

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM AMILASE DARI AKAR RIMPANG ALANG-ALANG (*Imperata cylindrica*)

Mufti Mutia, Seniwati Dali, Rugaiyah Arfah, dan Firdaus Zenta
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Makassar

ABSTRACT

Amylase enzyme can be get from any source like plant, animal, and microorganism. Cogongrass is one of a plant which is growing liar and spreads in indonesia. Carbohydrate is the second biggest chemical component from rhizome of cogongrass. The purpose of this research is to isolate, characterization and immobilized of amylase enzyme from rhizome of cogongrass, therefore it will get new alternative enzyme of amylase. The examine of the activity of amylase enzyme was did by Nelson-somogyi, and the protein was measured by Lowry method. The comparison between unit activity of enzyme and concentration of total protein was specific activity. The result of research concluded that amylase enzyme could be isolated from rhizome of cogongrass with content of enzyme 1,36% (b/b) and the higher specific activity in that condition was F_4 (20 – 40 %), with activity of enzyme was 0,0156 Unit/mL and specific activity was 0,0006 U/mg. The characterization resulted the optimum condition of amylase enzyme from rhizome of cogongrass with substrate concentration of starch 3,0 mg/mL at temperature of 35 °C, incubation time of 60 minutes, and pH = 6.2, from that optimum condition was got enzyme activity 0,119 U/mL.

Keywords: Amylase; Cogongrass; Nelson-somogyi; Lowry.

PENDAHULUAN

Enzim dihasilkan oleh semua makhluk hidup untuk mengkatalisis reaksi biokimia dalam tubuh makhluk hidup tersebut sehingga reaksi-reaksi itu dapat berlangsung lebih cepat (Sianturi, 2008). Menurut Sutiamiharja (2008) kemampuan enzim yang unik dalam melaksanakan transformasi kimia yang khas dapat meningkatkan penggunaan enzim dalam berbagai proses industri. Salah satu enzim yang sangat dibutuhkan dalam industri adalah amilase (α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase atau glukamilase).

Enzim amilase memiliki aplikasi untuk skala yang sangat luas mulai dari industri tekstil, konversi pati untuk gula sirup, produksi *Cyclodextrins* untuk industri farmasi (Aiyer, 2005). Kebutuhan amilase di dunia industri sangat tinggi, pada tahun 2004 saja sudah mencapai penjualan sekitar US \$2 milyar, sedangkan amilase yang digunakan untuk industri makanan dan minuman pada tahun 2004 bernilai sekitar US \$11 juta (Sivaramakrishnan dkk., 2006). Seiring dengan meningkatnya penggunaan enzim amilase, maka perlu dicari sumber enzim amilase dari bahan baku yang mudah didapatkan. Salah satu bahan yang memiliki potensi untuk dieksplorasi sebagai sumber enzim amilase adalah tumbuhan alang-alang (*Imperata cylindrica*).

Beberapa tumbuhan telah diketahui mengandung enzim amilase pada akarnya baik itu akar rimpang maupun akar tunggangnya. Diantaranya adalah enzim amilase dari temulawak oleh Rinawati dkk., (2009) diperoleh aktivitas spesifik sebesar 14,844 Unit/mg protein pada kondisi suhu optimum 35 °C, waktu inkubasi 30 menit, pH = 6,1 dan juga menurut Boyce dan Volenec (1992a) dalam Gana dkk., (1998), 8% dari protein larut dalam akar tunggang alfalfa adalah β -amilase. Berdasarkan hal tersebut maka diduga dalam akar rimpang alang-alang juga mengandung enzim amilase. Selain itu, menurut Hanafiah dkk., (2005), enzim amilase juga berasal dari eksudat akar tanaman atau dari aktivitas mikrobia di dalam tanah sehingga menguatkan dugaan adanya enzim amilase dalam akar rimpang alang-alang, maka perlu dikaji lebih lanjut tentang eksplorasi enzim amilase dari tumbuhan alang-alang sehingga menjadi bahan baku alternatif penghasil enzim amilase.

Alang-alang adalah rumput tahunan (Donald dkk., 2002 dalam Pudjiharta dkk., 2008) berakar rimpang yang tumbuh menyebar mendatar di bawah permukaan tanah, sedangkan daun alang-alang mudah terbakar. Walaupun

berulang kali terbakar, alang-alang tidak musnah, karena dari akar rimpangnya akan tumbuh tunas baru.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan mulai pada tanggal 26 Juni hingga tanggal 25 September 2013. Pengambilan sampel di bagian selatan kota Makassar. Selanjutnya dilakukan isolasi dan karakterisasi di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA-UNHAS.

Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah akar rimpang alang-alang yang berasal dari bagian selatan kota Makassar, amilum (*soluble starch*), BSA (Bovin serum Albumin), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, NaOH , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glukosa anhidrat, pereaksi Nelson-somogyi, pereaksi arsenomolibdat, pereaksi folinlocalteau, NaHCO_3 , Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Natrium kalium tartrat, dan I_2 .

Alat Penelitian

Peralatan utama yang digunakan adalah pH meter (Hanna Instrument), timbangan analitik (Ohaus), membran selofan (Sigma D 0655), *magnetic stirrer*, *sentrifuge*, inkubator (Memmert), oven (Gallenkamp), spektroskopik 20D⁺, dan alat gelas umum yang digunakan di laboratorium.

PROSEDUR KERJA

Isolasi enzim amilase dari akar rimpang alang-alang

Akar rimpang alang-alang yang sudah dibersihkan dipotong-potong kecil dan ditimbang sebanyak 300 g lalu ditambahkan 400 mL buffer fosfat 0,2 M pH 6,0 kemudian dihancurkan dengan menggunakan blender pada kondisi dingin, setelah hancur dibiarkan selama 30 menit sambil kadang kala diaduk, kemudian disaring dengan kain saring. Residu dibuang dan filtrat diambil kemudian diukur volumenya selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan merupakan enzim amilase kasar (ekstrak enzim amilase). Volume supernatan diukur dan ditempatkan ke dalam wadah untuk uji aktivitas, fraksinasi dan penentuan kadar protein.

Uji aktivitas enzim amilase secara kualitatif menggunakan larutan I_2

a. Substrat yang digunakan larutan pati 1%. *Soluble starch* (Merck) ditimbang sebanyak 1 g lalu dilarutkan

dengan 100 mL akuades, kemudian diaduk dan dipanaskan hingga larutan kelihatan jernih dan bercampur.

b. Substrat pati 1% diisi ke dalam 6 tabung reaksi masing-masing sebanyak 0,5 mL substrat lalu ditambahkan 1 mL larutan enzim dan 3 tetes larutan iodine 0,01 M kemudian diinkubasi pada suhu 35°C (Rinawati dkk., 2009). Masing-masing diinkubasi selama 10, 20, 30, 40, 50, 60 menit, setelah itu didinginkan. Pengamatan aktivitas amilase didasarkan pada terjadinya perubahan warna biru menjadi bening.

Sebagai kontrol disiapkan 6 tabung reaksi lalu masing-masing tabung ditambahkan substrat pati 1% sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan 1 mL akuades dan 3 tetes larutan iodine 0,01 M kemudian diinkubasi pada suhu 35°C (Rinawati dkk., 2009). Masing-masing diinkubasi selama 10, 20, 30, 40, 50, 60 menit, setelah itu didinginkan.

Uji aktivitas amilase secara kuantitatif

Prinsip uji aktivitas enzim amilase didasarkan pada perhitungan gula pereduksi dari hasil hidrolisis pati dengan metode Nelson-Somogyi (Sudarmaji dkk., 1984). Larutan pati 1% sebanyak 0,5 mL dan 0,5 mL buffer fosfat 0,2 M pH 6,0 ditambahkan 1 mL larutan ekstrak amilase, diinkubasi pada suhu 35 °C selama 60 menit. Setelah itu dinonaktifkan pada suhu 100 °C selama 10 menit. Dinginkan, lakukan pengenceran apabila diperlukan (catat faktor pengenceran). Selanjutnya ditentukan kadar glukosanya dengan metode Nelson-Somogyi yakni ke dalam tabung reaksi dimasukkan 1 mL campuran enzim tersebut kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson-Somogyi. Dididihkan selama 5 menit, lalu didinginkan dalam air es hingga suhu larutan sama dengan suhu kamar. Setelah dingin ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat untuk membentuk suatu kompleks sehingga akan memberikan warna dan ditambahkan 7 mL air suling lalu dikocok hingga bercampur rata. Absorbansi larutan diukur dengan spektrometri 20 D⁺ pada panjang gelombang maksimum. Untuk mengetahui kadar glukosa hasil hidrolisis pati oleh enzim digunakan kurva kalibrasi dari larutan standar glukosa pada berbagai konsentrasi 0,002; 0,004; 0,006; 0,008; 0,010 mg/mL. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada pengujian aktivitas enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar glukosa. Untuk menghitung aktivitas enzim amilase menggunakan persamaan (1) menurut Suarni dan Patong (2007).

$$\text{Aktivitas enzim amilase} = \frac{C}{T} \times 1 \text{ unit}/1\mu\text{mol}$$

dimana:

C = Konsentrasi glukosa per mL ekstrak enzim (μmol)

T = Waktu inkubasi (menit)

1 unit enzim amilase = besarnya aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 μmol glukosa per menit per mL enzim (Suarni dan Patong, 2007).

