

**ISOLASI DAN PEMURNIAN ENZIM α -GLUKOSIDASE DARI BERAS
KETAN HITAM (*Oryza sativa* VAR. GLUTINOSA) SERTA AMOBILISASI
DENGAN MATRIKS Ca-ALGINAT-KITOSAN SECARA
MIKROENKAPSULASI**

MAUDY AUDINA AFANDY

H311 13 023



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2017

**ISOLASI DAN PEMURNIAN ENZIM -GLUKOSIDASE DARI BERAS
KETAN HITAM (*Oryza sativa* VAR. GLUTINOSA) SERTA
AMOBILISASI DENGAN Matriks Ca-ALGINAT-KITOSAN SECARA
MIKROENKAPSULASI**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains*

Oleh:

MAUDY AUDINA AFANDY

H 311 13 023



MAKASSAR

2017

SKRIPSI

**ISOLASI DAN PEMURNIAN ENZIM α -GLUKOSIDASE DARI BERAS
KETAN HITAM (*Oryza sativa* VAR. GLUTINOSA) SERTA
AMOBILISASI DENGAN MATRIKS Ca-ALGINAT-KITOSAN SECARA
MIKROENKAPSULASI**

Disusun dan diajukan oleh:

MAUDY AUDINA AFANDY

H 311 13 023

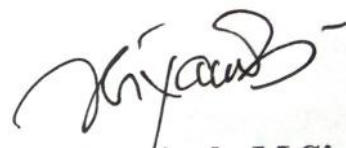
Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:

Pembimbing Utama



Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 19620320 198711 2 001

Pembimbing Pertama



Dr. Rugaiyah, M.Si
NIP. 19611231 198702 2 002

*Berbuat baiklah kepada orang lain, sebagaimana
Allah telah berbuat baik kepadamu
Qs Al-Qasas: 77*

*Kupersembahkan karya kecil ini untuk orang-orang
terbaikku; kedua orang tua dan saudara-saudaraku
tercinta.*

PRAKATA

Bismillahirrahmaanirrahim, segala puji bagi Allah SWT Tuhan semesta alam, sang pencipta manusia, sang pemilik ilmu pengetahuan, karena atas berkat, rahmat, dan hidayah-Nyalah sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian dengan judul **“Isolasi dan Pemurnian Enzim -glukosidase dari Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa* VAR. *glutinosa*) Serta Amobilisasi dengan Matriks Ca-Alginat-Kitosan Secara Mikroenkapsulasi”**.

Shalawat serta salam tak lupa tercurahkan kepada Baginda Rasulullah SAW manusia terbaik sepanjang masa, manusia yang sepantasnya dijadikan idola, serta para sahabat, istris-istri beliau, dan keluar beliau yang dengan perjuangannya, dan ilmunya membawa manusia dari alam kegelapan menuju alam yang terang – benderang.

Kepada kedua orangtua saya tercinta, ayahanda **Muh. Ridwan Afandy SH** dan ibunda **Ruth Angriany S.Sos.i**, terima kasih untuk setiap kasih sayang, dukungan, dan doa yang senantiasa dan tak henti-hentinya diberikan kepada saya, semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang, keteguhan hati di atas agama Allah, dan kemuliaan bukan hanya di dunia tapi juga di akhirat Insya Allah. Terima kasih juga kepada ketiga kakak kandung saya **Awal R. Afandy, Marwani R. Afandy, dan Nurul Basmah R. Afandy** yang menjadi motivasi bagi saya dalam menuntut ilmu, serta kepada keponakan saya **Mikhayla Humaira Muzakkir** yang menjadi penyemangat bagi saya, semoga Allah senantiasa melindungi mereka dan membimbing mereka di jalan kebenaran Aamiin, Insya Allah.

Terima kasih kepada ibunda **Dr. Hasnah Natsir, M.Si** selaku pembimbing utama dan ibunda **Dr. Rugaiyah, M.Si** selaku pembimbing pertama yang menjadi orangtua di kampus dan senantiasa meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya dalam membimbing dan memberikan arahan yang baik.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ayahanda **Dr. Eng Amiruddin** selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta semua staf pegawai.
2. Ibunda **Dr. Indah Raya, M.Si** selaku ketua jurusan kimia dan ibunda **Dr. St. Fauziah, M.Si** selaku sekretaris jurusan kimia dan semua dosen-dosen kimia serta staf pegawai.
3. **Prof. Dr. Abd Wahid Wahab, M.Sc, Drs. Frederik Mandey, M.Sc, Dr. Syahrudin Kasim, M.Si, dan Dr. St. Fauziah, M.Si** selaku dosen penguji ujian sarjana kimia.
4. **Dr. Abd. Karim, M.Si** selaku kepala Laboratorium Biokimia sekaligus penasehat akademik.
5. Analis Laboratorium **Kak Anti, Kak Fibhy, Kak Linda, Ibu Tini, Pak Sugeng, dan Pak Iqbal**. Terkhusus untuk **Kak Anti** terima kasih atas segala saran-saran dan bantuan serta motivasinya.
6. Rekan penelitian **Andi Akbar** yang sangat banyak membantu selama penelitian, memberikan saran dan kritikan yang sangat membangun.
7. Rekan-rekan penelitian di Laboratorium Biokimia **Sri, Eka, Akbar, Emmi, Asrul, Yudith, Rafsen, Ulfa, Samri, Kak Uni, Kak Amirah, Kak Destri, Kak Maretrin, Kak Fani, Kak Ilham, Kak Khalil, Kak Hendra, dan Aulia**.

