

Kapasitas Antimutagen Polifenol Glikosida Hasil Reaksi Transglukosilasi Enzim CGTase *Bacillus polymyxa* D4

*The Antimutagen Capacity of Synthesized Polyphenol Glycoside through Transglycosylation by CGTase Enzyme of *Bacillus polymyxa* D4*

ACHMAD DINOTO* & JOKO SULISTYO

*Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Jalan Ir. H. Juanda No. 18, Bogor 16002*

Polyphenol glycoside was synthesized through enzymatic transglycosylation by cyclodextrin glucanotransferase [1,4- α -D-glucan 4- α -D-(1,4-glucano)-transferase] or CGTase (EC 2.4.1.19), of *Bacillus polymyxa* D4. Soluble starch and resorcinol were used as the substrat and the acceptor respectively. The transfer product was detected using thin layer chromatography as resorsinol glucoside. Purification of transfer product was carried out using column chromatography and resorsinol glucoside was collected in fraction of 20% methanol. The bioassay of mutagenesis was detected by formation of mutation induced by aflatoxin B₁ (1 μ g/ml) in *Salmonella typhimurium* TA98. The effect of antimutagenesis was evaluated using this culture on L-histidine deficiency medium containing resorcinol glucoside. Results show that resorcinol glucoside like arbutin and resorcinol can inhibit mutagenesis at concentration of 25 mM.

Key words: *Bacillus polymyxa* D4, CGTase, polyphenol glycoside, antimutagenesis

Telah diketahui bahwa banyak senyawa karsinogen merupakan mutagen, seperti nitrosamina, hidrokarbon polisiklik, toksin jamur, amina aromatik, nitrofur, dan antibiotik (adriamisin, daunomisin, mitomisin C). Senyawa kimia yang bersifat karsinogen terhadap manusia seperti β -naftilamina, benzidin, kondensat asap rokok, bis-klorometileter, aflatoksin B₁, vinil klorida, 4-aminobifenil juga merupakan mutagen. Karsinogen disebut sebagai mutagen apabila dapat menyebabkan kanker oleh mutasi somatik (Ames *et al.* 1975). Sebagian besar karsinogen seperti aflatoksin B₁ diketahui sebagai mutagen *frameshift* yang sangat reaktif (McCann *et al.* 1975).

Pencarian senyawa baru untuk menghambat kerja mutagen perlu dilakukan. Sejauh ini ada beberapa senyawa yang digunakan sebagai agens antimutagenesis seperti polifenol yang terkandung dalam teh hijau. Pemberian ekstrak polifenol dari teh hijau mampu menghambat karsinogenesis hidrokarbon aromatik polisiklik pada kulit tikus (Wang *et al.* 1992). Kandungan teh hijau sekurangnya terdiri atas 10% sampai 20% polifenol. Senyawa ini mampu berperan sebagai antioksidan dan inhibitor hepatokarsinogenesis yang diinduksi oleh aflatoksin B₁. Komponen polifenol utama pada teh hijau yang telah diketahui sebagai antimutagen yaitu (-)-*Epigallocatechin gallate* (EGCG) (Chung *et al.* 1992).

Penggunaan senyawa polifenol dalam bentuk polifenol glikosida telah banyak dimanfaatkan sebagai agens hayati yang efektif dalam berbagai proses biologi. Senyawa glikosida dapat disintesis melalui penerapan reaksi transfer oleh enzim CGTase menggunakan akseptor polifenol. Polifenol dapat digunakan sebagai akseptor sebab tidak bersifat menghambat enzim CGTase (Masataka *et al.* 1994).

Penelitian ini bertujuan mensintesis senyawa polifenol glikosida melalui reaksi transglukosilasi oleh enzim CGTase *Bacillus polymyxa* D4. Uji hayati dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap senyawa mutagen.

BAHENDAN METODE

Bahan. *Bacillus polymyxa* D4 berasal dari makanan fermentasi dan merupakan koleksi dari Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI Bogor. Biakan yang digunakan dalam uji mutagenesis ialah *Salmonella typhimurium* TA98. Bahan mutagen yang digunakan ialah campuran aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ (Sigma) dengan konsentrasi aflatoksin B₁ sebesar 5 μ g/ml. Bahan antimutagen yang digunakan selain resorsinol glukosida dari reaksi transglukosilasi enzim CGTase *B. polymyxa* D4, juga arbutin (hidrokinon β -glukopiranosida) (Sigma) dan resorsinol (Merck).