Penentuan kadar protein enzim amilase dari akar rimpang alang-alang

Penentuan kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry dalam Sudarmaji dkk, (1984). Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 2 mL larutan ekstrak enzim, ditambahkan 2,75 mL pereaksi Lowry B dan dihomogenkan, kemudian dibiarkan selama 15 menit selanjutnya ditambahkan 0,25 mL pereaksi Lowry A dan dikocok sampai bercampur dengan baik, lalu dibiarkan selama 30 menit agar reaksi berjalan sempurna. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang maksimum. Jumlah protein dalam enzim ditentukan dengan cara mensubstitusi absorban

larutan contoh ke dalam persamaan regresi dari kurva standar protein.

Lowry A : Folin cioucalteu : H₂O = 1 : 1

Lowry B : 100 mL Na₂CO₃ 2% dalam NaOH 0,1 N ditambahkan dengan 1 mL CuSO₄.5H₂O 1% dan 1 mL natrium kalium tartrat 2%

Perhitungan kadar protein enzim

Kadar protein enzim dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar protein dengan berbagai konsentrasi. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 2 mL larutan standar protein dengan konsentrasi 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 mg/mL (1 gram Bovin Serum Albumin dilarutkan ke dalam akuades tepat 100 mL, kemudian diencerkan hingga konsentrasi diinginkan), lalu ditambahkan 2,75 mL pereaksi Lowry B dan dikocok segera agar bercampur rata, kemudian dibiarkan selama 15 menit selanjutnya ditambahkan 0,25 mL pereaksi Lowry A dan dikocok sampai bercampur dengan baik, lalu dibiarkan selama 30 menit agar reaksi berjalan sempurna. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Perhitungan kadar protein enzim dilakukan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan kadar protein enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar protein. Kadar protein enzim yang diperoleh dari kurva tersebut, selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim dengan menggunakan persamaan (2) menurut Page (1989) sebagai berikut:

$$As = \frac{\text{Aktivitas enzim}}{\text{Totalprotein}}$$

Keterangan:

As = Aktivitas spesifik enzim dalam mg protein (U/mg)

Total protein = mg protein

Fraksinasi dengan amonium sulfat

Ekstrak enzim kasar hasil isolasi dari akar alang-alang difraksinasi dengan amonium sulfat pada beberapa tingkat kejenuhan (0% - 80%) yaitu : 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, berdasarkan metode *Bollag and Edelstein* (1991) dalam Natsir, 2010, dengan menggunakan Tabel pada lampiran 15. Dalam perlakuan ini ekstrak enzim kasar ditambahkan amonium sulfat pada beberapa tingkat kejenuhan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna dan dibiarkan semalaman pada suhu dingin. Filtrat enzim dipisahkan dengan sentrifugasi 10.000 rpm, 30 menit suhu 4 °C, endapan yang diperoleh setiap fraksi ditimbang lalu dilarutkan dalam buffer fosfat 0,1 M pH 6,0 kemudian diuji aktivitasnya seperti pada uji aktivitas enzim kasar.

Dialisis dalam membran selofan

Dialisis dilakukan menggunakan membran selofan (Sigma D 0655) dengan diameter 21 mm. Menurut Plummer (1979), membran disimpan dalam akuades atau larutan buffer yang akan digunakan pada suhu 4 °C. Sebelum digunakan bagian dalam dan luar dicuci kembali dengan akuades atau buffernya. Hasil fraksinasi dengan aktivitas tertinggi selanjutnya dilarutkan ke dalam larutan 5 mL buffer fosfat 0,2 M pH 6,0. Larutan dimasukkan ke dalam kantong selofan kemudian didialisis dengan buffer fosfat, konsentrasi 0,05 M, diaduk dengan pengaduk magnetik stirer pada suhu 5 °C. Setiap 3 jam buffernya diganti dan setelah dialisis dilakukan pengujian aktivitas amilase dan penentuan kadar protein.

