan nilai Rf pada standar arbutin yaitu sebesar 0,73. Selanjutnya terhadap kedua biakan tersebut dilakukan uji reaksi transfer dengan mengganti substrat pati terlarut dengan substrat komersial, diantaranya tepung beras, tepung kanji, tepung maizena dan tepung terigu.

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa semua jenis tepung uji (tepung beras, tepung kanji, tepung maizena dan tepung terigu) dapat menggantikan substrat pati untuk mikrob RB 1, sedangkan untuk mikrob 01 hanya tepung terigu, tepung beras, dan tepung maizena yang mampu menggantikan substrat pati. Pada kromatogram dapat dilihat bahwa RBI merupakan biakan unggul



Gambar 2. Kromatogram hasil uji aktivitas transfer RB 1 dan 01 pada berbagai substrat. A: tepung kanji RB 1; B: tepung terigu RB 1; C: tepung maizena RBI; D: tepung beras RBI; E: tepung beras 01; F: tepung maizena 01; G: tepung kanji 01; H: tepung terigu 01.

yang mampu melakukan reaksi transglukosilasi baik intramolekuler maupun intermolekuler. Nilai Rf hasil uji aktivitas transfer dengan variasi substrat dapat dilihat pada tabel 2. Nilai Rf RB 1 pada substrat tepung terigu sama dengan nilai Rf standar arbutin, yaitu 0,75. Selanjutnya dilakukan uji variasi akseptor yaitu dengan mengganti akseptor resorsinol dengan ekstrak temu-temuan (jahe, temu putih, temu kunci, kencur, dan kunir putih) dengan menggunakan CGT-ase yang diproduksi dari mikrob RB 1 dan substrat tepung terigu.

Uji variasi akseptor dilakukan menggunakan sistim campuran reaksi dua lapisan yaitu lapisan air dan alkohol, fungsi penambahan alkohol yaitu untuk mengekstraksi senyawa flavanoid-glikosida. Larutan alkohol yang digunakan adalah 1-heksanol. Pada kromatogram (Gambar 3) dapat dilihat bahwa kelima ekstrak temu-temuan yang digunakan mampu menerima gugus glukosil dari substrat tepung terigu, hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya produk transfer baik dalam bentuk biosida maupun monosida pada tiap ekstrak yang diuji (Tabel 3). Dari kelima ekstrak yang diuji hanya ada dua ekstrak yang mampu menghasilkan produk dalam bentuk monoglikosida yaitu temu putih

Tabel 2. Nilai Rf RB-1 dan 01 hasil reaksi transglikosilasi enzim CGT-ase pada berbagai substrat komersial.

Standar /Isolat	Sub strat	Nilai Rf	Sen y a w a	In te n s i t a S
Standar		0,75	Arbu tin	+++
		0,63	M etil-a-g lu ko si da	+++
		0,50	G lu ko sa	+++
		0,38	M alto sa	+++
RB-1	Tepung Kanji	0,75	R esorsinol-a-glikosida	±
		0,71	Resorsinol-a-glikobiosida	++
		0,50	G lukosa	+++
		0,37	M altosa	+
	Tepung Terigu	0,75	R esorsinol-a-glikosida	+
		0,70	Resorsinol-a-glikobiosida	++
		0,50	G lukosa	+++
		0,38	M alto sa	+
	Tepung Maizena	0,70	R esorsinol-a-glikobiosida	+
		0,50	G lukosa	+++
	Tepung B eras	0,76	R esorsinol-a-glikosida	+
		0,73	Resorsinol-a-glikobiosida	++
0 1	Tepung Beras	0,72	R esorsinol-a- glikobio si da	+
		0,51	G lukosa	+
		0,37	M alto sa	±
		0,72	R esorsinol-a-glikobiosida	+
	Tepung M aizena	0,50	G lu ko sa	+
		*	M alto sa	+
	Tepung Terigu	0,75	R esorsinol-a-glikosida	+
		0,72	R esorsinol-a-glikobiosida	++
		0,51	G lukosa	++
		*	M alto sa	++
	Tepung Kanji	0,50	G lukosa	+++
		0,37	M alto sa	++