Ekstraksi Enzim CGTase. Biakan *B. polymyxa* D4 diperbanyak pada media agar-agar nutrien (NA) dan diinkubasi pada suhu 27°C selama lima hari. Setelah itu biakan

* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-321038, Fax. +62-251-325854, E-mail: dinotos@hotmail.com

disuspensikan dengan 5 ml akuades steril. Selanjutnya suspensi biakan diinokulasikan pada media cair yang mengandung pati terlarut 2.0%, pepton 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $NaCl$ 0.05%, $MgSO_4$ 0.05%, $FeSO_4$ 0.001%, $ZnSO_4$ 0.0001%, $CuSO_4$ 0.0001%, dan $MnSO_4$ 0.0001% pada 10 mM bufer Na-fosfat pH 6.5 (Mori *et al.* 1994). Media produksi digoyang pada suhu 25°C selama lima hari, selanjutnya larutan disentrifugasi pada kecepatan 1 472.5 · g selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk digunakan sebagai sumber enzim kasar CGTase.

Pengujian Aktivitas Enzim CGTase. Pengujian aktivitas enzim CGTase menggunakan metode Funayama *et al.* (1993) yang dimodifikasi. Campuran reaksi mengandung 50 µl larutan enzim kasar CGTase dan 450 µl 10 mM bufer Na-fosfat pH 7.0 yang mengandung 0.5% pati terlarut, diinkubasikan pada suhu 45°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2.5 ml 0.5 N HCl. Setelah campuran reaksi diberi penambahan 0.005% larutan KI yang mengandung 0.005% I_2 , campuran dibiarkan bereaksi selama 20 menit. Selanjutnya masing-masing contoh diukur dengan alat spektrofotometer pada serapan λ 660 nm pada kondisi reaksi tertentu.

Pengujian Aktivitas Transglukosilasi. Sebanyak 2 ml campuran reaksi di dalam 1 ml 50 mM bufer Na-fosfat pH 7.0 mengandung 5% pati terlarut dan 2% derivat fenol (resorsinol), diinkubasikan pada suhu 45°C selama 24 jam. Setelah dipanaskan 100°C selama lima menit, campuran reaksi ditambahi enzim amiloglukosidase 0.005% w/v dan diinkubasi pada kondisi yang sama selama satu jam yang kemudian dipanaskan kembali. Pengujian aktivitas transglukosilasi dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (TLC) dengan eluen 1-propanol. Setelah plat TLC dikeringkan selama satu jam kemudian disemprot dengan pengembang warna larutan 20% H_2SO_4 dalam metanol, selanjutnya plat TLC tersebut dipanaskan pada suhu 150°C selama 5-10 menit (Sulistyo *et al.* 1998).

Isolasi Polifenol Glikosida. Campuran reaksi yang mengandung pati terlarut 5 g, resorsinol 3 g di dalam 50 ml bufer Na-fosfat 50 mM pH 7.0 diinkubasikan dengan 50 ml larutan enzim CGTase pada suhu 45°C selama 24 jam. Produk transfer yang terbentuk dalam reaksi transglukosilasi selanjutnya dipisahkan dengan kolom yang mengandung matriks C18-ODS Wakosil 25 (2.5 x 25 cm) dengan cara elusi menggunakan asam format 0.1% dan metanol bertingkat (0-80%). Kandungan gula total dalam fraksi-fraksi yang telah dipisahkan, dianalisis menggunakan metode Dubois *et al.* (1956) dengan pereaksi fenol 5% dan asam sulfat pekat yang diukur serapannya pada λ 480 nm. Setiap fraksi contoh dianalisis dengan TLC menggunakan eluen 1-propanol dan pengembang warna larutan 20% H_2SO_4 dalam metanol.

Persiapan Mutagen dan Biakan Uji Antimutagenesis. Aflatoksin dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dan selanjutnya dibuat pada beberapa konsentrasi. Pada uji mutagenesis, biakan *Salmonella typhimurium* TA98 ditumbuhkan dan dipelihara dalam keadaan tanpa cahaya pada media NA.

