

PENENTUAN AKTIVITAS AMILASE DARI UMBI BENKBUANG (*Pachyrrizus arosus* L.Urb) HASIL EKSTRAKSI DENGAN ETANOL DAN AMMONIUM SULFAT

Iswendi

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Padang, Indonesia*

ABSTRACT

This research aimed to determine the optimum amylase activity at the variations of temperature and pH, and the effectiveness of extractors. The extraction of the enzyme can be done in two ways, with an organic solvent and inorganic salt. We have conducted research on amylase activity of yam tubers extracted with ethanol and ammonium sulfate. This research is an experimental research using complete randomized design with two factorials which are pH and temperature. pH variations were 4, 4.5, 5.0, 5.5, and 6, while the variation of temperature are 30^o C, 40^o C, 50^oC, and 60^oC. Isolation of amylase was carried out by multilevel fractionation using saturated ammonium sulphate 40, 60, 80, and 90% w/v and cold ethanol 95%. Amylase activity was determined based on the concentration of glucose which is result of hydrolysis of starch by Nelson-Somogy method. The highest activity was found in fraction I, pH 4 and temperature of 50^oC with 34.55 units of activity for ethanol solvent and 30.72 units for ammonium sulfate.

Key words: amylase, activity, isolation, yam tubers extracted

PENDAHULUAN

Enzim merupakan senyawa protein yang berfungsi sebagai katalis pada reaksi-reaksi kimia dalam organisme hidup. Berbagai Negara telah lama memanfaatkan jasa enzim dalam mengolah bahan makanan, dan minuman seperti pembuatan minuman anggur di Cina, tape dan tempe di Indonesia. Pemanfaatan enzim di industri diawali pada tahun 1960, contohnya penggunaan enzim oksidase dalam sabun bubuk atau deterjen, yang dapat membantu menghilangkan noda karat (Winarno, 1986:1).

Kebutuhan manusia terhadap enzim meningkat dari tahun ke tahun. Hal ini disebabkan karena kegunaan enzim yang luas di berbagai bidang industri seperti makanan, minuman, dan farmasi, salah satu contoh adalah enzim amilase (Sadikin, 1992:18). Amilase merupakan enzim yang berfungsi mengkatalis reaksi hidrolisis pati dan glikogen menjadi maltose, maltotriosa, isomaltosa, dan glukosa. Amilase dapat dibagi atas tiga

kelompok yaitu: α -amilase, β -amilase, dan glukoamilase. Enzim α -amilase disebut juga dengan endoamilase karena enzim ini memutuskan ikatan glikosida pada tengah atau dalam dari molekul pati atau glikogen, sedangkan β -amilase disebut juga dengan eksoamilase karena memutuskan ikatan glikosida pada bagian ujung molekul pati (Winarno, 1986:57-58). Enzim ini banyak terdapat pada tanaman, hewan, dan mikroorganisme. Tanaman yang banyak mengandung pati seperti umbi-umbian umumnya mengandung amilase. Salah satu tanaman yang merupakan sumber amilase adalah bengkuang (*Pachyrrizus erosus* L. Urb) mengandung 56% pati, 16 gula, dan 6% protein (Forsyth, 2002: 261).

Amilase tersusun dari 403 residu asam amino, 3 ion Ca^{2+} dan 153 molekul pelarut. Strukturnya terdiri atas 3 domain yaitu pertama domain sentral (A) terbentuk dari asam amino Gln 1-Ile 88 dan Asn-153, His-344 dengan motif α - β -8 barrel. Struktur domain ini berbentuk loop yang menonjol. Domain kedua (B) terbentuk dari asam amino Val-89, Leu-

152, dan domain ketiga (C) terbentuk dari asam amino Lys-351, Ile-403 dengan struktur berbentuk 5β -sheet anti parallel. Sisi aktif katalitik enzim amilase berada pada ujung C terminal β -barrel domain sentral (A), yaitu pada residu asam amino Asp-179, Glu-204, dan Asp-289. Sedangkan substrat terikat pada permukaan di sekitar residu Trp-276 dan Trp-277 (Kadziola dan Haser, 1994:1-2).