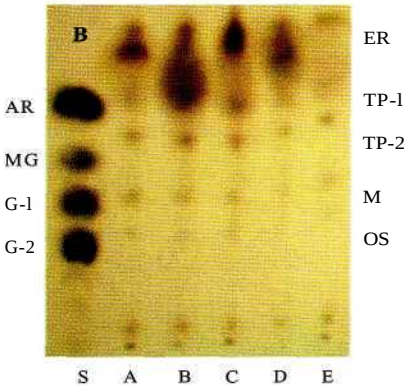
Keterangan : *), noda tidak terpisah; ±), intensitas noda tidak jelas/samar-samar

(B) dan kunir putih (C) dengan nilai Rf untuk masing-masing ekstrak adalah 0,76 dan 0,75. Nilai Rf kedua produk tersebut mendekati Rf standar arbutin, yaitu 0,75. Intensitas noda yang yang terbentuk pada campuran reaksi mengandung ekstrak temu putih lebih besar dan lebih jelas daripada ekstrak kunir putih, sehingga untuk mensintesis flavonoid-glikosida yang selanjutnya digunakan adalah ekstrak temu putih.

Hasil yang diperoleh dari Tabel 1-3, menyimpulkan bahwa biakan RB-1 dapat digunakan sebagai biakan unggul yang dapat digunakan untuk mensintesis produk transfer dari substrat tepung terigu dan akseptor flavonoid yang berasal dari ekstrak temu-temuan.

Uji Aktivitas Hidrolitik
Optimasi pH dan suhu aktivitas CGT-ase

Pengujian aktivitas hidrolitik dilakukan dengan menggunakan pati sebagai sustrat. Kemampuan enzim dalam menghidrolisis pati diuji dengan menambahkan KI dan I₂ sehingga terbentuk larutan berwarna biru.

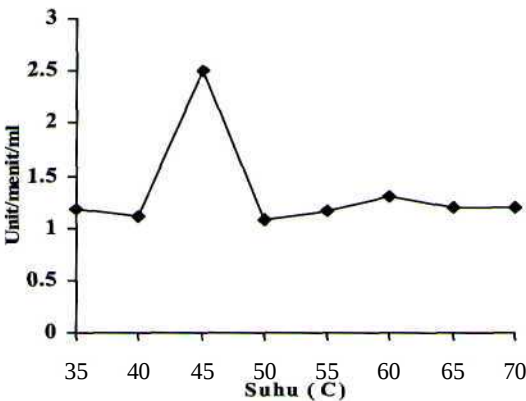


Gambar 3. Kromatogram hasil uji aktivitas transfer RBI dengan substrat tepung terigu pada berbagai akseptor ekstrak temu-temuan. A: temu kunci; B: temu putih; C: kunir putih; D: jahe, E: kencur.

Intensitas warna biru yang dihasilkan sebanding dengan banyaknya pati yang tidak terhidrolisis, sebaliknya semakin banyak pati yang terhidrolisis intensitas warna biru akan semakin memudar.

Penentuan kondisi optimum aktivitas enzim CGT-ase meliputi optimasi suhu dan pH yang dilakukan dengan menguji aktivitas hidrolitiknya. Aktivitas hidrolitik

tertinggi merupakan kondisi optimum bagi aktivitas enzim pada suhu dan pH tertentu. Pada penentuan pH optimum aktivitas CGT-ase yang dihasilkan dari mikroba RB1, enzim CGT-ase diinkubasi pada suhu 45 °C dalam larutan bufer fosfat pada berbagai kisaran pH, menunjukkan bahwa CGT-ase dari RB1 memiliki aktivitas tertinggi pada pH 6, sebesar 2,40 unit/menit/ml (Gambar 4). Adapun pada penentuan suhu optimum (Gambar 5), menunjukkan bahwa CGT-ase dari RB 1 mempunyai aktivitas tertinggi setelah diinkubasi pada suhu 45 °C yaitu sebesar 2,50 unit/menit/ml.