Pengujian Antimutagenesis. Pengujian mutagenesis menggunakan metode Ames *et al.* (1975) yang dimodifikasi. Media *top agar* hangat (45°C) sebanyak 2 ml ($NaCl$ 0.5%, agar-agar 0.65%, 0.5 mM L-histidin) ditambahi mutagen (aflatoksin B_1) 1 µg/ml sebanyak 0.1 ml serta antimutagen sebanyak 0.1 ml menggunakan pipet steril. Biakan *S. typhimurium* TA98 dalam media *nutrient broth* (NB) umur 15 jam diencerkan sampai tingkat pengenceran 10^{-7} . Sebanyak 0.1 ml biakan uji dicampur ke dalam media *top agar* kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar-agar E-minimal (agar-agar 1.5%, glukosa 2.0% dalam larutan (pengenceran 50x) yang terdiri atas $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 g, asam sitrat 100 g, K_2HPO_4 500 g, $NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$ 175 g, akuades 670 ml). Kultur diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C dan dihitung jumlah koloninya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Aktivitas Enzim CGTase. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas enzim CGTase *B. polymyxa* D4 sebesar 205.04 U/ml. Enzim CGTase dari biakan ini cukup besar bila dibandingkan dengan biakan *B. subtilis* JI-2 (21.48 U/ml) dan *B. megaterium* JII-2 (34.87 U/ml) (Sulistyo & Soeka 1999) yang juga digunakan dalam reaksi transglukosilasi.

Hasil Pengujian Reaksi Transglukosilasi. Hasil analisis dengan TLC menunjukkan bahwa enzim CGTase *B. polymyxa* D4 mentransferkan glikosil hasil hidrolisis pada aseptor resorsinol. Reaksi transglukosilasi dapat diartikan sebagai reaksi pemindahan unit gula ke aseptor yang mempunyai gugus -OH. Pada penelitian ini digunakan aseptor dari senyawa polifenol karena senyawa ini cenderung larut dalam air dan sering bergabung dengan gugus gula (Surahadikusumah 1989), juga mempunyai gugus -OH yang merupakan syarat bagi suatu senyawa yang berfungsi sebagai aseptor. Selain itu senyawa ini tidak bersifat sebagai substrat analog bagi substrat enzim yang dapat menghambat aktivitas enzim CGTase.

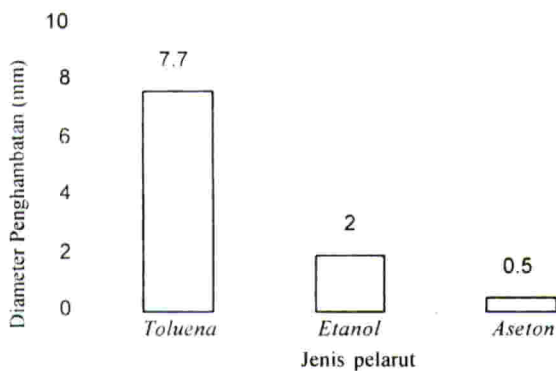
Nilai Rf spot produk transfer hasil sintesis enzim CGTase yaitu resorsinol glukosida (0.79) dan resorsinol glukobiosida (0.73) mendekati nilai Rf spot standar arbutin (0.81) (Gambar 1). Nilai Rf produk ditentukan berdasarkan perbandingan antara jarak spot produk yang terbentuk dibagi dengan jarak pelarut yang digunakan. Produk transfer dapat diisolasi pada fraksi metanol 20% selanjutnya digunakan sebagai antimutagen dalam uji antimutagenesis aflatoksin B_1 .

Pelarut Mutagen. Beberapa pelarut digunakan dalam melarutkan aflatoksin B_1 yaitu toluena, etanol, dan aseton. Dari ketiga pelarut tersebut diketahui yang mempunyai penghambatan terkecil terhadap biakan uji pada media NA ialah aseton yaitu sebesar 0.5 mm (Gambar 2). Selanjutnya aseton digunakan sebagai pelarut aflatoksin B_1 dalam uji antimutagenesis.