8. Sahabatku fillah **Nunu, Ifa, Riska, Ayu, dan Ulfa** yang sering mengingatkan disaat khilaf menghampiri dan yang selalu memberi semangat. Semoga Allah senantiasa meridhoi langkah kaki kita dijalan kebaikan dan kebenaran. Aamiin
9. **“TITRASI 2013”** kalian adalah saudara seperjuangan di dunia kampus. Kalian adalah orang-orang yang telah Allah takdirkan hadir dihidup saya, yang mengubah keraguanku menjadi yakin. Sekali lagi terima kasih.
10. **“MIPA 2013”** yang merupakan saudara seperjuangan dalam berbagi ilmu fisika, matematika, dan biologi.
11. Organisasi **“HMK FMIPA Unhas”** dan **“BEM FMIPA Unhas”** yang telah menjadi wadah untuk saya mengembangkan pengetahuan diluar ilmu perkuliahan, dan kakak - kakak angkatan 2010, 2011, 2012, dan adik-adik 2014, 2015, 2016 dan seluruh anggota **“KMK FMIPA Unhas”** yang senantiasa berbagi ilmu dan pengalaman.
12. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama menyelesaikan penelitian, terima kasih.

Penulis sadar bahwa skripsi ini tidak sempurna dan banyak kekurangan baik materi maupun teknik penulisannya, karena sejatinya kesempurnaan hanyalah milik Allah. Oleh karena itu, penulis berharap saran dan kritikan yang bersifat membangun dari pembaca.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi siapa saja dalam pengembangan ilmu pengetahuan kimia khususnya bidang biokimia.

Makassar, September 2017

Penulis

ABSTRAK

Enzim α -glukosidase adalah enzim yang berperan mengubah karbohidrat menjadi glukosa. Isolasi enzim α -glukosidase dari beras ketan hitam (*Oryza sativa* L var. glutinosa) serta amobilisasi menggunakan matriks Ca-alginat-kitosan telah dilakukan dengan tujuan untuk menentukan aktivitas enzim dan pengaruh pemakaian ulang enzim amobil. Ekstrak kasar yang telah diperoleh dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-100 %, kemudian didialisis dengan menggunakan membran selofan. Ekstrak enzim murni yang diperoleh dikarakterisasi sebelum dan sesudah amobilisasi, matriks yang digunakan yaitu Ca-alginat-kitosan. Fraksi tertinggi pada proses fraksinasi diperoleh pada fraksi III dengan tingkat kejenuhan 40-60 % dengan aktivitas sebesar 38,93 mU/mg. Setelah dilakukan dialisis, aktivitas enzim pada fraksi III meningkat sebesar 1187,50 mU/mg. Enzim α -glukosidase memiliki kondisi optimum pada suhu 37 °C dengan pH buffer 6,5 dan konsentrasi substrat 8 mM. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim α -glukosidase seperti logam Mg dan Mn berperan sebagai aktivator terhadap aktivitas enzim sedangkan logam Co dan Zn berperan sebagai inhibitor. Enzim α -glukosidase yang telah diamobilisasi dapat digunakan secara berulang sebanyak 4 kali.

Kata kunci: Amobilisasi, enzim α -glukosidase, matriks Ca-alginat-kitosan, *Oryza sativa* L var. glutinosa.

ABSTRACT

Enzyme α -glucosidase is an enzyme that acts to convert carbohydrates into glucose. Isolation of α -glucosidase enzyme from black glutinous rice (*Oryza sativa* L var. glutinosa) and amobilization using Ca-alginate-chitosan matrix have been done with the aim to determine enzyme activity and effect of reuse of immobilized enzyme. The obtained crude extract was purified by fractionation method using ammonium sulfate with 0-100% saturation level, then was dialysis by using cellophane membrane. The pure enzyme extract obtained was characterized before and after immobilization, the matrix used was Ca-alginate-chitosan. The highest fraction in fractionation process was obtained at fraction III with saturation level of 40-60% with activity equal to 38,93 mU/mg. After dialysis enzyme activity on fraction III increased by 1187.50 mU/mg. The α -glucosidase enzyme has an optimum condition at 37 ° C with a buffer pH of 6.5 and a substrate concentration of 8 mM. The effect of metal ions on the activity of α -glucosidase enzymes such as Mg and Mn metals serves as activators of enzyme activity while Co and Zn metals act as inhibitors. The immobilized α -glucosidase enzyme can be used repeatedly for 4 times.