Karakterisasi enzim amilase hasil dialisis

Enzim amilase hasil dialisis dikarakterisasi pada kondisi: suhu dan pH optimum, dan konsentrasi substrat optimum enzim amilase. Cara pengujian aktivitas enzim amilase yakni mencampurkan enzim, substrat, dan buffer kemudian diinkubasi pada beberapa variasi perlakuan seperti diuraikan dalam tahapan kerja karakterisasi berikut:

Suhu optimum

Penentuan suhu optimum kerja enzim amilase dilakukan sesuai dengan prosedur penentuan aktivitas enzim amilase pada konsentrasi substrat 1% dan buffer fosfat 0,2 M pH 6,0, dengan bervariasi suhu yaitu: 25, 30, 35, 40, 45 °C.

pH optimum

Penentuan pH optimum kerja enzim amilase dilakukan sesuai dengan prosedur penentuan aktivitas enzim amilase, dengan bervariasi pH menggunakan buffer fosfat 0,2 M yaitu: pH 5,8; 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 7,0. Dengan menggunakan suhu optimum 35 °C.

Konsentrasi substrat optimum

Penentuan konsentrasi substrat optimum dari enzim amilase dilakukan sesuai dengan prosedur aktivitas enzim amilase, dengan bervariasi konsentrasi substrat berturut-turut yaitu: 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 mg/mL. Dengan menggunakan suhu optimum 35 °C dan pH optimum 6,2.

Setelah didapatkan data-data tersebut, mulai dari penentuan konsentrasi substrat optimum 3,0 mg/mL, pH optimum 6,2, dan suhu optimum 35 °C, dilakukan pengujian aktivitas menggunakan kondisi tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi enzim amilase dari akar rimpang alang-alang

Akar alang-alang sebanyak 300 g berat segar dihomogenisasi dengan blender menggunakan 400 mL pelarut buffer fosfat 0,2 M pH 6,0 pada kondisi dingin, dimaksudkan untuk memecah sel-sel sehingga enzim yang terdapat dalam sel bisa larut dalam pelarut buffer dan dihomogenisasi pada kondisi dingin untuk menjaga kondisi enzim agar tidak terdenaturasi. Selanjutnya disaring dengan kain saring untuk memisahkan antara ampas dengan filtrat. Ampas dibuang, filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim kasar dengan volume sebesar 460 mL. Ekstrak enzim kasar yang dihasilkan diuji aktivitas enzim amilasena secara kualitatif dan kuantitatif.

Uji aktivitas enzim amilase secara kualitatif menggunakan larutan I₂

Pengamatan uji aktivitas enzim amilase secara kualitatif menggunakan indikator larutan iodin 1% dapat dilihat pada Tabel 1, bahwa diantara 6 tabung yang diinkubasi, tabung urutan 6 yang menunjukkan perubahan dari biru menjadi bening setelah diinkubasi selama 60 menit yang menandakan bahwa pati telah terhidrolisis sempurna oleh enzim amilase menjadi glukosa, sedangkan substrat amilum yang terdapat pada ke 5 tabung lainnya belum terhidrolisis sempurna menjadi glukosa.

Tabel 1. Data Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Enzim Secara Kualitatif

Waktu inkubasi (menit)	Tabung reaksi						
	K	I	II	III	IV	V	VI
	Pengamatan warna						
10	Biru	Biru muda					
20	Biru		Biru muda				
30	Biru			Ungu			
40	Biru				Ungu		
50	Biru					Merah kecoklatan	
60	Biru						Bening

Uji aktivitas amilase secara kuantitatif

Prinsip uji aktivitas enzim amilase didasarkan pada perhitungan gula pereduksi dari hasil hidrolisis pati dengan metode Nelson-Somogyi. Kadar glukosa hasil hidrolisis pati oleh enzim amilase dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar glukosa pada berbagai konsentrasi, panjang gelombang maksimum dari larutan standar glukosa yaitu 645 nm sesuai pengukuran pada lampiran 4. Hasil penentuan aktivitas ekstrak enzim amilase dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data Hasil Penentuan Aktivitas Enzim Amilase

Sampel	Abs	fp	Konsentrasi glukosa (µmol)	Aktivitas enzim (Unit)
Ekstrak enzim sebelum fraksinasi	0,034	20 x	0,3111	0,0052
Ekstrak enzim setelah fraksinasi	0,770	1 x	0,3733	0,0311
Ekstrak enzim setelah dialysis	0,068	2 x	0,0644	0,0011

