

PENGENALAN ENZIM AMILASE (*ALPHA-AMYLASE*) DAN REAKSI ENZIMATISNYA MENGHIDROLISIS AMILOSA PATI MENJADI GLUKOSA

Ariandi

Program Studi Biologi, Fakultas Sains
Universitas Cokroaminoto Palopo
Email: ariandi.manda@gmail.com

ABSTRAK

Amilase (*Alpha-amylase*) adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis dari α -1, 4-glikosidik amilosa pati menghasilkan glukosa. Jumlah glukosa yang dihasilkan selama reaksi enzimatik diukur dengan menggunakan pereaksi *dinitrosalicylic acid* (DNS) pada panjang gelombang 550 nm. Semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan, semakin banyak pula gula pereduksi (glukosa) yang terkandung dalam sampel. Larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan. Kurva standar glukosa nilai persamaan $y = 0,0034x + 0,1818$, $R^2 = 0,9875$ yang berarti data tersebut termasuk teliti. Berdasarkan data absorbansi glukosa tereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati oleh enzim *alpha-amilase* terlihat bahwa semakin lama waktu kinerja enzim amilase, semakin menurun nilai absorbansinya yang berarti kadar glukosanya semakin menurun (fluktuatif), kemungkinan kenaikan suhu menyebabkan terjadinya proses denaturasi, bagian sisi aktif enzim akan terganggu dan menyebabkan konsentrasi enzim menjadi berkurang sehingga kecepatan reaksinya pun akan menurun. Pengujian pati sisa; persamaan untuk kurva standar pati, $y = 8,6x + 0,021$, nilai $R^2 = 0,9908$, semua larutan sampel berwarna kuning dan nilai absorbansinya sangat rendah (hampir mendekati nol), hal ini berarti kemungkinan hampir semua pati yang terkandung dalam larutan telah terhidrolisis oleh enzim α amilase menjadi glukosa. Apabila terdapat amilosa pati dalam larutan akan berpengaruh dalam pembentukan intensitas warna warna biru-hitam, hal ini disebabkan oleh adanya molekul iodium (Ion-ion triiodida) yang terikat dalam kumparan helix amilosa pati.

Kata Kunci: *Alpha-amylase*, glukosa, amilosa pati

PENDAHULUAN

Amilase diklasifikasikan sebagai saccharidase (enzim yang memotong polisakarida). Amilase merupakan enzim pencernaan, terutama dilakukan oleh pankreas dan kelenjar ludah. Fungsi utama dari enzim amilase adalah untuk memecah pati dalam makanan

sehingga mereka dapat digunakan oleh tubuh. Amilase juga disintesis dalam buah tanaman selama pematangan, menyebabkan buah menjadi lebih manis.

Enzim amilase banyak digunakan dalam industri. Hal ini digunakan dalam industri pembuatan dan fermentasi bir untuk konversi pati

menjadi gula terfermentasi. Pada industri tekstil, amilase digunakan untuk merancang tekstil, kemudian pada industri deterjen, amilase tercampur dengan enzim protease dan lipase sebagai pencuci noda pakaian dan dalam industri makanan digunakan untuk pembuatan sirup manis, untuk meningkatkan konten *diastase* tepung, untuk modifikasi makanan bayi, dan menghilangkan pati dalam produksi jelly.

Amilase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis dari alpha-1,4-glikosidik polisakarida untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa. Amilase bisa berasal dari hewan, jamur, dan sumber tanaman. Pancreatin dan pancrelipase mengandung amilase yang berasal dari pankreas hewan, pankreas biasanya babi. Amilase juga berasal dari malt barley dan jamur *Aspergillus oryzae* (Wang, 2009).

Ada beberapa tipe amilase yang berbeda. Enzim ini diklasifikasikan sesuai dengan cara memotong ikatan glycosidic. Alpha-amilase menghidrolisis alpha 1,4-glikosidik, secara acak menghasilkan dekstrin,

oligosakarida dan monosakarida. Alpha-amilase adalah endo-amilase. Exoamylases menghidrolisis alpha 1,4-glikosidik linkage hanya dari non-pereduksi ujung rantai polisakarida luar. Exoamylases termasuk beta-amilase dan glucoamylases (gamma-amilase, amyloglu-cosidases) (Aiyer, 2005).