Keywords: Amobilization, α -glucosidase enzyme, Ca-alginate-chitosan matrix, *Oryza sativa* L var. glutinosa.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Maksud Penelitian.....	4
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Beras Ketan Hitam (<i>Oryza sativa</i> var. <i>glutinosa</i>).....	5
2.2 Enzim.....	7
2.3 Enzim -glukosidase.....	8
2.4 Inhibitor Enzim -glukosidase.....	10
2.5 Diabetes Mellitus.....	11
2.6 Amobilisasi.....	12

BAB III METODE PENELITIAN.....	16
3.1 Bahan Penelitian.....	16
3.2 Alat Penelitian.....	16
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.4 Prosedur Penelitian.....	17
3.4.1 Preparasi Sampel, Isolasi dan Penentuan pH Buffer Optimum ...	17
3.4.2 Uji Aktivitas Enzim -glukosidase	17
3.4.3 Uji Kadar Protein Enzim -glukosidase.....	18
3.4.4 Pemurnian Enzim -glukosidase dengan Metode Fraksinasi	18
3.4.5 Dialisis Enzim -glukosidase dengan Membran Selofan	19
3.4.5.1 Preparasi Membran Selofan	19
3.4.5.2 Dialisis Enzim -glukosidase.....	19
3.4.6 Karakterisasi Enzim -glukosidase.....	19
3.4.6.1 Penentuan pH Optimum.....	19
3.4.6.2 Penentuan Suhu Optimum.....	20
3.4.6.3 Penentuan Pengaruh Waktu Inkubasi.....	20
3.4.6.4 Penentuan pengaruh konsentrasi substrat	20
3.4.6.5 Penentuan Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim	21
3.4.7 Amobilisasi Enzim -glukosidase.....	21
3.4.8 Pengaruh Perulangan Pemakaian Enzim -glukosidase Amobil .	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Penentuan pH Buffer Optimum Ekstrak Kasar Enzim -glukosidase	23
4.2 Pemurnian Awal Enzim -glukosidase dengan Metode Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat	24
4.3 Dialisis Enzim -glukosidase.....	26

4.4 Karakterisasi Enzim α -glukosidase Bebas	28
4.4.1 Pengaruh Waktu Inkubasi	28
4.4.2 Penentuan Suhu Optimum.....	29
4.4.3 Penentuan pH Buffer Optimum	30
4.4.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat	31
4.4.5 Pengaruh Ion Logam	33
4.5 Karakterisasi Enzim Amobil	34
4.5.1 Pengaruh Waktu Inkubasi	34
4.5.2 Penentuan Suhu Optimum.....	35
4.5.3 Penentuan pH Buffer Optimum	36
4.5.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat	37
4.5.5 Pengaruh Ion Logam	39
4.6 Pengaruh Perulangan Pemakaian Enzim Amobil	40
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Beras ketan hitam	6
2. Struktur molekul enzim -glukosidase.....	9
3. Struktur <i>Acarbose</i>	11
4. Tipe-tipe amobilisasi enzim.....	13
5. Grafik variasi pH terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim -glukosidase	23
6. Tahapan fraksinasi terhadap aktivitas spesifik enzim -glukosidase.....	25
7. Aktivitas spesifik enzim -glukosidase sebelum dan setelah dialisis.....	27
8. Grafik pengaruh waktu terhadap aktivitas enzim -glukosidase bebas...	28
9. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim -glukosidase bebas.....	29
10. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas enzim -glukosidase bebas.....	30
11. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim -glukosidase bebas.....	31
12. Grafik hubungan antara $1/[S]$ terhadap $1/[V]$	31
13. Grafik hubungan pengaruh konsentrasi ion logam terhadap aktivitas enzim -glukosidase bebas.....	33
14. Grafik pengaruh waktu terhadap aktivitas enzim -glukosidase amobil..	34
15. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim -glukosidase amobil..	35
16. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas enzim -glukosidase amobil.....	36
17. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim -glukosidase amobil.....	37
18. Grafik hubungan antara $1/[S]$ terhadap $1/[V]$	38
19. Grafik hubungan pengaruh konsentrasi ion logam terhadap aktivitas enzim -glukosidase amobil.....	39
20. Grafik pengaruh perulangan pemakaian enzim -glukosidase amobil...	40