Dari Lampiran 5 diperoleh persamaan regresi kurva kalibrasi yaitu $y = 22,85x + 0,002$. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada pengujian aktivitas enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar glukosa. Aktivitas enzim dari ekstrak kasar akar rimpang alang-alang sebelum fraksinasi yaitu sebesar 0,0052 Unit enzim, sedangkan setelah fraksinasi sebesar 0,0062 Unit enzim, aktivitas enzim lebih besar setelah fraksinasi karena enzim sudah melalui tahap pemurnian dengan amonium sulfat sehingga protein (enzim) sudah terpisah antara protein yang satu dengan yang lainnya. Setelah dialisis, aktivitas enzim menurun menjadi 0,0011 Unit enzim, karena pada saat proses dialisis mineral-mineral yang terdapat pada ekstrak enzim setelah fraksinasi telah terpisah dari ekstrak enzim, akan tetapi mineral-mineral tersebut mungkin menjadi aktivator yang dapat meningkatkan aktivitas enzim sehingga menyebabkan berkurangnya aktivitas enzim setelah dialisis.

Penentuan kadar protein enzim amilase dari akar rimpang alang-alang

Penentuan kadar protein dalam ekstrak enzim amilase menggunakan metode Lowry, yaitu didasarkan pada reaksi protein dengan asam fosfotungstat-fosfomolibdat pada suasana alkalis akan memberikan warna biru yang mana intensitas dari warnanya bergantung pada konsentrasi dari protein tersebut. Pembacaan dan pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer 20D+.

Larutan standar yang digunakan dalam percobaan kali ini berasal dari larutan induk BSA 1 mg/mL. Kadar Protein dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar BSA pada berbagai konsentrasi, data hasil penentuan aktivitas spesifik enzim amilase dapat dilihat pada Tabel 3 dengan panjang gelombang maksimum dari larutan standar BSA yaitu 630 nm sesuai pengukuran pada lampiran 7.

Tabel 3. Data Hasil Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Amilase

Sampel	Abs	Konsentrasi protein (mg/mL)	Total protein (mg)	Aktivitas spesifik enzim (U/mg)
Ekstrak kasar enzim	0,0180	1,37	630,2	$8,25 \times 10^{-6}$
Ekstrak enzim setelah fraksinasi	0,0148	0,846	13,536	$8,13 \times 10^{-5}$

Dari Lampiran 8 diperoleh persamaan regresi kurva kalibrasi yaitu $y = 4,535x - 0,044$. Perhitungan kadar protein enzim dilakukan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan kadar protein enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar protein. Kadar protein enzim yang diperoleh dari kurva tersebut, selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim amilase dari akar rimpang alang-alang yaitu sebesar $8,25 \times 10^{-6}$ U/mg sedangkan setelah fraksinasi sebesar $8,13 \times 10^{-5}$ U/mg, aktivitas spesifik enzim meningkat setelah fraksinasi karena setelah proses fraksinasi, protein dari ekstrak enzim semakin murni menyebabkan protein yang terdapat dalam ekstrak enzim semakin sedikit sehingga aktivitas spesifik enzim yang ditunjukkan semakin besar.

Hasil yang diperoleh pada aktivitas spesifik enzim dari akar rimpang alang-alang berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu aktivitas spesifik enzim dari rimpang temulawak oleh Rinawati dkk., (2009) diperoleh aktivitas spesifik sebesar 14,844 Unit/mg protein, hal ini terjadi mungkin karena tingkat kemurnian enzim sehingga aktivitas enzim amilase dari rimpang temulawak jauh lebih besar dan aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan juga lebih besar dibandingkan dengan aktivitas spesifik enzim dari akar rimpang alang-alang.

Fraksinasi dengan amonium sulfat

Ekstrak enzim kasar hasil isolasi dari akar alang-alang difraksinasi dengan amonium sulfat pada beberapa tingkat kejenuhan (0% - 80%) yaitu : 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, berdasarkan metode *Bollag and Edelstein* (1991) dalam Natsir, 2010, dengan menggunakan Tabel penambahan amonium sulfat pada lampiran 15. Amonium sulfat pada konsentrasi tinggi akan mengendapkan komponen protein (termasuk enzim) sehingga diperoleh enzim bebas dari komponen non protein. Amonium sulfat banyak digunakan untuk mengendapkan protein karena kelarutannya tinggi, harga murah, dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein (Suhartono, 1989). Adapun pengaruh konsentrasi garam terhadap aktivitas enzim hasil pemurnian dengan fraksinasi amonium sulfat disajikan pada Tabel 4:

Tabel 4. Data Hasil Penentuan Aktivitas Amilase Setelah Penambahan Amonium Sulfat Ekstrak Kasar Enzim Amilase Dari Akar Rimpang Alang-Alang

