

## PENENTUAN AKTIVITAS AMILASE DARI UMBI BENGGUANG (*Pachyrrizus erosus* L. Urb) HASIL EKSTRAKSI ETANOL DAN AMMONIUM SULFAT

Iswendi \*)

### ABSTRACT

*Amylase is an hydrolase enzyme that plays a role in the hydrolysis reaction of starch and glycogen into isomaltose, maltotriose, maltose and glucose. Amylase can be obtained by extraction from several sources of plants, animals and microorganisms. 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 aimed to determine the optimum amylase activity at the variations of temperature and pH, and the effectiveness of extractors. 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<sup>o</sup> C, 40<sup>o</sup> C, 50<sup>o</sup> C, and 60<sup>o</sup> C. 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<sup>o</sup> C with 34.55 units of activity for ethanol solvent and 30.72 units for ammonium sulfate.*

**Keywords :** amylase, activity, extraction, yam tubers

\*) Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Negeri Padang, email: iswendi@fmipa.unp.ac.id

### 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 diberbagai bidang industri seperti makanan, minuman, dan farmasi, salah satu contoh adalah enzim amilase (Sadikin, 2002:18). Amilase merupakan enzim yang berfungsi mengkatalis reaksi hidrolisis pati dan glikogen menjadi maltosa, maltotriosa, isomaltosa, dan glukosa. Amilase dapat dibagi atas tiga kelompok yaitu :  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, dan glukamilase. Enzim  $\alpha$ -amilase disebut juga dengan endoamilase karena enzim ini

memutuskan ikatan glikosida pada tengah atau dalam dari molekul pati atau glikogen, sedangkan  $\beta$ -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 (Porsyth, 2002: 261).

Amilase tersusun dari 403 residu asam amino, 3 ion  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\alpha$ - $\beta$ -8 barrel. Struktur domain ini berbentuk miring 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  $5\beta$ -sheet anti parallel. Sisi aktif katalitik enzim amilase berada pada ujung C

terminal  $\beta$ -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, 1994:1-2).

Amilase di bidang industri banyak digunakan, diantaranya industri kertas, industri lem (dekstrin), dan tekstil. Amilase di dalam industri 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  $\alpha$ -amilase, dan jika diinginkan sirup dengan kadar gula tinggi, maka digunakan  $\beta$ -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 metanol, 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 Hagenimana, et.al (1992) telah mengisolasi amilase dari ubi jalar, dan diperoleh aktivitas amilasena sebesar 103,92 unit untuk  $\alpha$ -amilase dan 133,406 unit untuk  $\beta$ -amilase. Mardiah (1995) juga telah mengisolasi amilase dari umbi talas, dan mendapatkan aktivitas amilase sebesar 3,5 unit pada kondisi pH 5,6, suhu 40<sup>0</sup> 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 menggunakan etanol dan amonium fosfat dengan cara fraksinasi.

Tujuan 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 per-

kembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (IPTEK) dalam bidang Biokimia dan Kimia Pangan.

## METODA PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen. Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bengkuang (*Pachyrrizus arosus* L.Urb) yang beraal 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<sup>0</sup>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, inkubator, penangas air, alat sentrifus, spektrometri 21, pH meter, termometer. Bahan yang digunakan adalah umbi bengkuang, serbuk amonium sulfat, etanol 95%, glukosa, amilum, NaOH, NaCl, ZnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Ba(OH)<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> 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 kedalam supernatan dengan perbandingan 1:1, campuran dibiarkan 1 malam pada suhu -10<sup>0</sup>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, R.R & 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 mengguna-

kan 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 50°C, serta waktu inkubasi 120 menit. Untuk pengekstrak amonium sulfat diperoleh aktivitas optimum sebesar 30,72 unit pada pH 5, suhu 50°C dan waktu inkubasi 120 menit. Aktivitas amilase fraksi I untuk setiap pH dan suhu disajikan pada Tabel 1 dan 2 berikut ini.