Mutagenesis dan Penghambatannya oleh Antimutagen. Pada media agar-agar E-minimal yang diberi mutagen menunjukkan adanya pertumbuhan koloni isolat uji dengan



Gambar 1. Kromatogram TLC produk transglukosilasi dengan donor pati dan aseptor resorsinol, maltosa, glukosa, metil- α -glukosida, dan arbutin (S); Maltosa (M); Glukosa (G); Metil- α -glukosida (MG); Arbutin (A); Resorsinol glukosida (R1); Resorsinol glukobiosida (R2). Eluen yang digunakan 1-propanol dan pengembang warna 20% H_2SO_4 dalam metanol.



Gambar 2. Pengaruh pelarut mutagen terhadap pertumbuhan biakan uji *Salmonella typhymurium* TA98 pada media agar-agar nutrisi (NA) menggunakan kertas cakram.

jumlah 310 koloni, sedangkan pada media yang tidak diberi mutagen dijumpai sebanyak 56 koloni (Tabel 1). Pertumbuhan ini merupakan indikasi bahwa isolat telah mengalami mutasi. Koloni yang dijumpai pada media tanpa mutagen menunjukkan bahwa mutasi dapat terjadi walaupun tanpa diinduksi oleh mutagen aflatoksin B_1 . Menurut Eisenstadt *et al.* (1994) mutasi dapat terjadi secara spontan meskipun peluangnya sangat kecil yaitu 10^{-10} sampai 10^{-6} .

Pada penelitian ini senyawa resorsinol glukosida hasil transglukosilasi enzim CGTase *B. polymyxa* D4, arbutin (hidrokinon β -glukopiranosida), dan resorsinol diujikan sebagai senyawa antimutagenesis pada biakan *S. typhymurium* TA98 yang diinduksi dengan aflatoksin $1 \mu\text{g/ml}$. Nakahara dan Trakoontivakorn (1998) melaporkan bahwa *S. typhymurium* TA98 merupakan mutan bakteri *Salmonella* yang membutuhkan histidin untuk pertumbuhannya (*his*⁻). Mutagen yang diberikan pada biakan menginduksi terjadinya mutasi dan menghasilkan galur liar revertant (*his*⁺) yang mampu tumbuh pada media

berkadar histidin rendah. Apabila ada senyawa yang mampu menghambat kerja mutagen maka jumlah koloni yang mengalami mutasi berkurang.

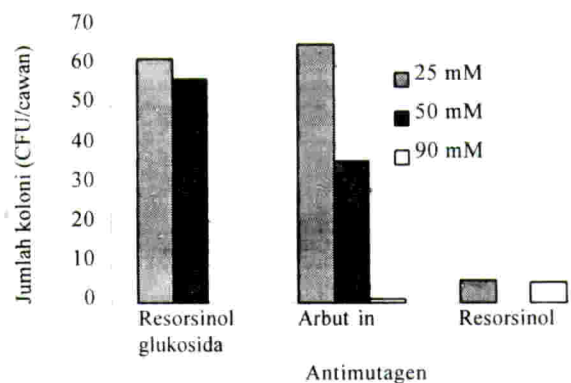
Hasil pengujian antimutagenesis menggunakan antimutagen resorsinol glukosida hasil transglukosilasi, arbutin, dan resorsinol dapat dilihat pada Gambar 3. Pada dasarnya ketiga macam senyawa tersebut mampu menekan terjadinya mutasi yang ditunjukkan dengan sedikitnya pertumbuhan *S. typhymurium* TA98 pada media agar-agar E-minimal.

Resorsinol glukosida mampu menghambat terjadinya mutasi dengan pertumbuhan biakan uji sebanyak 62 koloni pada konsentrasi 25 mM dan 57 koloni pada konsentrasi 50 mM. Hal ini sangat jelas jika dibandingkan dengan perlakuan tanpa mutagen (kontrol) yang menunjukkan koloni sebanyak 310 koloni. Pada kontrol, biakan uji *S. typhymurium* TA98 mengalami mutasi dari keterbatasan menggunakan nutrisi sampai mampu tumbuh baik pada media dengan kandungan L-histidin yang rendah, sebaliknya resorsinol glikosida menunjukkan karakteristiknya sebagai antimutagen yang menghambat terjadinya mutasi. Penggunaan arbutin sebagai polifenol glikosida komersial diketahui menghambat mutagenesis yang ditunjukkan dengan pertumbuhan koloni sebanyak 66, 36, dan 1 pada konsentrasi 25 mM, 50 mM, dan 90 mM secara berurutan. Sementara resorsinol juga menunjukkan aktivitas penghambatan mutagenesis, bahkan lebih besar dibandingkan dengan senyawa polifenol glikosida dengan jumlah koloni 6 dan 5 pada konsentrasi 25 mM dan 90 mM secara berurutan. Bagaimanapun senyawa tersebut di atas berperan dalam reaksi penghambatan kerja mutagen dan mekanisme penghambatannya saat ini masih dalam penelitian.