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Kandungan gizi beras ketan hitam	7
2. Golongan enzim dan reaksi yang dikatalisnya	8
3. Sumber dan aplikasi enzim -glukosidase	10
4. Tahapan fraksinasi terhadap aktivitas spesifik -glukosidase.....	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Preparasi Sampel, Isolasi, Penentuan pH Buffer Optimum Ekstrak Kasar Enzim, dan Uji Aktivitas	47
2. Uji Kadar Protein	48
3. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	49
4. Dialisis dengan Membran Selofan	50
5. Karakterisasi Enzim -glukosidase	51
6. Amobilisasi Enzim -glukosidase	54
7. Pengaruh Perulangan Pemakaian Enzim -glukosidase Teramobilisasi	55
8. Perhitungan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim -glukosidase	56
9. Perhitungan Aktivitas Enzim -glukosidase pada Proses Pemurnian...	57
10. Perhitungan Aktivitas Enzim -glukosidase pada Proses Pemurnian...	58
11. Karakterisasi Enzim -glukosidase Bebas	59
12. Karakterisasi Enzim -glukosidase Amobil	62
13. Pengaruh Perulangan Pemakaian Enzim Amobil	65
14. Foto Penelitian	66

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Beras ketan (*Oryza sativa* L var. *glutinosa*) banyak terdapat di Indonesia dengan jumlah produksi sekitar 42.000 ton pertahun, namun penggunaannya di Indonesia masih terbatas pada industri makanan (Lukman dkk., 2012). Beras ketan hitam merupakan salah satu komoditas pangan yang sangat potensial sebagai sumber karbohidrat, antioksidan, senyawa bioaktif dan serat yang penting bagi kesehatan (Kadirantau, 2000). Penggunaan beras ketan hitam sebagai sumber enzim α -glukosidase belum banyak dipublikasikan.

Enzim α -glukosidase merupakan enzim pemecah karbohidrat kompleks menjadi gula sederhana (Isslebacker dkk., 1998). Kerja enzim α -glukosidase dapat dihambat oleh suatu senyawa yang berfungsi sebagai inhibitor. Penghambatan enzim α -glukosidase diharapkan dapat mengurangi pemecahan karbohidrat kompleks menjadi gula sehingga kadar gula darah menjadi normal dan memperbaiki fungsi dari sel β pankreas (Pujiyanto dkk., 2015). Inhibisi kerja enzim ini secara efektif dapat mengurangi pemecahan karbohidrat kompleks dan juga proses absorpsi glukosa, sehingga dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa *postprandial* pada penderita diabetes (Shinde dkk., 2008).

Enzim α -glukosidase diperlukan dalam pencarian senyawa analog sebagai inhibitor enzim tersebut dalam rangka penemuan obat diabetes mellitus tipe 2 (Budiman, 2011; Risma, 2012). Diabetes Mellitus adalah penyakit yang disebabkan oleh meningkatnya kadar gula dalam darah akibat kekurangan insulin (Irawan, 2009). Pada penderita diabetes mellitus tipe 2, inhibisi terhadap enzim

tersebut dapat menghambat absorpsi glukosa sehingga dapat mengurangi keadaan hiperglikemia setelah mengkonsumsi makanan yang banyak mengandung karbohidrat (Budiman, 2011; Risma, 2012). Pencarian senyawa analog sebagai inhibitor α -glukosidase diperlukan ketersediaan enzim α -glukosidase dalam jumlah dan kadar kemurnian yang cukup (Irawan, 2009).

Penelitian tentang isolasi enzim α -glukosidase dari golongan serealia seperti gabah telah dilaporkan oleh Budiman (2011) bahwa tepung gabah (*Oryza sativa* var. ciherang) dapat menghasilkan enzim α -glukosidase dengan aktivitas enzim 23,75 mU/mL. Enzim tersebut setelah difraksinasi dengan amonium sulfat (20-70%), kemudian dilanjutkan dengan dialisis menghasilkan aktivitas spesifik sebesar 41,16 mU/mg pada pH optimum 6. Demikian pula penelitian yang dilakukan oleh Risma (2012) pada tepung beras lapuk IR 46 dapat menghasilkan enzim α -glukosidase dengan aktivitas sebesar 90,3 mU/mL, setelah enzim tersebut dimurnikan secara fraksinasi dengan amonium sulfat (20-50%), kemudian dilanjutkan dengan dialisis menghasilkan aktivitas spesifik sebesar 238,9 mU/mg pada pH optimum 5. Hasil penelitian yang telah dilakukan Risma (2012) pada uji ion logam menunjukkan bahwa ion Mg^{2+} dan ion Mn^{2+} merupakan aktivator enzim α -glukosidase, Sedangkan ion Co^{2+} dan ion Zn^{2+} berperan sebagai inhibitor. Dalam penelitian ini digunakan sampel beras ketan hitam yang lapuk, karena beras ketan hitam menurut Tuankotta dkk (2015) kadar proteinnya lebih tinggi, sehingga kemungkinan enzim α -glukosidase pada beras ketan hitam lebih banyak.