Penambahan Amonium Sulfat (%)	Abs	Aktivitas Amilase (Unit)	Bobot Enzim (gram berat basah)
0-20	0,167	0,0013	0,9635
20-40	0,770	0,0062	1,0114
40-60	0,508	0,0041	0,9038
60-80	0,518	0,0042	1,2107
Total			4,0894

Berdasarkan karakterisasi amonium sulfat, diperoleh data aktivitas amilase tertinggi pada tingkat kejenuhan 20-40% (b/v) amonium sulfat, dan aktivitas enzim tertinggi sebesar 0,0062 Unit enzim. Hasil yang diperoleh berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu tingkat kejenuhan 60-80% (b/v) amonium sulfat dari rimpang temulawak oleh Rinawati dkk., (2009), karena lama penyimpanan ekstrak enzim amilase mengurangi aktivitas enzim dari ekstrak kasar akar rimpang alang-alang. Lama penyimpanan ekstrak enzim disebabkan karena menunggu perbaikan alat sentrifuge di laboratorium.

Total bobot enzim sebesar 4,0894 g menyatakan kadar enzim amilase sebesar 1,36 % (b/b) dan untuk bobot enzim dengan aktivitas tertinggi yaitu 1,0114 g didapatkan kadar enzim amilase sebesar 0,34% (b/b) dari 300 g akar rimpang alang-alang.

Dialisis dalam membran selofan

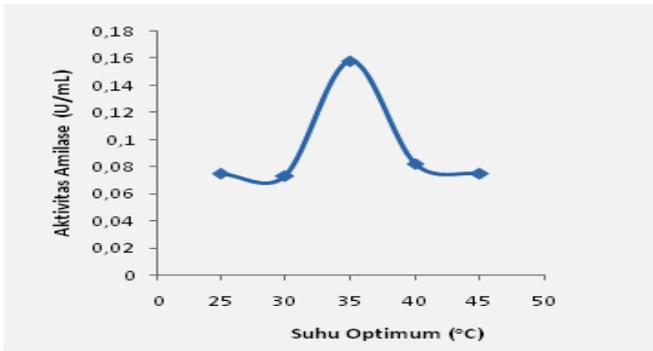
Fraksi enzim kasar yang diperoleh pada tingkat kejenuhan amonium sulfat antara (20-40)% didialisis dengan bufer fosfat 0,05 M pH 6,0 selama 18 jam pada suhu 4 °C. Enzim yang diperoleh pada tahap ini adalah enzim semi murni. Kemurnian enzim ditunjukkan oleh berkurangnya amonium sulfat dalam larutan enzim dengan menggunakan indikator BaCl₂. Indikator ini ditambahkan ke dalam buffer di luar membran dialisis dan akan membentuk endapan putih jika bereaksi dengan amonium sulfat. Enzim semi murni ini memiliki aktivitas enzim sebesar 0,0011 Unit enzim dan aktivitas spesifik sebesar $8,13 \times 10^{-5}$ U/mg. Beberapa ahli memasukkan kadar protein terlarut sebagai faktor dalam mengukur aktivitas enzim dalam unit aktivitas spesifik. Aktivitas spesifik adalah jumlah mikromol produk aktivitas enzim permiligram protein (Suarni dan Patong, 2007).

Karakterisasi enzim amilase hasil dialisis

Enzim amilase hasil dialisis dikarakterisasi pada kondisi: suhu dan pH optimum, dan konsentrasi substrat optimum enzim amilase. Cara pengujian aktivitas enzim amilase yakni mencampurkan enzim, substrat, dan buffer kemudian diinkubasi pada beberapa variasi perlakuan seperti diuraikan dalam tahapan kerja karakterisasi berikut:

Suhu Optimum

Salah satu faktor yang mempengaruhi reaksi enzimatik adalah suhu. Bila suhu yang digunakan melebihi suhu optimum akan terjadi kerusakan struktur enzim. Penentuan suhu optimum dari enzim amilase dilakukan sesuai dengan prosedur aktivitas enzim amilase dengan menginkubasi enzim menggunakan substrat pati 1 % pada kisaran suhu antara 25 - 45°C.