Berdasarkan hasil tersebut di atas diketahui bahwa resorsinol glukosida hasil transglukosilasi enzim CGTase *B. polymyxa* D4 menggunakan substrat pati dan aseptor

Tabel 1. Pengaruh mutasi spontan dan induksi oleh aflatoksin B_1 terhadap jumlah koloni *Salmonella typhymurium* TA98.

Mutasi	Jumlah koloni (CFU) per petri
Mutasi diinduksi aflatoksin B_1	310
Mutasi spontan	56



Gambar 3. Efek penghambatan dari produk hasil transglukosilasi CGTase *Bacillus polymyxa* D4 (resorsinol glukosida), arbutin, dan resorsinol terhadap mutagenesis *Salmonella typhymurium* TA98 yang diinduksi oleh aflatoksin B_1 ($1 \mu\text{g/l}$).

resorsinol, mempunyai potensi sebagai antimutagenesis dengan menekan terjadinya mutasi yang diinduksi oleh aflatoksin B₁ (1 µg/ml) sampai pada konsentrasi 25 mM.

DAFTAR PUSTAKA

- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogen and mutagen with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 31:347-364.
- Chung F, Xu Y, Ho C, Desai D, Han C. 1992. Protection against tobacco-specific, nitrosamine-induced lung tumorigenesis by green tea and its components. Di dalam: Huang M, Ho C, Lee CY (ed). *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health II*. Washington, DC: American Chemical Society. hlm. 300-307.
- Dubois M, Giles K, Hamilton JK, Robertsand P, Smith F. 1956. Colometric method for determination of sugar. *Anal Chem* 28:359-356.
- Eisenstadt E, Carlton BC, Brown BJ. 1994. Gene Mutation. Di dalam: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Kried NR (ed). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology. hlm. 297-316.
- Funayama M, Nishino T, Hirota A, Murao S, Takenishi S, Nakano H. 1993. Enzymatic synthesis of (+) catechin-a-glukoside and its effect on tyrosinase activity. *J Biosci Biotech Biochem* 57:1666-1669.
- Masataka F, Arakawa H, Yamamoto R, Nishino T, Shin T. 1994. A new microorganism producing a glucosyl transfer enzyme to polyphenol. *J Biosci Biotech Biochem* 5:817-821.
- McCann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames BN. 1975. Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc Nat Acad Sci USA* 72:979-983.
- Mori S, Hirose S, Oya T, Kitahata S. 1994. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. no. 9605. *J Biosci Biotech Biochem* 58:1968-1972.
- Nakahara K, Trakoontivakom G. 1998. Antioxidant and antimutagenic properties of some edible Thai plants. *Jircas Newslet* 17:5-5.
- Sulistyo J, Soeka YS. 1999. Bioproses enzimatis polifenol glikosida sebagai senyawa penghambat pertumbuhan bakteri. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam*. Depok, 16-17 Nopember 1999. UI, UNESCO.
- Sulistyo J, Soeka YS, Karim A. 1998. Sintesis polifenol glikosida oleh CGTase secara reaksi transglikosilasi. *J Biol Indon* 2:150-161.
- Surahadikusumah E. 1989. *Kimia Tumbuhan*. Bogor: PAU Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor.
- Wang ZY, Hong J, Huang M, Conney AH, Yang CS. 1992. Inhibition of nitrosamine-induced tumorigenesis by green tea and black tea. Di dalam: Huang M, Ho C, Lee CY (ed). *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health II*. Washington, DC: American Chemical Society. hlm. 292-299.