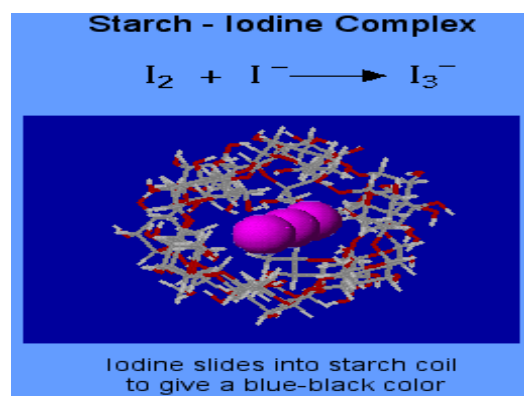
Mekanisme kerja enzim α -amilase terdiri dari dua tahap, yaitu : tahap pertama degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahap kedua terjadi pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir dan tidak acak. Keduanya merupakan kerja enzim α -amilase pada molekul amilosa. Pada molekul amilopektin kerja α -amilase akan menghasilkan glukosa, maltosa dan satu seri α -limit dekstrin, serta oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih glukosa yang mengandung ikatan α -1,6-glikosidik (Winarno, 2010). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengukur kadar glukosa yang terbentuk dari reaksi enzimatik alfa amilase dan mengukur kadar pati sisanya.

*Pengenalan Enzim Amilase (Alpha-Amylase) dan Reaksi Enzimatiknya
Menghidrolisis Amilosa Pati Menjadi Glukosa*

TINJAUAN PUSTAKA

Ada beberapa tipe amilase yang berbeda. Enzim ini diklasifikasikan sesuai dengan cara memotong ikatan glikosidik. Alpha-amilase menghidrolisis alpha 1,4-glikosidik, secara acak menghasilkan dekstrin, oligosakarida dan monosakarida. Alpha-

amilase adalah endo-amilase. Exoamylases menghidrolisis alpha 1,4-glikosidik linkage hanya dari non-pereduksi ujung rantai polisakarida luar. Exoamylases termasuk beta-amilase dan glucoamylases (gamma-amilase, amyloglu-cosidases) (Aiyer, 2005).



Gambar 1. Struktur kompleks pati dan Iodine.
(Ophardt, Charles E. 2003. *Elmhurst College; Virtual Chembook*).

Enzim α -amilase memiliki gugus karboksil dan nitrogen pada sisi aktifnya. Substrat membentuk kompleks adsorpsi dengan enzim dimana posisi ikatan glukosidik dalam posisi saling berhadapan dengan gugus karboksil dan kelompok imidazol. Karboksil anion menyerang bagian nukleofil C (1) dari substrat yang bertujuan untuk menetralkan rantai ion amidazol. Pada reaksi deglukosilasi, kelompok imidazol menjadi dasar untuk memisahkan komponen air pada posisi C (1) (Naz, 2002). Aktivitas enzim α -amilase dapat

diukur berdasarkan penurunan kadar pati yang larut atau jumlah gula pereduksi yang terbentuk (Judoamidjojo *et al.* 1992)

METODE

Proses pengujian hidrolisis pati: Mengisi setiap tabung reaksi dengan larutan pati 0,05%, kemudian menambahkan 0,5 ml larutan enzim alpha-amilase yang telah terencerkan 1000 kali. Selanjutnya memasukkan sampel ke dalam penangas air pada

suhu 90°C dan mengambil tabung pada waktu 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 menit.

Pengamatan gula yang terbentuk: mengambil sampel pada setiap tabung sebanyak 1 ml dan menambahkan 3 ml larutan DNS, kemudian memanaskannya selama 5 menit pada air mendidih lalu mendinginkannya. Mengukur absorbansi sampel dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Membuat kurva standar glukosa pada konsentrasi 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm.

Pengamatan pati sisa: mengambil sampel pada setiap tabung sebanyak 1 ml dan menambahkan 0,1 ml larutan Iod konsentrasi 0,2% kemudian mengocoknya sampai homogen dan menambahkan 3 ml aquades. Mengukur absorbansi sampel dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Membuat kurva standar pati pada konsentrasi 0,015; 0,020; 0,250; dan 0,030%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Molekul amilosa sebagian besar terdiri dari rantai tunggal dengan 500 sampai 20.000 ikatan α -1,4-D-glukosa. Amilosa dapat membentuk “*extended shape*” cenderung berakhir menjadi kumpulan heliks. Heliks tunggal

amilosa memiliki ikatan hidrogen antara atom oksigen nomor 2 dan atom oksigen nomor 6 pada permukaan luar helix dengan mengarah ke dalam cincin oksigen (Wang, 2009).