Amilase di bidang industri banyak digunakan, diantaranya industri kertas, industri lem (dekstrin), tekstil. Dalam Industri, amilase digunakan bersama protease untuk memperhalus tekstur. Di bidang farmasi, amilase digunakan untuk membantu pencernaan (Suhartono, 1989:123-124). Dalam industri pangan, amilase digunakan untuk membuat bir, roti, kue, dan sirup. Apabila diinginkan sirup dengan kadar glukosa rendah, maka digunakan α -amilase, dan jika diinginkan sirup dengan kadar gula tinggi, maka digunakan β -amilase. Dalam industri tepung amilase digunakan bersama protease untuk meningkatkan mutu tepung (Winarno, 1986:84-86).

Enzim dapat diisolasi dengan dua cara yaitu dengan pelarut organik seperti methanol, etanol, aseton, dan garam anorganik seperti ammonium sulfat, natrium sulfat dan natrium fosfat (Suhartono, 1998:180-181). Ekstraksi amilase dari berbagai umbi tumbuhan telah dilakukan oleh peneliti terdahulu, diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Hagenimana *et al.* (1992) telah mengisolasi amilase dari ubi jalar, dan diperoleh aktivitas amilasanya sebesar 103,92 unit untuk α -amilase dan 133,406 unit untuk β -amilase. Mardiah (1996) juga telah mengisolasi amilase dari umbi talas, dan mendapatkan aktivitas amilase sebesar 3,5 unit pada kondisi pH 5,6, suhu 40°C , lama inkubasi 20 menit, dan konsentrasi substrat 1,5% (b/v). Amrina (2004) juga telah melakukan penelitian tentang ekstraksi amilase dari umbi bengkuang dengan menggunakan amonium sulfat 65% (b/v) sebagai pengendap protein (enzim), diperoleh aktivitas amilase sebesar 36,713 unit pada pH 5,8, waktu inkubasi 120 menit, dan konsentrasi substrat 3,5% (b/v). Berdasarkan penelusuran literatur, belum ditemukan adanya penelitian tentang isolasi amilase dari umbi bengkuang dengan meng-

gunakan etanol dan amonium fosfat dengan cara fraksinasi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas amilase dari umbi bengkuang yang diekstraksi dengan etanol dan amonium sulfat pada variasi pH dan suhu serta menentukan efektifitas pengekstrak. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi perkembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (IPTEK) dalam bidang Biokimia dan Kimia Pangan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen. Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bengkuang (*Pachyrrhizus arosus* L.Urb) yang berasal dari Kota Padang. Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan terikat. Variabel bebas adalah pH dengan variasi 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, dan 6, serta suhu dengan variasi 30, 40, 50 dan 60°C . Variabel terikat adalah aktivitas amilase. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 2 faktorial, yaitu pH dan suhu, dan dilakukan 2 kali pengulangan. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: peralatan gelas, timbangan analitik, blender, incubator, penangas air, alat sentrifus, spektrometri UV, pH meter, thermometer. Bahan yang digunakan adalah umbi bengkuang, serbuk amonium sulfat, etanol 95%, glukosa, amilum, NaOH, NaCl, ZnSO_4 , CaCl_2 , Ba(OH)_2 , reagen Biuret, reagen Nelson, larutan buffer sitrat-fosfat pH 5, dan reagen arsenomolibdat.

Langkah kerja dalam penelitian ini adalah; umbi bengkuang sebanyak 250 g yang telah dikupas kulitnya dan dipotong kecil-kecil ditambah 0,75 g NaCl, 0,5 g CaCl_2 dan buffer sitrat-fosfat pH 5 sebanyak 250 mL, kemudian diblender sehingga diperoleh homogenate dan disimpan semalam dalam kulkas. Homogenat disaring dan disentrifus, sehingga diperoleh supernatant dan endapan yang berwarna putih. Bagian supernatant diambil dan dilakukan fraksinasi dengan menggunakan methanol dan amonium sulfat. Fraksinasi dengan etanol dilakukan dengan menambahkan etanol 95% dingin ke dalam supernatant dengan perbandingan 1:1, campuran dibiarkan 1 malam pada suhu -10°C .