Enzim sebagai biokatalis pada umumnya hanya dapat digunakan satu kali saja, setelah itu enzim tersebut akan rusak atau tidak dapat digunakan lagi. Agar enzim dapat digunakan secara berulang kali, maka enzim tersebut

perlu diamobilisasi, salah satu metode amobilisasi enzim adalah metode mikroenkapsulasi. Pada penelitian ini dipilih menggunakan metode amobilisasi mikroenkapsulasi, karena enzim yang telah diamobilisasi dengan metode mikroenkapsulasi dapat digunakan sampai 5 kali pemakaian (Sebayang, 2006). Matriks mikroenkapsulasi yang digunakan pada penelitian ini adalah Ca-alginat-kitosan, karena kemampuan alginat untuk membentuk gel cukup besar sehingga enzim yang berukuran besar dapat terjebak di dalamnya. Selain itu, alginat juga tidak beracun, harganya murah, dan prosedur penggunaannya relatif sederhana (Hasanah dan Putra, 2010). Kelebihan Ca-alginat sebagai matriks adalah dapat membentuk gel yang kokoh, namun masih memiliki kekurangan, karena enzim masih dapat berdifusi keluar matriks melalui pori yang terbentuk. Untuk meminimalisir proses difusi enzim dari matriks Ca-alginat, maka dapat dilapisi kembali dengan larutan kitosan, karena kitosan dapat berfungsi sebagai membran kedua (Mesla dkk., 2014).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. berapa aktivitas enzim α -glukosidase yang diproduksi dari beras ketan hitam (*Oryza sativa* Var. Glutinosa) sebelum dan setelah dimurnikan?
2. bagaimana karakteristik enzim α -glukosidase bebas dan yang telah teramobilisasi dari beras ketan hitam (*Oryza sativa* var. glutinosa)?
3. berapa kali pemakaian ulang optimum enzim α -glukosidase amobil?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui dan mempelajari cara isolasi dan pemurnian serta proses amobilisasi enzim α -glukosidase yang diproduksi dari beras ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) dengan metode mikroenkapsulasi menggunakan matriks Ca-Alginat-Kitosan.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Untuk menjawab permasalahan yang telah dirumuskan, maka penelitian ini bertujuan untuk:

1. menentukan aktivitas enzim α -glukosidase yang diproduksi dari beras ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) sebelum dan setelah dimurnikan.
2. mengetahui pH buffer, suhu, waktu inkubasi, dan konsentrasi substrat optimum, serta pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim α -glukosidase bebas dan yang telah teramobilisasi dari beras ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*).
3. menentukan pemakaian ulang optimum enzim α -glukosidase amobil.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari hasil penelitian ini adalah:

1. memberikan informasi mengenai enzim α -glukosidase yang terdapat dalam beras ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*).
2. memperkaya sumber enzim α -glukosidase untuk keperluan pencarian inhibitor enzim α -glukosidase yang dapat digunakan sebagai senyawa analog obat khususnya dalam pengobatan DM tipe 2.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*)

Beras merupakan hasil olahan dari tanaman padi, yaitu setelah tangkai dan kulit bijinya dilepaskan dengan cara digiling atau ditumbuk. Pengertian beras secara teoritis adalah daging biji dari buah yang tersusun dalam mayang atau setangkai padi. Secara praktis, beras adalah gabah yang bagian kulitnya telah dibuang dengan cara digiling dan disosoh (Damayanti dkk., 2007).

Menurut Grist (1960), beras dalam sistematika tumbuhan diklasifikasikan ke dalam:

Divisio : Spermatophyta
Sub divisio : Angiospermae
Kelas : Monocotyledoneae
Ordo : Poales
Famili : Graminae
Genus : *Oryza* Linn
Species : *Oryza sativa* L.

Beras (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu kekayaan alam di Indonesia yang menyumbang energi, protein dan juga zat besi masing-masing sebesar 63,1%; 37,7% dan 25-30% dari total kebutuhan tubuh. (Yulia dan Casper, 2012). Berdasarkan warna beras, di Indonesia dikenal beberapa jenis beras seperti beras putih, beras hitam, beras merah, dan beras ketan (Tuankotta dkk., 2015).

Beras ketan (*Oryza sativa* L. var. *glutinosa*) merupakan tanaman yang berasal dari Asia yang kini sudah tersebar luas ke seluruh dunia, termasuk

Indonesia. Beras ketan merupakan salah satu varietas *Oryza sativa* L. golongan glutinous rice. Beras ketan digunakan sebagai makanan pokok, dikarenakan kandungan karbohidratnya yang tinggi (Haryadi, 2006). Beras ketan mengandung zat gizi yang cukup tinggi yaitu karbohidrat 80%, lemak 4%, dan air 10%. Pati beras ketan mengandung amilosa sebesar 1% dan amilopektin sebesar 99% (Belitz dkk., 2009).

Beras ketan hitam adalah bahan makanan yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Tuankotta dkk (2015) menyimpulkan bahwa kadar protein yang terkandung dalam tepung beras ketan hitam lebih besar dari kadar protein yang terkandung pada tepung beras putih dan tepung sagu, seperti yang terdapat pada Tabel 1 yang menguraikan kandungan gizi pada beras ketan hitam. Menurut Nailufar dkk (2012) dalam beras ketan hitam terdapat warna antosianin yang dapat digunakan sebagai pewarna alami pada makanan. Warna beras ketan hitam disebabkan oleh sel-sel kulit ari yang mengandung antosianin. Beras ketan hitam seperti pada Gambar 1 merupakan salah satu komoditas pangan yang sangat potensial sebagai sumber karbohidrat, antioksidan, senyawa bioaktif, dan serat yang penting bagi kesehatan (Kadirantau, 2000).



