

Ind. J. Chem. Res., 2015, 2, 176 - 181

KINETIC PARAMETERS DETERMINATION OF GLUCOAMYLASE ON HYDROLYSIS REACTION OF SAGOO STARCH (*Metroxylon sp*)

Penentuan Parameter Kinetika Glukoamilase pada Reaksi Hidrolisis Pati Sagu (*Metroxylon Sp.*)

Adriani Bandjar^{1,*}, Matheis F.J.D.P. Tanasale¹, Maher Syalal Luhukay¹

¹Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Pattimura University, Kampus Poka, Jl. Ir. M. Putuhena, Ambon 97134

*Corresponding author, e-mail: abandjar@fmipa.unpatti.ac.id

Received: October 2014 Published: January 2015

ABSTRACT

Sagoo plant (*Metroxylon sp.*) numerous in eastern Indonesia, such as Maluku and Papua. Sagoo starch containing amylose and amylopectin. Sagoo starch hydrolysis can be carried out by enzymes, such as glucoamylase or often called amiloglukosidase or α -1,4-glukanoglukohidrolase, an extracellular enzyme capable hydrolyzes α -1,4 on amylose and α -1,6 in amylopectin. The enzymatic hydrolysis of starch can be reviewed in the kinetics of the Michaelis-Menten equation and Lineweaver-Burk equation. The aims of this study to determine the kinetic parameters (V_{max} and K_m) of glucoamylase on hydrolysis of sagoo starch. Glucoamylase has an optimum temperature of 50 oC and pH optimum 6.5. At optimum conditions, based on Michaelis-Menten equation, the value of V_{max} is 1.09 U / mL / min and K_m value is 0.82. Based on Lineweaver-Burk equation, the value of V_{max} was 1.03 U / mL / min and K_m value was 0.84%.

Keywords: *Glucoamylase, hydrolysis, sago starch.*

PENDAHULUAN

Bioetanol dapat diproduksi dari tumbuhan penghasil pati, seperti ubi kayu, kentang, sagu, dan lain-lain. Tanaman sagu (*Metroxylon sp.*) jika dikelola dengan baik dapat menghasilkan 25 ton pati kering/ha/tahun. Produktifitas ini setara dengan tebu, namun lebih tinggi dibandingkan dengan ubi kayu dan kentang dengan produktifitas pati kering 10-15 ton/ha/tahun (Sumaryono, 2007).

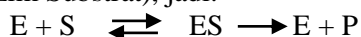
Tanaman sagu (*Metroxylon sp.*) banyak terdapat pada Indonesia bagian timur, seperti Maluku dan Papua. Luas areal tanaman sagu di Maluku mencapai 31.360 ha yang tersebar di tujuh kabupaten. Berdasarkan peta zona agroekologi Maluku skala 1:250.00, luas areal sagu masih dapat dikembangkan hingga 649.983 ha (Bustaman, 2008).

Pengolahan pati sagu menjadi bioetanol dapat dilakukan melalui dua tahap, yaitu tahap hidrolisis dan tahap fermentasi. Pati dapat dihidrolisis menjadi glukosa dalam suasana asam. Asam yang biasa digunakan biasanya asam klorida. Proses ini kurang menguntungkan karena menghasilkan produk yang tidak ramah lingkungan dan membutuhkan biaya yang besar. Enzim adalah pilihan utama yang digunakan untuk proses hidrolisis pati. Penggunaan enzim memberi keuntungan antara lain produk lebih murni, lebih mudah dan tanpa produk-produk sampingan yang berbahaya. Salah satu enzim yang berperan dalam menghidrolisis pati menjadi glukosa adalah enzim amilase, terutama α -amilase dan glukoamilase (Melliawati dkk, 2006)

Enzim glukoamilase atau sering disebut amiloglukosidase atau α -1,4-glukanoglukohidrolase merupakan enzim

ekstraseluler yang mampu menghidrolisis ikatan α -1,4 pada rantai amilosa, amilopektin, likogen, dan pullulan. Enzim glukoamilase juga dapat menyerang ikatan α -1,6 pada titik percabangan, walaupun dengan laju yang lebih rendah. Hal ini berarti bahwa pati dapat diuraikan secara sempurna menjadi glukosa (Melliawati dkk, 2006).