Larutan disentrifus selamam 15 menit pada 9.000 rpm. Endapan dipisahkan dan dikeringkan. Supernatan pada fraksinasi I ini difraksinasi kembali dengan penambahan etanol 95% (Alexander & Griffiths, 1991:43). Fraksinasi dengan amonium sulfat dilakukan dengan cara menambahkan amonium sulfat ke dalam supernatan dengan variasi 20, 40, 60, dan 80% b/v jenuh. Endapan tiap fraksi ditentukan aktivitasnya pada variasi pH dan suhu. Aktivitas amilase ditentukan berdasarkan kadar glukosa hasil hidrolisis pati dengan menggunakan metode Nelson-Somogy (Plummer, 1978:185).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis data diperoleh aktivitas optimum amilase yang diekstraksi dengan etanol dan amonium sulfat adalah pada fraksi I. Untuk pengekstrak etanol aktivitas optimum amilase adalah 39,26 unit pada pH 5, dan suhu 50⁰C, serta waktu inkubasi 120 menit. Untuk pengekstrak amonium sulfat diperoleh aktivitas optimum sebesar 30,72 unit pada pH 5, suhu 50⁰C dan waktu inkubasi 120 menit. Aktivitas amilase fraksi I untuk setiap pH dan suhu disajikan pada tabel 1 dan 2.

Hasil pada tabel 1 dan 2 memperlihatkan bahwa aktivitas optimum enzim amilase terdapat pada suhu inkubasi 50⁰C dan pH 5,0 dengan aktivitas 39,26 unit untuk pengekstrak etanol dan 30,72 unit untuk pengekstrak amonium sulfat. Setiap enzim memiliki pH dan suhu optimum. Jika suhu

yang digunakan dibawah suhu optimum, maka aktivitas enzim akan rendah, demikian juga dengan pH, jika dilakukan proses dibawah suhu optimum, maka aktivitas enzim rendah. Di bawah suhu 50⁰C aktivitas enzim amilase rendah karena energi aktivasi belum tercapai, sehingga tumbukan molekul enzim amilase dengan substrat kurang atau sangat sedikit. Jika enzim amilase bekerja di atas suhu 50⁰C, maka kemungkinan besar enzim akan terdenaturasi, sehingga substrat sukar berikatan dengan sisi aktif enzim, maka mengakibatkan produk yang dihasilkan sedikit (Sadikin, 2002: 139).

Demikian halnya jika enzim bekerja di atas suhu dan pH optimum, akan mengurangi produk. Jadi jika enzim bekerja di bawah atau diatas suhu dan pH optimum, maka produk akan sedikit. Hal ini terjadi karena struktur tiga dimensi enzim mulai berubah sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim, akibatnya proses katalisis berlangsung tidak sempurna (Sadikin, 2002:138). Aktivitas enzim amilase yang diekstrak dengan etanol, bila dibandingkan dengan pengekstrak amonium sulfat, lebih tinggi. Hal ini disebabkan karena hasil ekstrak dengan etanol lebih bersih, artinya sedikit sekali ditemukan zat pengotor, jika dibandingkan dengan amonium sulfat banyak ditemukan zat pengotornya. Jika jumlah zat pengotor terdapat dalam jumlah sedikit, berarti enzim yang diperoleh tersebut lebih efektif, sehingga aktivitasnya akan lebih tinggi.