Gambar 1. Beras ketan hitam (Tarwotjo dan Soejoeti, 2008)

Tabel 1. Kandungan gizi beras ketan hitam (Soeharto dan Iman, 2004)

No.	Nilai kandungan	Jumlah (gram)
1	Amilopektin	1,2
2	Kalori	356
3	Protein	7,0
4	Lemak	0,7
5	Serat	3,1
6	Vit C	1,0
7	Vit B1	0,2

Enzim α -glukosidase pada beras terdapat pada dinding sel bersama-sama dengan substrat karbohidratnya dan enzim-enzim lain yang berperan pada metabolisme karbohidrat. Enzim ini berfungsi menghidrolisis oligosakarida (Kita dkk., 1991). Salah satu beras yang dapat dijadikan sumber enzim adalah beras lapuk karena merupakan jenis limbah yang sudah tidak digunakan dan dapat dimanfaatkan, karena pemanfaatannya merupakan salah satu usaha untuk memberi kegunaan terhadap limbah tersebut (Risma, 2012).

2.2 Enzim

Eduard Buchner Pada tahun 1897 menemukan bahwa ekstrak khamir dapat memfermentasikan gula menjadi alkohol alami, menunjukkan bahwa fermentasi berlangsung oleh molekul yang masih berfungsi walaupun sudah dipisahkan dari sel hidup. Frederick W. Kuhne menamai molekul tersebut sebagai enzim. Enzim adalah katalis biologis yang mempercepat reaksi kimia di dalam sel

hidup tanpa mengalami perubahan pada diri sendiri. Reaktan dari suatu reaksi yang dikatalis oleh enzim disebut substrat dan tiap enzim memiliki sifat yang cukup spesifik, dimana bereaksi dengan substrat tertentu atau menghasilkan produk tertentu dari suatu substrat (Budiman, 2011).

Enzim telah banyak dinamai dengan akhiran –ase untuk nama substrat yang dikatalis atau pada kata yang menunjukkan aktivitasnya. Selain itu ada pula yang dinamai oleh penemunya. *Enzyme Commission* menggolongkan enzim ke dalam 6 golongan seperti pada Tabel 2 dengan masing-masing memiliki sub golongan, sesuai dengan jenis reaksi yang dikatalis. Setiap enzim diberikan 4 bagian nomor golongan dan nama sistematis yang menunjukkan reaksi yang dikatalisnya (Budiman 2011).

Tabel 2. Golongan enzim dan reaksi yang dikatalisnya (Budiman, 2011)

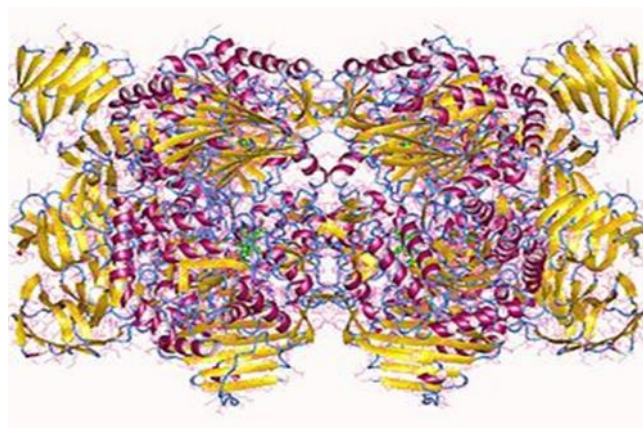
Golongan	Jenis Enzim	Tipe Reaksi
1	Oksidoreduktase	Reaksi reduksi-oksidasi
2	Transferase	Reaksi transfer atom atau gugus
3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis
4	Liase	Reaksi adisi atau pembentukan ikatan rangkap
5	Isomerase	Reaksi isomerasi
6	Ligase	Reaksi kondensasi

2.3 Enzim -glukosidase

Enzim -glukosidase adalah enzim yang berperan pada konversi karbohidrat (oligosakarida) menjadi glukosa. Karbohidrat akan dicerna oleh enzim di dalam mulut dan usus menjadi gula yang lebih sederhana kemudian akan

diserap ke dalam tubuh dan meningkatkan kadar gula darah. Proses pencernaan karbohidrat tersebut menyebabkan pankreas melepaskan enzim α -glukosidase ke dalam usus yang akan mencerna karbohidrat menjadi oligosakarida yang kemudian akan diubah lagi menjadi glukosa oleh enzim α -glukosidase yang dikeluarkan oleh sel-sel usus halus yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh. Dengan dihambatnya kerja enzim α -glukosidase, kadar glukosa dalam darah dapat dikembalikan dalam batas normal (Bosenberg, 2008).