Gambar 3. Grafik Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Amilase dari Akar Rimpang Alang-Alang ([S] = 1% dan pH 6,0)

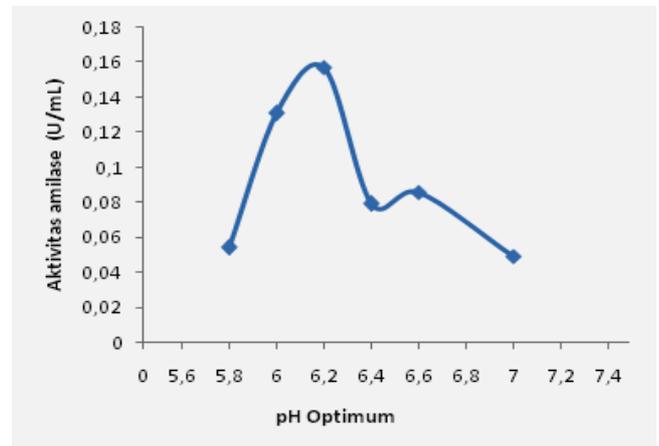
Data hasil pengukuran pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Lampiran 12, data aktivitas enzim diperoleh dari jumlah glukosa yang terbentuk. Perhitungan kadar glukosa dilakukan berdasarkan kurva standar glukosa yang ditunjukkan pada Lampiran 5.

Hasil penelitian pada Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim meningkat pada suhu 30°C hingga mencapai suhu optimal 35°C dan turun drastis pada suhu 40°C. Hal ini disebabkan karena pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat akan tetapi kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi serta mengurangi kecepatan reaksi. Suhu optimum yaitu suhu yang menyebabkan terjadinya reaksi kimia dengan kecepatan paling besar. Suhu optimum enzim amilase dari akar rimpang alang-alang memiliki aktivitas enzim sebesar $1,07 \times 10^{-3}$ Unit enzim. Suhu optimum yang diperoleh sama dengan penelitian sebelumnya oleh Rinawati dkk (2009) yaitu 35°C.

pH optimum

Salah satu faktor yang mempengaruhi reaksi enzimatik adalah pH. Penentuan pH optimum dari enzim amilase dilakukan sesuai dengan prosedur aktivitas enzim amilase dengan menginkubasi enzim menggunakan substrat pati 1% dan suhu optimum 35°C serta variasi kisaran pH buffer fosfat 0,2 M antara 5,8 – 7,0. Data hasil pengukuran pengaruh pH terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Lampiran 13, data aktivitas enzim diperoleh dari jumlah glukosa yang terbentuk. Perhitungan kadar glukosa dilakukan berdasarkan kurva standar glukosa yang ditunjukkan pada Lampiran 5.

Hasil penelitian pada Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas enzim memiliki pH optimum 6,2. Daya katalis enzim akan menjadi rendah maupun tinggi karena terjadinya denaturasi protein. Enzim mempunyai gugus aktif yang bermuatan positif dan negatif. Aktivitas enzim akan optimum jika terdapat keseimbangan antara kedua muatannya. Pada keadaan asam, muatannya cenderung positif dan pada keadaan basa muatannya cenderung negatif sehingga aktivitas enzimnya menjadi berkurang dan bahkan menjadi tidak aktif. pH optimum enzim amilase dari akar rimpang alang-alang memiliki aktivitas enzim sebesar $2,48 \times 10^{-3}$ Unit enzim. pH optimum yang diperoleh hampir sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Rinawati dkk (2009) yaitu 6,1.

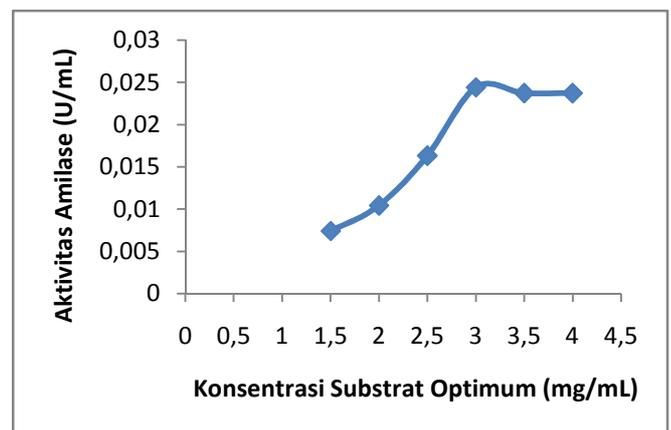


Gambar 4. Grafik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Amilase dari Akar Rimpang Alang-Alang ([S] = 1% dan suhu 35°C)

Konsentrasi substrat optimum

Pengaruh konsentrasi substrat amilum terhadap aktivitas enzim amilase dilakukan dengan bervariasi konsentrasi substrat pada rentang 1,5-4,0 mg/mL dan interval 0,5 dengan hasil seperti yang ditunjukkan pada gambar 6.