Proses hidrolisis pati secara enzimatik dapat ditinjau secara kinetika. Dalam reaksi enzim dikenal reaksi hidrolisis, penguraian, atau reaksi katalisis lain yang disebut *Velocity* atau disingkat *V*. Harga *V* dari suatu reaksi enzimatik pada umumnya sangat tergantung pada konsentrasi substrat. Pada konsentrasi enzim tetap (tertentu) harga *V* hampir linier dengan konsentrasi substrat [*S*] tetapi, pada konsentrasi substrat yang tinggi (berlebihan), kecepatan reaksi *V* akhirnya mencapai maksimum (V_{maks}). Untuk menerangkan hal ini, Leonor Michaelis dan Maud Menten mengajukan suatu model. Hal yang diajukan adalah bahwa dalam suatu reaksi enzim selalau terbentuk senyawa peralihan ES (Enzim Substrat), jadi:



Dari persamaan reaksi di atas Michaelis dan Menten mendefinisikan suatu tetapan, yang sekarang dinyatakan sebagai K_m , yang bermanfaat dalam menyatakan hubungan yang tepat diantara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik (Winarno, 1995).

Mandik dkk (2004), telah menghidrolisis pati sagu papua (*Metroxylon sagu* Rottbol) dengan menggunakan TermamylTM 120L (α -amilasi dari *Bacillus licheniformis*). Berdasarkan jumlah glukosa yang dihasilkan, TermamylTM 120L mempunyai K_m sebesar 2,36 % dan V_{maks} sebesar 50,8 % unit/mg.

Harga K_m ternyata sangat bervariasi, tergantung pada jenis substrat dan juga keadaan lingkungan seperti suhu dan pH (Winarno, 1995).

METODOLOGI

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: enzim glukoamilase, buffer asetat, buffer fosfat, reagen DNS, maltose monohydrate, pati sagu, dan aquades.

Alat

Alat yang digunakan antara lain: seperangkat alat gelas, hot plate, pH-meter, neraca analitik, pipet mikro, oven, dan spektrofotometer UV-VIS APEL PD-303 UV.

Prosedur Kerja

Penyiapan Sampel

Sebanyak 500 g pati sagu dicuci dengan 2 L aquades (lima kali pencucian dengan cara maserasi berpengadukan, masing-masing pencucian dilakukan selama 10 menit). Pati sagu basah dikeringkan dengan oven pada suhu 40 °C selama 24 jam. Sebanyak 1g pati kering dilarutkan dengan 50 mL buffer asetat 0,05 M pH 4,0 dalam keadaan mendidih, setelah itu volume ditepatkan menjadi 100 mL dengan penambahan buffer asetat mendidih, sehingga diperoleh larutan pati 1 % (b/v). Hal yang sama juga dilakukan untuk membuat substrat dengan pH: 4,5; 5,0; 5,5; sedangkan untuk pH: 6,0; 6,5; dan 7,0 digunakan buffer fosfat.

Penentuan pH Optimum

Ke dalam 7 tabung reaksi dimasukkan masing-masing 1 mL larutan substrat pati sagu dengan berbagai variasi pH yang telah dibuat dan 1 mL enzim, kemudian diinkubasi selama 3,5 menit pada suhu 30°C. Selanjutnya ditambahkan 2 mL DNS dan 20 mL akuades, kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansinya kemudian diplotkan pada kurva standar maltosa untuk penentuan konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan.

Penentuan Suhu Optimum

Ke dalam 7 tabung reaksi masing-masing dimasukkan 1 mL larutan substrat pada kondisi pH optimum dan 1 mL enzim, kemudian diinkubasi selama 3,5 menit pada suhu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, dan 60°C. Selanjutnya ditambahkan 2 mL DNS dan 20 mL aquades, kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansinya kemudian diplotkan pada kurva standar maltosa untuk penentuan konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan.

Hidrolisis Pati

Hidrolisis pati dilakukan pada pH dan suhu optimum dengan variasi konsentrasi 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %; 0,6 %; 0,9 %; 1,2 %; 1,5 %; 1,8 %; dan 2,2 % (b/v). Kemudian ditambahkan 1 mL enzim dan diinkubasi selama 3,5 menit pada suhu optimum. Selanjutnya ditambahkan 2 mL larutan DNS, kemudian diencerkan dengan penambahan 20 mL aquades. Serapan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansinya kemudian diplotkan pada kurva standar maltosa untuk penentuan konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan.

Unit aktivitas enzim glukoamilase dihitung berdasarkan gula pereduksi sebagai μmol maltosa yang dihasilkan per menit pada kondisi percobaan dengan persamaan:

$$AE = \frac{\text{ppm}}{\text{BMg} \times \text{MI}}$$

Keterangan:

AE = Unit Aktivitas enzim

(U/mL = $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{menit}$)

ppm = Maltosa yang dihasilkan (ppm)

BMg = Berat molekul maltosa (g/mol)

MI = Masa inkubasi (menit)

Penentuan nilai parameter kinetika berupa V_{maks} dan K_m berdasarkan persamaan Michaelis-Menten dan Lineweaver-Burk.