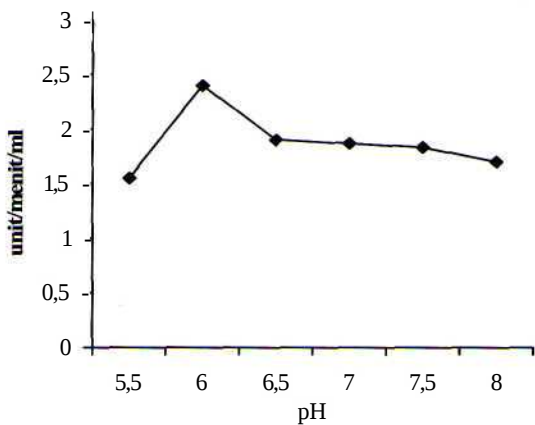


Gambar 4. Optimasi suhu produksi enzim CGT-ase dari biakan RB 1.

Sintesis dan Pemurnian Flavonoid-glikosida

Hasil penelitian menunjukkan bahwa CGT-ase dari RB 1 (*Bacillus licheniformis*) mampu mentransfer gugus glukosil dengan tepung terigu sebagai donor dan ekstrak kasar temu putih (*Curcuma zedaria*) sebagai akseptor dalam sistim reaksi dua lapisan yaitu lapisan 1-heksanol dan lapisan bufer fosfat pH 6 pada suhu 45 °C.

Produk transfer flavonoid-glikosida hasil sintesis enzimatik tersebut berada dalam kondisi yang belum murni, yaitu mengandung flavanoid bebas dan



Gambar 5. Optimasi pH produksi enzim CGT-ase dari biakan RB1

Tabel 3. Nilai Rf biakan RB-1 hasil reaksi transglikosilasi enzim CGTase pada substrat tepung terigu dan ekstrak temu-temuan.

Standar /Isolat	Akseptor / Ekstrak	Nilai Rf	Senyawa	Intensitas
Standar	-	0,75	Arbutin	+++
		0,63	Metil-a-glukosida	+++
		0,51	Glukosa	+++
		0,38	Maltosa	+++
RB-1	Temu Putih	0,80	Flavonoid aglikon	++
		0,75	Flavonoid-a-glikosida	+++
		0,73	Flavonoid-a-glikobiosida	++
		0,50	Monosakharida	+
	Jahe	0,79	Flavonoid aglikon	+++
		0,74	Flavonoid-a-glikosida	++
		0,73	Flavonoid-a-glikobiosida	++
		0,50	Monosakharida	++
	Temu Kunci	0,80	Flavonoid aglikon	++
		0,70	Flavonoid-a-glikobiosida	+
		0,50	Monosakharida	+
	Kunir Putih	0,81	Flavonoid aglikon	+++
		0,69	Flavonoid-a-glikosida	+
		0,50	Flavonoid-a-glikotriosida	±
	Kencur	*	Monosakharida	±
		0,80	Flavonoid aglikon	+
		0,68	Flavonoid-a-glikobiosida	±
		0,51	Monosakharida	±

produk hasil hidrolisis pati. Tahap selanjutnya untuk mendapatkan produk transfer yang murni adalah dengan melewati campuran produk pada kolom kromatografi berisi matriks ODS (Okta Desil Silika).

Prinsip pemisahan berdasarkan pada perbedaan kepolaran dan kelarutan senyawa yang akan dipisahkan. Matriks ODS yang bersifat nonpolar digunakan sebagai fase diam maka sebagai fase geraknya digunakan pelarut organik yang bersifat polar, yaitu metanol yang akan mengelusi sampel berdasarkan gradien konsentrasi (10-80 % dalam asam format 1 %). Senyawa yang lebih polar dari sampel akan keluar lebih dahulu dibawa oleh fase gerak, sedangkan yang kurang polar akan tertahan oleh fase diam(Tabel4).