Enzim α -glukosidase (EC 3.2.1.20, α -glukosida glukohidrolase) adalah golongan karbohidrase eksotipe dengan nama trivial yaitu maltase. Enzim-enzim α -glukosidase (maltase, isomaltase, glukomaltase, dan sukrase) berfungsi untuk menghidrolisis oligosakarida dan disakarida pada dinding usus halus (Shinde dkk., 2008). Struktur molekul dari enzim α -glukosidase dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan spesifisitas terhadap substratnya, enzim α -glukosidase dibedakan menjadi α -glukosidase golongan I dan II. α -glukosidase golongan I berasal dari bakteri, yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) dan serangga, sedangkan α -glukosidase golongan II berasal dari *mold*, tumbuhan dan mamalia (Budiman, 2011).



Gambar 2. Struktur molekul enzim α -glukosidase (Wikipedia)

Enzim α -glukosidase tersebar luas pada mamalia, tanaman, serangga, dan mikroorganisme. Tanaman merupakan sumber α -glukosidase yang telah banyak diisolasi dan diteliti, terutama dari golongan sereal (Poaceae atau Gramineae), seperti yang terdapat pada Tabel 3 yang menguraikan beberapa sumber dari enzim α -glukosidase serta aplikasinya. Pada manusia, enzim α -glukosidase terdapat pada membran lisosom sel epitel instine dan berperan pada pencernaan karbohidrat makanan. α -glukosidase dapat memutus ikatan glikosida (1-4) dan (1-6) pada titik percabangan amilopektin dan glikogen menghasilkan glukosa (Risma, 2012).

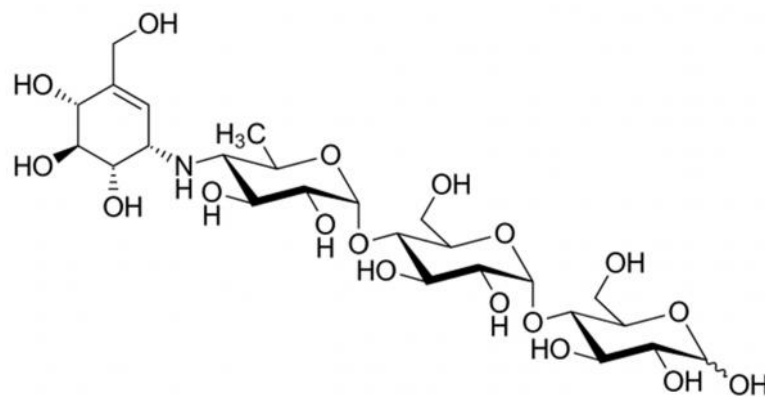
Tabel 3. Sumber dan aplikasi enzim α -glukosidase

Sumber Enzim α -glukosidase	Aplikasi	Sumber
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uji aktivitas antidiabetes	Febriyanti, 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uji aktivitas inhibitor	Zuhro, 2015
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uji kapasitas antioksidan dan aktivitas inhibitor	Febrinda dkk., 2013
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Uji aktivitas inhibisi	Anggriawan dkk., 2015
Beras Lapuk (<i>Oryza sativa</i>)	Uji aktivitas inhibisi	Risma, 2012
Gabah (<i>Oryza sativa</i> var. ciherang)	Uji aktivitas inhibisi	Budiman, 2011

2.4 Inhibitor Enzim α -glukosidase

Inhibitor α -glukosidase (*alpha glucosidase inhibitor, AGI*) merupakan salah satu agen antidiabetik yang bekerja dengan cara menghambat kerja enzim α -glukosidase. Pengurangan penyerapan karbohidrat dari makanan oleh usus halus merupakan sebuah pendekatan terapeutik bagi hiperglikemia postprandial (Febrinda dkk., 2013). Inhibisi kerja enzim α -glukosidase secara efektif dapat

mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks dan absorpsinya, sehingga dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa postprandial pada penderita diabetes (Shinde dkk., 2008). Amilase dan -glukosidase inhibitor sintesis, seperti *acarbose* pada Gambar 3, telah banyak digunakan untuk penanganan pasien diabetes tipe II namun obat ini juga dilaporkan menyebabkan berbagai efek samping (Feng dkk., 2011).



Gambar 3. Struktur *Acarbose* (Bayer, 2008)

2.5 Diabetes Melitus

Diabetes mellitus adalah penyakit yang disebabkan oleh meningkatnya kadar gula dalam darah akibat kekurangan insulin baik absolut maupun relatif. Terdapat dua tipe Diabetes Mellitus, yaitu Diabetes Mellitus (DM) tipe I dan (DM) tipe II. DM tipe I disebabkan kekurangan insulin yang terjadi karena kerusakan sel beta pankreas, sedangkan DM tipe II disebabkan insulin yang tidak dapat bekerja dengan baik (Irawan, 2009).