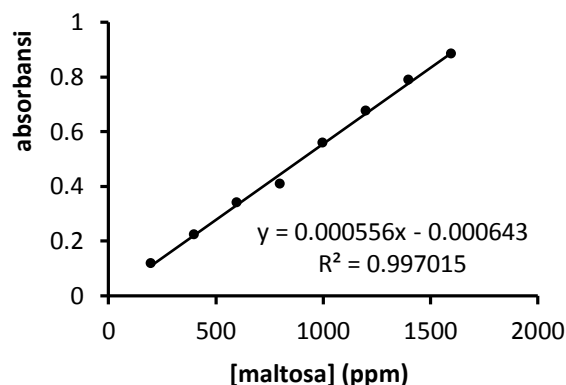
Pembuatan Kurva Standar Maltosa

Pembuatan kurva standar dilakukan dengan cara melarutkan 0,2 g maltosa dalam 100 mL aquades sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm. Larutan kemudian diencerkan dengan aquades sehingga diperoleh konsentrasi 0 (kontrol); 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, dan 1600 ppm. Selanjutnya masing-masing larutan ditambahkan 2 mL DNS, kemudian diencerkan sampai 10 mL. Serapan diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian dibuat hubungan absorbansi dengan mg maltosa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Standar Maltosa

Pembuatan kurva standar maltosa memberikan hasil seperti terlihat pada Gambar 1.

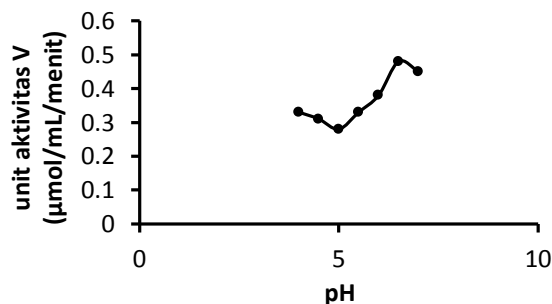


Gambar 1. Kurva standar maltosa

Kurva standar maltosa memberikan hasil yang baik dengan $R^2 = 99,7\%$ dan persamaan garis linear $y = 0.000556x - 0.000643$ untuk penentuan konsentrasi maltosa sebagai gula pereduksi pada tiap absorbansi yang diukur.

Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum menggunakan metode DNS menunjukkan kondisi optimum enzim glukoamilase dalam menghidrolisis pati sagu yaitu pada pH 6,5 dengan absorbansi 0,338 atau 0,48 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{menit}$ dan minimum pada pH 5 dengan absorbansi 0,192 atau 0,28 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{menit}$. Selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 2.



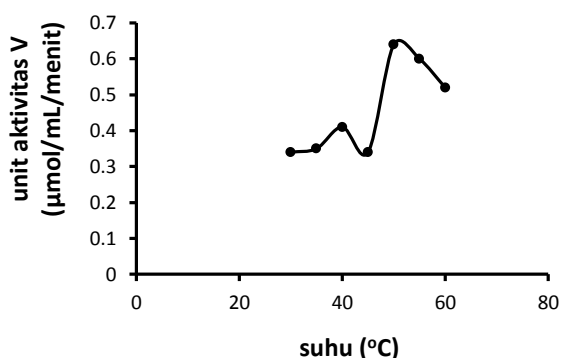
Gambar 2. Kurva penentuan pH optimum enzim glukoamilase dalam menghidrolisis pati sagu

Enzim glukoamilase dapat menghidrolisis pati sagu komersial secara optimal menjadi gula pereduksi pada substrat dengan pH 6,5 dengan unit aktivitas V sebesar 0,48 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{menit}$. Pada pH 4,0 – 5,0 terjadi penurunan aktifitas enzim sehingga gula pereduksi yang dihasilkan juga rendah dengan unit aktivitas V sebesar 0,33 – 0,28 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{menit}$. Pada pH 5,5 – 5,6 terjadi

peningkatan aktifitas dan mencapai maksimum pada pH 6,5 namun pada pH yang lebih tinggi aktifitasnya menjadi berkurang.

Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum menggunakan metode DNS menunjukkan kondisi optimum enzim glukoamilase dalam menghidrolisis pati sagu yaitu pada suhu 50 °C dengan absorbansi 0,244 atau 0,64 µmol/mL/menit dan minimum pada suhu 30 °C dengan absorbansi 0,118 atau 0,34 µmol/mL/menit. Selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva penentuan suhu optimum enzim glukoamilase dalam menghidrolisis pati sagu

Enzim glukoamilase yang digunakan memiliki suhu optimum 50 °C dengan aktivitas enzim sebesar 0,64 µmol/mL/menit. Pada kondisi suhu di bawah 50 °C aktivitas enzim pada umumnya stabil dan tidak terlalu terjadi peningkatan kemampuan katalitik enzim. Namun pada suhu di atas 50 °C, daya katalitik enzim menjadi berkurang, hal ini ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang menurun.

Hidrolisis pati yang dilakukan pada kondisi pH dan suhu optimum dengan variasi konsentrasi memberikan hasil seperti pada Tabel 1.

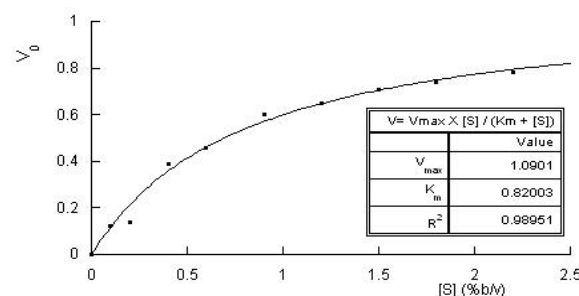
Persamaan Michaelis-Menten

Penentuan parameter kinetika dengan persamaan Michaelis-Menten dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat dalam hal ini pati sagu terhadap enzim. Pada persamaan Michaelis-Menten: $V_0 = \frac{V_{maks}[S]}{[S] + K_m}$ jika kecepatan

reaksi awal tepat sama dengan setengah kecepatan maksimum maka diperoleh $K_m = [S]$. Berdasarkan Persamaan diatas, jika kita memplotkan V_0 pada sumbu y dan $[S]$ pada sumbu x, dan dengan menggunakan program kaleidagraph 3.6 didapat V_{max} sebesar 1,0901 µmol/mL/menit dan k_m sebesar 0,82%, dengan $R^2 = 0,98$. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 1. Hidrolisis pati oleh enzim glukoamilase pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi % (b/v)	Absorbansi	Gula pereduksi (ppm)	Unit aktivitas (µmol/mL/menit) (V)
0,1	0,082	148,715	0,12
0,2	0,095	172,108	0,14
0,4	0,272	490,617	0,39
0,6	0,320	576,992	0,46
0,9	0,423	762,339	0,60
1,2	0,454	818,123	0,65
1,5	0,502	904,498	0,71
1,8	0,518	933,290	0,74
2,2	0,584	987,275	0,78



Gambar 4. Kurva V₀ vs [S] berdasarkan persamaan Michaelis-Menten

Pada konsentrasi substrat yang amat rendah, kecepatan reaksi pun amat rendah, tetapi kecepatan ini akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, namun pada konsentrasi substrat yang lebih besar, kecepatan reaksi hanya akan meningkat sedemikian kecil. Kecepatan reaksi hanya akan mendekati, tetapi tidak akan pernah mencapai garis maksimum, sehingga sulit untuk menentukan V_{max} dengan tepat. V_{max} hanya diduga dan tidak pernah dapat diketahui nilai sebenarnya (Lehninger, 2000).

Tetapan Michaelis-Menten K_m didefinisikan sebagai $(k_2 + k_{-1})/k_1$. Jika $k_2 + k_{-1} \gg k_1$ maka nilai K_m lebih besar dari satu. Hal ini berarti kecepatan penguraian [ES] lebih besar dari pada kecepatan pembentukan [ES] (Lehninger, 1982), sehingga enzim mempunyai afinitas rendah terhadap substrat. Kesetimbangan menguntungkan [E] + [S], bukannya kompleks [ES] (Page, 1997).

Jika $k_2 + k_{-1} \ll k_1$ maka nilai K_m lebih kecil dari satu, ini menunjukkan kecepatan pembentukan [ES] lebih besar dari kecepatan penguraian [ES], sehingga enzim mempunyai afinitas yang tinggi terhadap substrat.

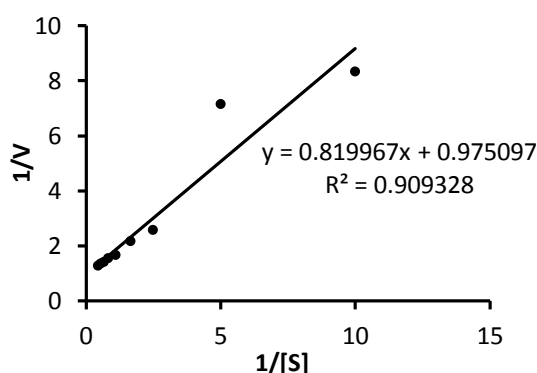
Berdasarkan hasil yang diperoleh, enzim glukoamilase memiliki afinitas yang cukup tinggi terhadap substrat karena nilai K_m lebih kecil dari satu yaitu 0,82 %.