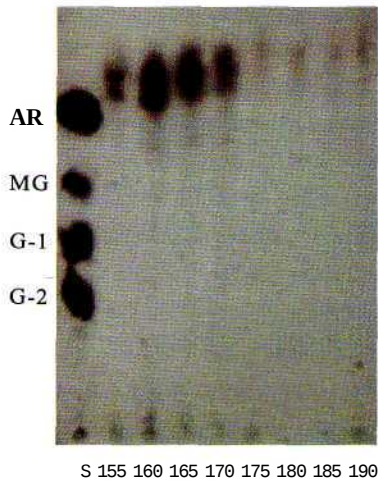
Pada kromatografi hasil pemurnian produk transfer (Gambar 6), dapat terlihat bahwa fraksi nomor 155-170 merupakan produk transfer yang telah murni dengan nilai Rf mendekati nilai Rf standar arbutin yaitu 0,76 untuk produk transfer dan 0,75 untuk standar arbutin (Tabel 4). Fraksi dengan Rf sama kemudian digabung dan dipekatkan, lalu produk transfer yang telah pekat di KLT kembali. Nilai Rf hasil pemekatan produk transfer dapat dilihat pada Tabel 5.

Penentuan konsentrasi produk transfer yang diperoleh dilakukan dengan metode Dubois *et al.*, 195 6 dengan menggunakan standar arbutin. Konsentrasi produk transfer didapat sebesar 1,3445 g/L.

Selanjutnya produk transfer ini digunakan untuk uji antimikrob.

Uji AktMtas Antimikrob

Pengujian aktivitas antimikrob flavonoid-glikosida dilakukan pada empat mikrob uji *yaitu* *Bacillus subtilis*, *Sacharomices cerevisiae*, *Escherichia coli* dan *Candida tropicallis*. Zona bening yang terbentuk di sekitar kertas saring pada konsentrasi tertentu, menunjukkan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan mikrob uji. Semakin besar zona bening yang terbentuk, maka aktivitasnya sebagai antimikrob



Gambar 6. Kromatogram hasil pemurnian flavonoid-glikosida menggunakan kromatografi kolom. S: standar; 155-190: nomor fraksi.

Tabel 4. Nilai Rf hasil pemurnian produk transfer

Substrat/ Akseptor	Standar / Isolat	Nilai Rf	Senyawa	Intensitas
-	Standar	0,75	Arbutin	+++
		0,63	Metil-a-glukosida	+++
		0,51	Glukosa	+++
		0,38	Maltosa	+++
Tepung Terigu/ Temu putih BiakRB-1	155	0,76	Flavonoid-a-glikosida	+++
		0,50	Monosakharida	±
	160	0,76	Flavonoid-a-glikosida	+++
		0,50	Monosakharida	±
	165	0,77	Flavonoid-a-glikosida	+++
		0,50	Monosakharida	±
	170	0,77	Flavonoid-a-glikosida	+++
		0,50	Monosakharida	±
	175	0,80	Flavonoid aglikon	++
	180	0,83	Flavonoid aglikon	++
	185	0,83	Flavonoid aglikon	++
	190	0,85	Flavonoid aglikon	++

Tabel 5. Hasil pemurnian produk (flavonoid-glikosida) dari ekstrak temu putih.

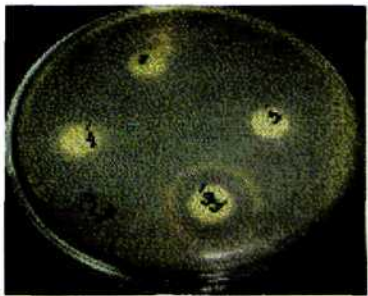
Substrat/Akseptor	Standar / Isolat	Nilai Rf	Senyawa	Intensitas
-	Standar	0,75	Arbutin	+++
		0,63	Metil-a-glukosida	+++
		0,51	Glukosa	+++
		0,38	M altosa	+++
Tepung Terigu / Temu putih Biak RB-1	Fraksi A	0,76	Flavonoid-a-glikosida	+++
		0,50	M onosakharida	±
	Fraksi B	0,76	Flavonoid-a-glikosida	+++
		0,51	M onosakharida	±
	Fraksi C	0,70	Flavonoid-a-glikosida	+++
		0,50	M onosakharida	±

semakinbaik.