Ikatan α -1,4-D-glukosa dalam amilosa pati akan kita lakukan reaksi enzimatik dengan enzim α amilase untuk mendegradasi ikatan tersebut. Enzim α amilase dapat memecah pati secara acak dari tengah atau bagian dalam molekul pati.

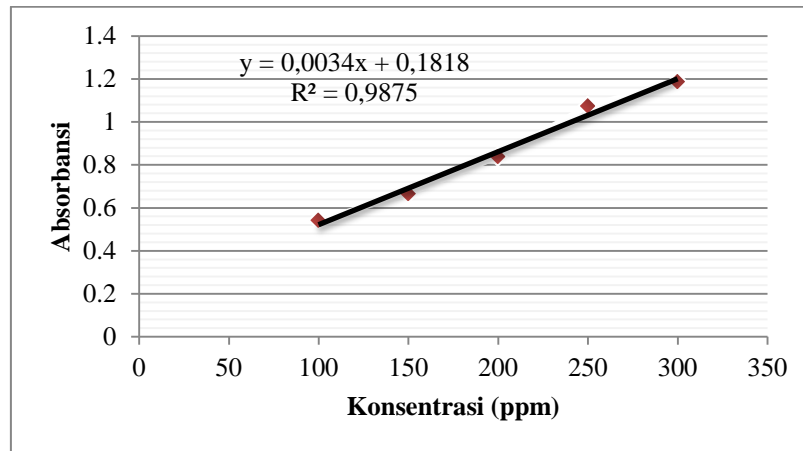
Pengamatan Glukosa yang terbentuk

Pengamatan glukosa yang terbentuk dari reaksi enzimatik α amilase dengan cara mengambil 1 ml cairan supernatan. Enzim α amilase akan bekerja dengan cara bereaksi dengan molekul substrat (pati), sehingga akan menghasilkan senyawa glukosa. Enzim amilase menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4, sehingga amilosa terurai menjadi glukosa (Lynd, 2002).

Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS dan menginkubasinya pada suhu 100°C selama ± 5 menit. Jumlah glukosa yang dihasilkan selama reaksi enzimatik diukur dengan menggunakan pereaksi asam dinitro salisilat atau dinitrosalicilic acid (DNS) pada panjang gelombang 550 nm. Semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan,

*Pengenalan Enzim Amilase (Alpha-Amylase) dan Reaksi Enzimatiknya
Menghidrolisis Amilosa Pati Menjadi Glukosa*

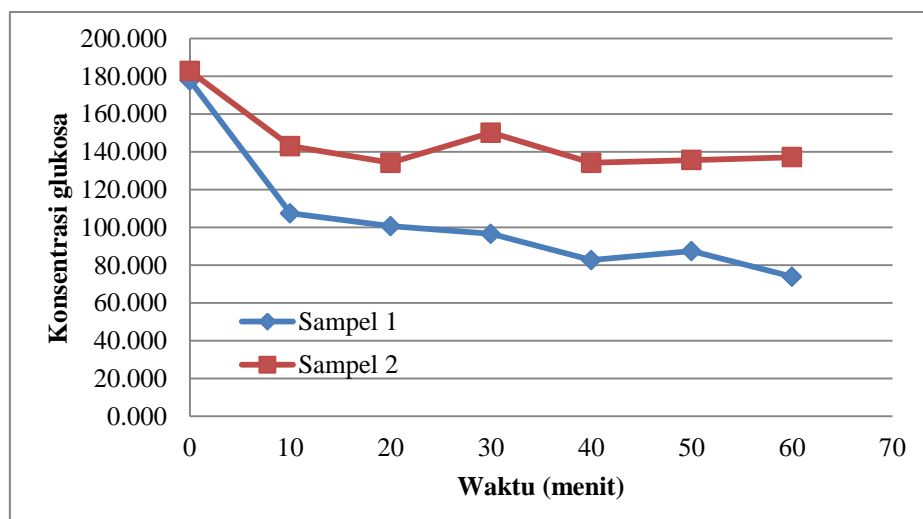
semakin banyak pula gula pereduksi sampel.
(glukosa) yang terkandung dalam



Grafik 1. Kurva standar glukosa

Tabel 1. Konsentrasi Glukosa yang terbentuk dari hidrolisis pati

Waktu (Menit)	Sampel 1		Sampel 2	
	Absorbansi	Konsentrasi	Absorbansi	Konsentrasi
0	0.786	177,706	0.803	182,706
10	0.547	107,412	0.668	143,000
20	0.524	100,647	0.638	134,176
30	0.510	96,529	0.692	150,059
40	0.463	82,706	0.638	134,176
50	0.479	87,412	0.643	135,647
60	0.433	73,882	0.648	137,118



Grafik 2. Kurva konsentrasi glukosa yang terbentuk dari hidrolisis pati

Berdasarkan kurva standar glukosa $y = 0,0034x + 0,1818$, $R^2=0,9875$ yang diatas terlihat bahwa nilai persamaan y berarti data tersebut termasuk teliti.