Tabel 1. Aktivitas Amilase Hasil Fraksinasi Pertama dengan Pengekstrak Etanol

Suhu (°C)	pH				
	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
30	36,02	1,80	30,25	33,65	15,97
40	29,03	13,55	33,83	16,53	25,67
50	36,52	3,28	39,26	9,55	10,43
60	34,88	3,20	35,31	2,68	1,38

Etanol merupakan pelarut yang ideal karena adanya keseimbangan antara efek melarutnya dan sifat hidrofilik yang cukup untuk mengurangi tingkat denaturasi. Setelah ditambahkan dengan pelarut, campuran ini dibiarkan beberapa saat untuk diendapkan dengan pemusingan, dan pelarut organik dapat

dipisahkan dan diuapkan, sehingga dapat dimanfaatkan kembali. Enzim yang diendapkan dengan pelarut organik biasanya lebih murni, kendatipun enzim ini lebih sulit dilarutkan kembali dengan enzim hasil pengendapan dengan garam (Suhartono, 1989:181).

Tabel 2. Aktivitas Amilase Hasil Fraksinasi Pertama dengan Pengekstrak Amonium Sulfat

pH \ Suhu ($^{\circ}$ C)	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
30	18,81	16,41	21,25	26,05	16,79
40	25,71	20,95	23,98	24,19	20,62
50	27,26	24,44	30,72	19,48	26,04
60	19,10	12,45	10,81	9,67	7,50

Penambahan garam ammonium sulfat pada konsentrasi tinggi, akan mengakibatkan kekuatan ion garam menjadi naik, sehingga akan terjadi interaksi antar ion garam dengan air sebagai pelarut. Selain itu akan tertarik oleh garam akibatnya enzim akan mengendap. Dengan demikian pengekastrak amilase yang efektif adalah dengan etanol.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa Aktivitas tertinggi dari amilase hasil ekstraksi diperoleh pada fraksi I. Aktivitas optimum amilase hasil ekstraksi dengan etanol dan amonium sulfat berturut-turut adalah 39,26 unit dan 30,72 unit pada pH 5,0 dan suhu 50° C, serta lama inkubasi 120 menit. Amilase hasil ekstraksi dengan etanol mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibanding dengan amonium sulfat. Dan dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang:

1. Pemurnian enzim amilase, untuk mendapatkan aktivitas yang lebih tinggi.
2. Melakukan amobilisasi amylase, sehingga diperoleh enzim dengan stabilitas tinggi, sehingga aktivitasnya tetap tinggi, meskipun telah digunakan berulang kali.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Alexander RR, Griffiths JM. 1991. *Basic Biochemical Methods*. Wiley-Liss Publication: New York.
- Amrina M. 2004. Ekstraksi dan Penentuan Aktivitas Enzim Ami-lase dari Umbi Bengkuang (*Pachyrrhizus arosus* L.Urb) Hasil Ekstraksi Dengan Etanol dan Amonium Sulfat. *Skripsi*. Jurusan Kimia FMIPA UNP.
- Forsyth JL *et al.* 2002. Characterization of Starch from Tubes of Yam Bean (*Pachyrrizus ahipa*). *Journal of Agrycultur and Food Chemistry*. Vol. 50. No. 2.
- Hagenimana V *et al.* 1992. Distribution of Amylases within Sweet Ptato (*Ipomoea sbatatas*) Root Tussue. *Journal Agricultural Food Chemistry*. Vol 40.
- Kadziola A, Haser R. 1994. Criystal and Moleculer Structure of Barley α -amylase . *Journal Mol. Biol*, Vol 239: 104-122.
- Mardiah E. 1996. Studi Pendahuluan Isolasi dan Penentuan Aktivitas Enzim Amilase dari Talas (*Cococasta esculenta*). *Laporan Penelitian*. Depdikbud Lembaga Penelitian Universitas Andalas Padang.
- Plummer DT. 1978. *Introduction to Practical Biochemistry*. 2th edition. Mc. Graw

- Hill Book Company (UK) Limiteded. London.
- Sadikin M. 2002. *Biokimia Enzim*. Widya Medika. Jakarta.
- Suhartono MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Depdikbud Dirjen Dikti. IPB, Bogor.
- Winarno FG. 1986. *Enzim Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.