Aktivitas penghambatan flavonoid-glikosida terhadap pertumbuhan mikrob uji dibandingkan dengan flavonoid dan arbutin. Arbutin digunakan sebagai pembanding karena senyawa glikosida ini telah diketahui memiliki aktivitas antimikrob, sedangkan penggunaan flavonoid adalah untuk melihat apakah bentuk glikosidanya (flavonoid-glikosida) mempunyai daya penghambatan yang lebih baik atau sebaliknya.

Berdasarkan hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 6, menunjukkan bahwa flavonoid-glikosida, flavonoid dan arbutin tidak mempunyai daya hambat terhadap *C. tropicallis*, dan hanya flavonoid-glikosida yang mampu menghambat pertumbuhan ketiga mikrob uji lainnya, yaitu *B. subtilis*, *E. coli* dan *S. cerevisiae*.

Hasil uji aktivitas flavonoid-glikosida pada beberapa konsentrasi yang (Gambar 7 dan Tabel 6)



Gambar7. Uji penghambatan flavonoid-glikosida terhadap pertumbuhan mikrob uji.

menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi flavonoid-glikosida dan lamanya waktu inkubasi berpengaruh terhadap daya penghambatan.

PEMBAHASAN

Produksi Enzim CGT-ase

Tujuan penambahan pati pada media produksi adalah sebagai penginduksi agar enzim yang dihasilkan mempunyai aktivitas hidrolitik maupun transglikosilasi substrat terhadap pati, sehingga diharapkan pada kondisi tersebut enzim CGT-ase dapat diproduksi secara optimal. CGT-ase (1,4- α -D-glukopiranosil transferase siklik, EC 2.4.1.19) adalah enzim yang mampu mengubah pati dan substrat yang sesuai menjadi siklodekstrin (CD). CGT-ase dihasilkan dari berbagai macam bakteri seperti *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* dan *Bacillus ceureus*. Akhir-akhir ini siklodekstrin banyak digunakan dalam industri makanan, kimia, kosmetik, kesehatan, dan agrikultur (Tankova, 1998).

Larutan bufer yang digunakan untuk produksi enzim CGT-ase adalah bufer fosfat, karena fosfat merupakan satu-satunya komponen anorganik yang mempunyai sifat bufer pada kisaran pH normal, yaitu kisaran pH yang dapat mempertahankan keseimbangan fisiologi dari mikrob, selain fosfat juga tidak bersifat racun terhadap mikrob dan dapat menjadi sumber fosfat bagi mikrob.

Enzim yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar CGT-ase, karena diduga ada enzim lain yang dihasilkan dengan menggunakan penginduksi pati ini, seperti α -amilase. Kedua enzim ini yaitu CGT-ase dan α -amilase dapat dibedakan dengan melakukan uji aktivitas transfer (transglikosilasi) yang dihasilkan. Hal tersebut dapat dilakukan karena α -amilase hanya memiliki aktivitas hidrolitik, sedangkan CGT-ase selain memiliki aktivitas hidrolitik juga mempunyai aktivitas transglikosilasi, seperti yang telah

Tabel 6. Daya hambat arbutin, flavonoid-glikosida, dan flavonoid aglikon terhadap pertumbuhan biakan uji pada konsentrasi berbeda.

Biakan Uji	Arbutin (ppm)			Flavonoid (ppm)			Flavonoid Glikosida (ppm)		
	100	200	300	100	200	300	100	200	300
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
<i>Escherichia coli</i>	-	-	++	-	-	+	-	++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	+	-	-	-	-	++	+++
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ket. : -), tidak ada penghambatan; +), tingkat penghambatan rendah; ++) tingkat penghambatan sedang; +++) tingkat penghambatan tinggi.

dikemukakan oleh Kometani *et al.* (1996), bahwa CGT-ase memiliki aktivitas transglikosilasi, baik secara antarmolekuler (mentransfer gugus glukosil ke akseptor yang memiliki gugus -OH) maupun intramolekuler (mengubah pati menjadi siklodekstrin).