Aktivitas amilase meningkat dari konsentrasi substrat 1,5 mg/mL hingga mencapai optimumnya pada konsentrasi substrat 3,0 mg/mL dengan aktivitas enzim sebesar $1,22 \times 10^{-3}$ Unit enzim. Di atas konsentrasi substrat 3,0 mg/mL, tidak terjadi lagi peningkatan aktivitas enzim dikarenakan enzim sudah jenuh dengan substrat. Pada konsentrasi substrat yang rendah, sisi aktif tempat terjadinya kontak antara enzim dan substrat hanya menampung substrat yang sedikit. Dalam kondisi ini konsentrasi kompleks enzim-substrat sedikit dan menyebabkan aktivitas enzim kecil. Bila konsentrasi substrat diperbesar, maka semakin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan enzim pada sisi aktif tersebut. Akibatnya kompleks enzim-substrat semakin besar dan aktivitas enzim juga semakin besar.



Gambar 5. Grafik Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Amilase dari Akar Rimpang Alang-Alang (suhu 35°C dan pH 6,2)

Setelah didapatkan data-data tersebut, dilakukan pengujian aktivitas menggunakan kondisi optimum dan diperoleh aktivitas enzim amilase dari akar rimpang alang-alang sebesar $1,19 \times 10^{-3}$ Unit enzim.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa akar rimpang alang-alang menghasilkan enzim amilase sebesar 0,34% (b/b), dengan aktivitas enzim sebesar $1,1 \times 10^{-3}$ Unit enzim dan aktivitas spesifik yang didapatkan sebesar $8,13 \times 10^{-5}$ U/mg, bekerja optimum pada suhu 35°C, pH 6,2 dan konsentrasi substrat maksimum 3,0 mg/mL, dari kondisi optimum tersebut diperoleh aktivitas enzim sebesar $1,19 \times 10^{-3}$ Unit enzim.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada bapak/ibu dosen pembimbing yang senantiasa membimbing dalam menyelesaikan penelitian ini, Mahdalia, analis Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA UNHAS. Serta kepada semua pihak yang membantu sehingga penelitian ini dapat terselesaikan hingga saat ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P.V., 2005, Amylases and their applications, *African Journal of Biotechnology*, **4** (13); 1525-1529.
- Gana, J.A., Kalengamaliro, N.E., Cunningham, S.M. dan Volenec, J.J., 1998, Expression of β -Amylase from Alfalfa Taproots, *Plant Physiology*, **118** (4); 1495-1506.
- Hanafiah, K.A., Napoleon, A. dan Ghofar, N., 2005, *Biologi Tanah*, PT. RajaGrafindo Persada, Jakarta.
- Natsir, H., 2010, *Kajian Enzim Kitinase Termotabil dari Bakteri Termofil: Pemurnian, Karakterisasi dan Aplikasi dalam Hidrolisi Kitin*, Disertasi tidak diterbitkan, Program Pascasarjana FMIPA Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Page, D.S., 1989, *Prinsip-Prinsip Biokimia*, Edisi Kedua, Erlangga, Jakarta.
- Plummer, D.T., 1979, *An Introduction to Practical Biochemistry*, Second Edition, Tata Mc. Graw Hill Publishing Company Ltd, New Delhi.
- Pudjiharta, A., Widyati, E., Adalina, Y. dan Syafruddin H.K., 2008, Kajian Teknik Rehabilitasi Lahan Alang-Alang (*Imperata cylindrica* L. Beauv), (Online), ([http:// www.forda-mof.org/index.php/content/download/ info/957](http://www.forda-mof.org/index.php/content/download/info/957)), diakses 16 januari 2013).
- Rinawati, M., Pipit, Wuryanti, Rahmanto, Wasino, 2009, *Isolasi, Karakterisasi dan Amobilisasi Enzim Amilase dari Temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb.)*, (Online), (<http://eprints.undip.ac.id/2923/>), diakses 16 januari 2013).
- Sianturi, D.C., 2008, *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru Sumatera Utara*, Tesis diterbitkan, Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., and Pandey, A., 2006, α -Amylases from Microbial Sources, *Food Technol. Biotechnol.*, **44** (2); 173-184.
- Suarni dan Patong, R., 2007, Potensi Kecambah Kacang Hijau sebagai Sumber Enzim α -Amilase, *Indo. J. Chem.*, 2007, **7** (3); 332-336.
- Sudarmadji, S., Bambang, H. dan Suhardji, 1984, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Sutiamiharja, N., 2008, *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Kasar dari Sumber Air Panas Gurukinayan Karo Sumatera Utara*, Tesis diterbitkan, Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, Medan.