Persamaan Lineweaver-Burk

Persamaan Lineweaver-Burk mentransformasikan persamaan Michaelis-Menten yang diturunkan secara sederhana

menjadi Persamaan 8: $\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$,

dan dengan memplotkan $1/V_0$ pada sumbu y dan $1/[S]$ pada sumbu x didapat kurva pada Gambar 5.



Gambar 5. Kurva 1/S vs 1/V berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk

Perpanjangan garis linier $y = 0,819967x + 0,975097$, akan memotong sumbu y dan sumbu x. Perpotongan terhadap sumbu y akan memberikan nilai $1/V_{maks} = 0,975097$ kemudian perpotongan terhadap sumbu x akan memberikan nilai $-1/K_m = -1,19$; sehingga

diperoleh $V_{maks} = 1,03 \mu\text{mol/mL/menit}$ dan nilai $K_m = 0,84 \%$ dengan $R^2 = 0,90$.

Berdasarkan nilai R^2 yang diperoleh, penentuan K_m menggunakan persamaan Michaelis-Menten secara non linier memberikan tingkat keamatan hubungan antara dua variabel atau lebih menunjukkan hasil yang lebih baik, yaitu 0,98 atau 98 % dibandingkan dengan persamaan Lineweaver-Burk yaitu 0,90 atau 90 %. Namun demikian nilai K_m dan V_{maks} yang ditentukan berdasarkan kedua persamaan tersebut tidak memberikan perbedaan yang signifikan. Hal ini berarti penentuan nilai K_m dan V_{maks} dapat dilakukan baik menggunakan persamaan Michaelis-Menten ataupun persamaan Lineweaver-Burk.

Jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Mandik dkk (2004), dalam menghidrolisis pati sagu, enzim glukoamilase memberikan nilai K_m yang lebih baik dari pada enzim α -amilase. Enzim α -amilase memberikan nilai K_m sebesar 2,36 % sedangkan enzim glukoamilase memberikan K_m sebesar 0,8 %. Sedangkan nilai V_{maks} enzim α -amilase dalam menghidrolisis pati sagu yang didapat oleh Mandik dkk (2004) sebesar 50,8 unit/mg tidak dapat dibandingkan dengan nilai V_{maks} enzim glukoamilase sebesar 1,0 U/mL/menit karena untuk penentuan nilai V_{maks} dengan satuan unit/mg harus dilakukan pengujian kadar protein, sedangkan dalam penelitian ini tidak dilakukan pengujian kadar protein.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. pH optimum enzim glukoamilase dalam menghidrolisis pati sagu komersial adalah 6,5.
2. Suhu optimum enzim glukoamilase dalam menghidrolisis pati sagu komersial adalah 50 °C.
3. Nilai K_m dan V_{maks} berdasarkan persamaan Michaelis-Menten dan Lineweaver-Burk berturut-turut adalah 0,82% dan 1,09 U/mL/menit, 0,84% dan 1,03 U/mL/menit.

DAFTAR PUSTAKA

Bustaman, S., 2008. Potensi Ulat Sagu dan Prospek Pemanfaatannya, *Litbang Pertanian*: 27 (50-54).

- Lehninger, L. A., 2000. *Dasar-dasar Biokimia*, Jilid 1, Penerjemah M. Thenawidjaja Suhartono, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Mandik, Y. I., Sindumarta, M., dan Natalia, D., 2004. Penentuan Parameter Kinetika Hidrolisis Pati Sagu Papua (*Metroxylon sagu* Rottbol) oleh α -Amilase, *Prosiding Seminar MIPA IV*: 368-371.
- Meliawati, R., Suherman, R. S., dan Subardjo, B., 2006, Pengkajian Kapang Endofit dari Taman Nasional Gunung Halimun Sebagai Penghasil Glukoamilase, *Berk. Penel. Hayati*: 12 (19-25).
- Page, D. S., 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*, edisi ke dua, Penerjemah Drs. R. Soendoro, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Sumaryono, 2007. Tanaman Sagu sebagai Sumber Energi Alternatif, *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian Vol. 29, No. 4*.
- Winarno, F. G., 1995. *Enzim Pangan*. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.