Uji Aktivitas Transfer

Pada reaksi transglikosilasi biasanya tidak hanya dihasilkan senyawa dalam bentuk glikosida, tetapi dihasilkan juga produk samping seperti polifenol-glukobiosida atau polifenol glukotriosida yang juga dapat dihidrolisis menjadi bentuk glikosida dengan menambahkan α -amiloglukosidase atau glukoamilase pada campuran reaksi, sehingga dapat meningkatkan rendeman produk transfer. Enzim ini merupakan salah satu enzim amilase yang bekerja dengan cara menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik dan α -1,6-glikosidik dari ujung nonpereduksi secara berurutan dengan membebaskan unit-unit glukosa. Adapun substrat unggul yang akan digunakan untuk menggantikan pati adalah tepung terigu. Hal ini dilihat dari nilai Rf, besar dan tebalnya noda yang dihasilkan pada kromatogram, di mana nilai Rf-nya mendekati nilai Rf standar arbutin. Semakin tebal intensitas noda maka semakin banyak produk transfer yang dihasilkan (Tabel 2).

Optimasi pH dan suhu aktivitas CGT-ase

Menurut Dwidjoseputro (1990) enzim dipengaruhi oleh pH, konsentrasi, suhu, substrat dan oleh hasil akhir. Pada penentuan pH optimum aktivitas CGT-ase yang dihasilkan dari mikroba RB1, enzim CGT-ase diinkubasi pada suhu 45°C dalam larutan bufer fosfat pada pH 6.0 sebesar 2,40 unit/menit/ml sesuai dengan pernyataan Mori *et al.* (1994) bahwa aktivitas CGT-ase akan stabil pada pH 6-10 serta suhu 50°C atau lebih rendah.

Sintesis dan Pemurnian Flavonoid-glikosida

Flavonoid di alam terdapat dalam bentuk flavonoid aglikon (flavonoid tanpa gula terikat) dan flavonoid dengan gula terikat). Flavonoid-glikosida merupakan senyawa yang relatif stabil (Hostettmann *et al.*, 1995) dan flavonoid-glikosida umumnya larut dalam air, sebaliknya flavonoid aglikon lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1998). Hal ini dikarenakan flavonoid memiliki kelarutan yang rendah dalam air serta tidak stabil terhadap pengaruh cahaya, oksidasi dan perubahan kimia (Kitao dan Sekine 1993).

Uji Aktivitas Antimikrob

Antimikrob adalah senyawa yang dihasilkan oleh mikroba, yang dalam jumlah tertentu mempunyai daya penghambatan terhadap aktivitas mikroba lain. Pengujian aktivitas antimikrob dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu metode gores, metode kertas saring/ metode cakram, dan metode sumur (Pelczar dan Chan, 1986).

Berdasarkan hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 6 menunjukkan bahwa flavonoid-glikosida, flavonoid dan arbutin tidak menunjukkan daya hambat terhadap *C. tropicallis*, namun flavonoid-glikosida menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan ketiga mikroba uji lainnya, yaitu *B. subtilis*, *E. coli* dan *S. cerevisiae*. Bila dibandingkan dengan bentuk glikosidanya flavonoid aglikon memiliki daya hambat yang lebih kecil terhadap keempat mikroba uji. Siswandono dan Soekardjo (1995), menyatakan bahwa pemasukan gugus alkil atau gugus aromatik ke dalam struktur senyawa fenolik pada umumnya akan meningkatkan aktivitas dan menurunkan toksisitasnya.

Mekanisme interaksi flavonoid-glikosida dengan sel mikroba kemungkinan karena terbentuknya

kompleks reseptor-glikosida melalui ikatan hidrogen, yang akan terurai setelah melewati membran sel. Penetrasi senyawa ke dalam membran sel akan menyebabkan terkoagulasinya protein dan membran sel, sehingga sel mengalami lisis (Siswandono dan Soekardjo 1995).