Walaupun nilai R belum mencapai 0,99, kemungkinan hal ini disebabkan oleh faktor teknis (keakuratan/ketelitian alat) dan ketidak-telitian praktikan dalam melakukan pengukuran, seperti dalam proses pemipetan larutan dengan menggunakan pipet mikro yang tidak teliti.

Berdasarkan data absorbansi glukosa yang terbentuk yang dihasilkan dari hidrolisis pati oleh enzim alpha-amilase, data terlihat bahwa semakin lama waktu pemanasan kinerja enzim amilase, semakin menurun nilai absorbansinya, yang berarti kadar glukosanya semakin menurun (fluktuatif). Berdasarkan teori seharusnya semakin lama enzim bekerja pada suhu tinggi yang optimal (enzim termofilik), maka reaksi enzim berlangsung lebih cepat. Setiap peningkatan suhu 1 °C dapat meningkatkan rata-rata reaksi lebih 10% sampai mencapai suhu optimal, setelah itu enzim menjadi tidak aktif (Illanes, 2008 dalam Heryanto, 2012). Selain itu, karena enzim merupakan protein, maka kemungkinan kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi, apabila hal tersebut terjadi, maka bagian sisi aktif enzim akan terganggu dan menyebabkan konsentrasi enzim menjadi berkurang

sehingga kecepatan reaksinya pun akan menurun

Metode penentuan komposisi gula reduksi dalam sampel menggunakan pereaksi asam dinitro salisilat atau 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk 3-amino-5-nitrosalicylic acid, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul 3-amino-5-nitrosalicylic acid yang terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi (Sazciet.al. 1986)

Reaksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan 5-nitrosalicylic acid. Reaksi ini berjalan dalam suasana basa. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga

*Pengenalan Enzim Amilase (Alpha-Amylase) dan Reaksi Enzimatiknya
Menghidrolisis Amilosa Pati Menjadi Glukosa*

menimbulkan warna jingga kemerahan (Sastrohamidjojo, 2005)

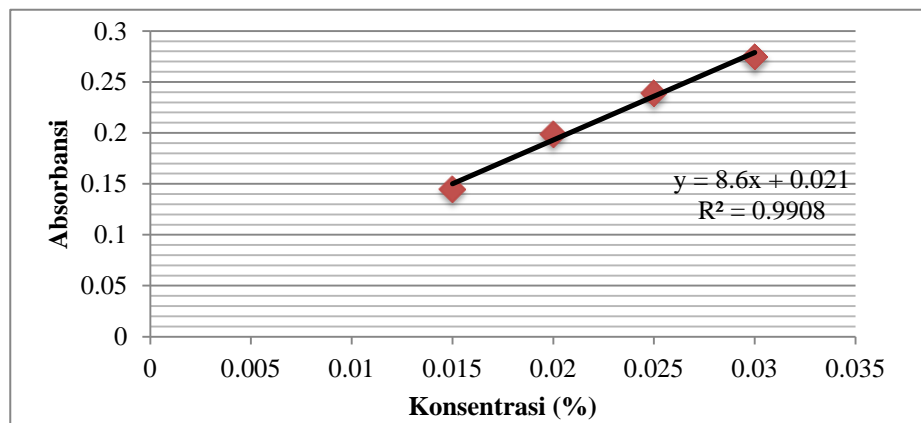
Pengamatan Pati Sisa

Amilosa pati berbentuk helix tunggal memiliki bentuk mirip dengan siklodekstrin dengan memiliki permukaan bagian dalam yang relatif hidrofobik yang dapat berikatan molekul dengan air, yang relatif mudah hilang akan digantikan oleh lipid hidrofobik atau molekul aromatik (Aiyer, 2005).

Karakteristik ini dapat mengikatkan rantai amilosa dengan molekul Iodium (misalnya, polyiodides, rantai I_3^- dan I_5^- dan membentuk struktur seperti I_9^{3-} dan

I_{15}^{3-}). Setiap lingkaran helix amilosa dapat mengikat sekitar dua atom iodium dan warna biru dihasilkan karena adanya interaksi donor-akseptor antara air dan polyiodides yang kekurangan elektron (Ophardt, 2003).