Tabel 1. Aktivitas Amilase Hasil Fraksinasi Pertama dari 250 g Umbi Bengkuang (Unit) Pada Variasi Suhu dan pH dengan Pengekstrak Etanol.

pH \ Suhu (°C)	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

Tabel 2. Aktivitas Amilase Hasil Fraksinasi Pertama dari 250 g Umbi Bengkuang (Unit) Pada Variasi Suhu dan pH dengan Pengekstrak Amonium Sulfat.

pH \ Suhu (°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

Dari tabel 1 dan 2 diperoleh bahwa aktivitas optimum enzim amilase terdapat pada suhu inkubasi 50°C 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 di bawah suhu optimum, maka aktivitas enzim akan rendah, demikian

juga dengan pH, jika dilakukan proses di bawah suhu optimum, maka aktivitas enzim rendah. Di bawah suhu 50°C 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 50°C, kemungkinan besar enzim akan terdenaturasi, sehingga substrat sukar berikatan dengan sisi aktif enzim, 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 di atas 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). Pada 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. Jika jumlah zat pengotor terdapat dalam jumlah sedikit, berarti enzim yang diperoleh tersebut lebih efektif, sehingga aktivitasnya akan lebih tinggi.

Etanol merupakan pelarut yang ideal karena adanya keseimbangan antara kelarutannya dan sifat hidrofilik sehingga 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).

Penambahan garam ammonium sulfat pada konsentrasi tinggi, akan mengakibatkan jumlah 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. Garam ammonium sangat mudah larut dengan kata lain kelarutannya sangat tinggi. Jika penambahan garam terlalu tinggi, maka semua protein akan mengendap. Sesuai dengan sifat protein akan dapat diendapkan dengan penambahan garam,

baik protein non aktif maupun protein aktif (enzim), sehingga menyebabkan aktivitas enzim yang berkurang. Dengan demikian pengekstrak amilase yang efektif adalah etanol.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Dari hasil penelitian diperoleh simpulan sebagai berikut:

1. Aktivitas tertinggi dari amilase hasil ekstraksi diperoleh pada fraksi I.
2. 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<sup>0</sup>C, serta lama inkubasi 120menit.
3. Amilase hasil ekstraksi dengan etanol mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibanding dengan amonium sulfat.

### Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk penelitian lebih lanjut:

1. Melakukan pemurnian enzim amilase, untuk mendapatkan aktivitas yang lebih tinggi.
2. Melakukan amobilisasi amylase, untuk memperoleh stabilitas dan aktivitasnya yang tinggi, meskipun enzim telah digunakan berulang kali.

## DAFTAR RUJUKAN

- Alexander, R.R & Griffiths, J.M. (1991). **Basic Biochemical Methods**. Wiley-Liss Publication: New York.
- Amrina, Mardiaty. (2004). *Ekstraksi dan Penentuan Aktivitas Enzim Amilase dari Umbi Bengkuang (Pachyrrhizus arosus L.Urb)* Hasil Ekstraksi Dengan Etanol dan Amonium Sulfat . **Skripsi**. Jurusan Kimia FMIPA UNP.
- Forsyth, J.L., et.al. (2002). *Characterization of Starch from Tubers of Yam Bean (Pachyrrizus ahipa)*. **Journal of Agriculturn 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 and Haser, R. (1994). *Criystal and Moleculer Structure of Barley  $\alpha$ -amylase* . **Journal Mol. Biol.**, Vol 239, No. 104-122.
- Mardiah, Elida. (1996). *Studi Pendahuluan Isolasi dan Penentuan Aktivitas Enzim Amilase dari Talas (Cococasta esculenta)*. **Penelitian**. Depdikbud Lembaga Penelitian Universitas Andalas Padang.
- Plummer, D.T. (1978). **Introduction to Practical Biochemistry**. 2<sup>th</sup> edition. Mc. Graw Hill Book Company (UK) Limitietd. London.
- Sadikin, M. (2002). **Biokimia Enzim**. Widya Medika. Jakarta.
- Suhartono, Maggy. T. (1989). **Enzim dan Bioteknologi**. Depdikbud Dirjen Dikti IPB, Bogor.
- Winarno, F.G. (1986). **Enzim Pangan**. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.