Hasil uji aktivitas antimikrob flavonoid-glikosida pada Gambar 8 dan Tabel 6 menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi flavonoid-glikosida dan lamanya waktu inkubasi berpengaruh terhadap daya hambat. Semakin besar konsentrasi yang digunakan, semakin besar pula daya hambatnya, sedangkan lamanya waktu inkubasi menyebabkan daya hambat semakin menurun. Hal tersebut karena terurainya ikatan hidrogen yang terbentuk antara akseptor dengan glikosida, sehingga aktivitasnya menurun.

KESIMPULAN

Flavonoid-glikosida dapat disintesis secara enzimatis menggunakan CGT-ase dari biakan *B. licheniformis* dalam larutan bufer fosfat pH 6 pada suhu 45°C selama 24 jam, dengan menggunakan akseptor dari ekstrak temu putih dan substrat tepung terigu.

Dari keempat mikrob uji yang digunakan yaitu *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *E. coli* dan *C. tropicalis*, flavonoid-glikosida menunjukkan daya penghambatan terhadap *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, dan *E. coli*. Sedangkan arbutin dan flavonoid-glikosida tidak mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan ketiga mikrob uji tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada Hany Hapsah atas bantuannya, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik dan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

Dubois M, K Giles, JK Hamilton, P Robers and F Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar. *J. Anal Chem* 28,350-356.
Dwidjoseputro. 1990. *Dasar-dasar Mikrobiologi* Ed. 2. Djambatan, Jakarta.

Funayama M, T Nishino, S Murao, S Takenishi and H Nakano. 1993. Enzymatic synthesis of (+) catechir, α -glucoside and its effect on tyrosinase activity. *J. Biosch Biotech Biochem* 57: 1666-1669.
Funayama M, H Arakawa, R Yamamoto, Nishino T, Shin T and S Murao. 1994. A new microorganism producing a glucosyl transfer enzyme to polyphenols. *J. Biosch Biotech Biochem* 58, 817-821.
Hostettmann K, M Hostettmann and A Marston. 1995. *Cara Kromatografi Preparatif. Penggunaan pada isolasi senyawa alam*. K Padmawinata (Penerjemah). Penerbit ITB, Bandung.
Kitao S and H Sekine. 1993. α -D-glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of α -arbutin. *J Biosch Biotech Biochem* 58, 38-42.
Kometani T, Y Terada, T Nishimura, H Takii and S Okada. 1994. Transglycosylation to hesperidin by Cyclodextrin glukano transferase from an alkalophilic *Bacillus* species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides. *J Biosch Biotech Biochem* 58,1990-1994.
Kometani T, Y Terada, T Nishimura, T Nakae, H Takii and S Okada. 1996. Acceptor specificity of cyclodextrin glukano transferase from an alkalophilic *Bacillus* species and synthesis of glucosyl rhamnose. *J. Biosch Biotech Biochem* 60,1176-1178.
Markham KR. 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavanoid*. K Padmawinata (Penerjemah). Penerbit ITB, Bandung.
Mori S, S Hirose, T Oya and S Kitahata. 1994. Purification and properties of cyclodextrin glukano transferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605. *JBiosci Biotech Biochem* 58, 1968-1972.
Pelczar MJ and ECS Chan 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. RS Hadiutomo (Penerjemah). UI-Press, Jakarta.
Siswandono dan B Soekardjo. 1995. *Kimia Medisinal*. Airlangga University Press, Surabaya.
Sulisty J dan YS Soeka. 1999. Bioproses enzimatis dan uji hayati aktivitas polifenol-glikosida sebagai senyawa antimikroba dan antiproliferasi. Dalam: Kosela dan WP Suwarsono (Penyunting). *Kimia Bahan Alam*. Prosiding Seminar Nasional. UI-UNESCO, Jakarta.
Suradikusumah E. 1989. *Kimia Tumbuhan*. PAU-IPB, Bogor.
Tankova A. 1998. Bacterial cyclodextrin glukano transferase. *J Enzyme Microb Technol* 22, 678-686.