Pengujian pati dengan melakukan penambahan Iodium-reagen KI pada larutan pati. Jika amilosa pati terdapat dalam larutan, maka akan menghasilkan warna biru-hitam. Jika amilosa pati tidak hadir, maka warna akan tetap oranye atau kuning. Untuk Amilopektin pati, selulosa, ataupun disakarida seperti sukrosa yang terdapat dalam larutan tidak akan memberikan efek warna.



Grafik 3. Kurva standar pati

Berdasarkan data yang didapatkan, nilai kurva standar pati $R^2=0,9908$, nilai tersebut termasuk teliti, dengan nilai persamaan $y=8.6x + 0.021$. Berdasarkan data, semua larutan sampel berwarna kuning

dan nilai absorbansinya sangat rendah mendekati nol, hal ini berarti hampir semua pati yang terkandung dalam larutan telah terhidrolisis oleh enzim alpha amilase menjadi glukosa. Hal ini kemungkinan

disebabkan setelah sampel didinginkan, enzim alpha amilase tetap bekerja menghidrolisis pati, seharusnya setelah sampel diangkat dari suhu panas, sampel langsung ditambahkan dengan larutan Iod untuk menghentikan reaksi enzimatik dari alpha amilase.

Apabila terdapat amilosa pati dalam larutan sampel, maka akan berpengaruh dalam pembentukan warna biru tua, hal ini disebabkan oleh adanya molekul iodium yang terikat dalam kumparan helix amilosa pati.

Iodine dalam reagen KI sangat tidak larut dalam air, sehingga reagen iodium dibuat dengan melarutkan iodium dalam larutan kalium iodida. Hal ini membuat larutan ion kompleks triiodida linier. Ion ion triiodida terikat ke dalam kumparan helix dari pati menyebabkan intensitas warna biru-hitam (Zhizhuanget.al, 2006).

KESIMPULAN

Glukosa tereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati oleh enzim *alpha-amilase* terlihat bahwa semakin lama waktu kinerja enzim amilase, semakin menurun nilai absorbansinya yang berarti kadar glukosanya semakin menurun (fluktuatif), Pengukuran pati sisa menunjukkan semua larutan sampel berwarna kuning dan nilai absorbansinya sangat rendah (hampir mendekati nol), hal ini berarti

kemungkinan hampir semua pati yang terkandung dalam larutan telah terhidrolisis oleh enzim alpha amilase menjadi glukosa.

Saran untuk penelitian berikutnya melakukan karakterisasi enzim alpha amylase meliputi pH, suhu, konsentrasi enzim, lama inkubasi enzim (perlakuan panas), dan penambahan inhibitor yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim alpha amylase.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, Prasanna V. 2005. Review: Amylases and Their Applications. *African Journal of Biotechnology Vol. 4 (13), pp. 1525-1529.*
- Heryanto, Tri E. 2012. *Penentuan Aktivitas Amilase Kasar Termofil Bacillus subtilis Isolat Gunung Darajat Garut, Jawa Barat.* Universitas Pendidikan Indonesia. Repository. upi.ac.id.
- Lynd L.R. Weimer PJ. Van Zyl WH. Pretorius IS. 2002. Microbial Amylase utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev 2002;66:506-77.*
- Ophardt, Charles E. 2003. *Carbohydrate MiniTopics; Starch-Iodine.* Virtual Chembook. Elmhurst College..

*Pengenalan Enzim Amilase (Alpha-Amylase) dan Reaksi Enzimatiknya
Menghidrolisis Amilosa Pati Menjadi Glukosa*

Sastrohamidjojo, Hardjono. 2005. *Kimia Organic, Sterokimia, Lemak, dan Protein*. Yogyakarta :Gadjah Mada University Press.

Sazci A. Radforda A. & Erenler K. 1986. Detection of Cellulolytic Fungi by Using Congo red as an Indicator: a Comparative Study with The Dinitrosalicylic Acid Reagent Method. *Journal of Applied Bacteriology* 61. 559-562.

Wang, Nam Sun. 2009. *Experiment no. 5: Starch Hydrolysis by Amylase*. Department of Chemical & Biomolecular Engineering. University of Maryland

Zhizhuang X, Reginald S, Adrian T. 2006. A Quantitative Starch–Iodine Method for Measuring Alpha-Amylase And Glucoamylase Activities. *Analytical biochemistry* Volume 351, Issue 1, 1 April 2006, Pages 146–148.