Gangguan produksi insulin pada DM tipe 1 umumnya terjadi karena kerusakan sel-sel pulau Langerhans yang disebabkan oleh reaksi otoimun. Penanda (*marker*) kerusakan kekebalan sel ditemukan pada diagnosis 90% dari penderita DM dan mencakup sel islet antibodi, antibodi terhadap

dekarboksilase asam glutamat, dan antibodi terhadap insulin. DM tipe ini dapat terjadi pada semua usia, anak-anak sampai orang tua. Penderita yang berusia lebih muda biasanya memiliki tingkat kerusakan sel yang cepat dan menimbulkan ketoasidosis (diabetes akut), sedangkan orang dewasa sering mempertahankan sekresi insulin yang cukup untuk mencegah ketoasidosis selama bertahun-tahun (Dipiro dkk., 2005).

Berbeda dengan DM tipe 1, pada penderita DM tipe 2 terutama yang berada pada tahap awal, umumnya dapat dideteksi jumlah insulin yang cukup di dalam darahnya, disamping kadar glukosa yang juga tinggi. Awal patofisiologi DM tipe 2 bukan disebabkan oleh kurangnya sekresi insulin, tetapi karena sel-sel sasaran insulin gagal atau tak mampu merespon insulin secara normal. Keadaan ini disebut sebagai resistensi insulin (Dipiro dkk., 2005). Resistensi insulin banyak terjadi di negara-negara maju seperti Amerika Serikat, antara lain sebagai akibat dari obesitas, gaya hidup kurang gerak dan penuaan (Depkes, 2005).

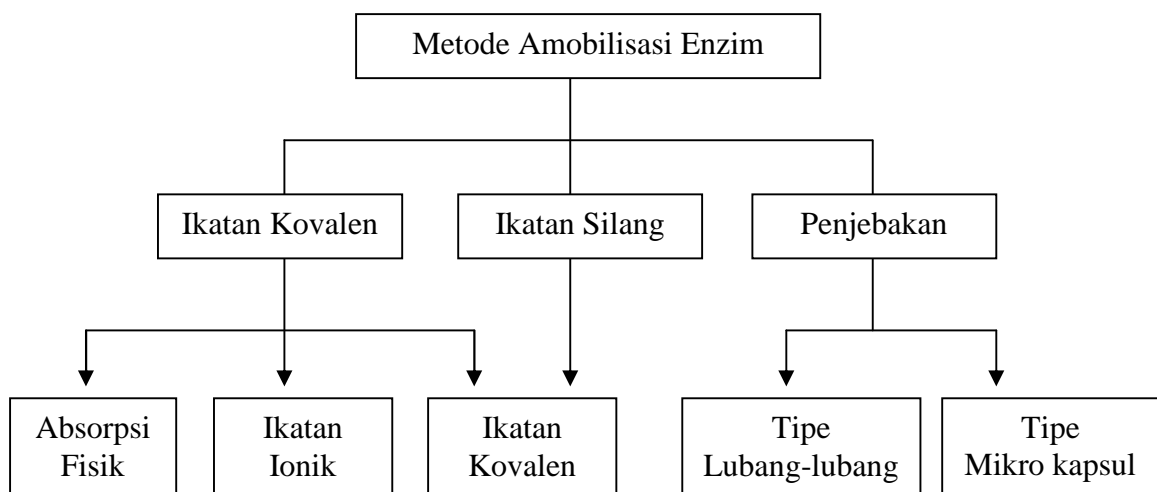
2.6 Amobilisasi

Amobilisasi adalah proses pengendalian pergerakan dan pertumbuhan secara total atau sebagian pada enzim, sel atau organel. Metode amobilisasi yang ideal harus mudah pengerjaannya dan tidak merusak substansi yang mengalami amobilisasi. Faktor-faktor seperti suhu, perubahan pH, dan bahan penyangga selama proses amobilisasi harus ditetapkan kondisi optimumnya. Bahan penyangga yang digunakan bersifat inert dan teraktivasi (Bintang, 2010).

Amobilisasi enzim adalah menggabungkan suatu enzim dengan suatu matriks padat (*support*) sehingga dapat digunakan secara berulang kali secara

kontinyu (Kurniawan dkk., 2014). Amobilisasi enzim dapat mengatasi masalah yang ada pada penggunaan enzim terlarut, seperti keterbatasan stabilitas, pemisahan yang rumit, dan keterbatasan pemakaian ulang. Selain itu, penggunaan enzim amobil dapat memudahkan pengontrolan produk serta pengoperasian secara kontinu (Chrisnasari dkk., 2014). Keuntungan enzim yang diamobilisasi adalah enzim dapat dipisahkan dari campuran reaksi dengan cepat, produksi hasil reaksi dapat diperoleh tanpa terkontaminasi enzim dan enzim yang diperoleh kembali dapat dipakai lagi (Wuryanti, 2006).

Berbagai metode alternatif teknologi amobilisasi enzim telah dikembangkan untuk penentuan kadar glukosa, kolestrol dan berbagai senyawa metabolit lainnya. Hingga saat ini beberapa teknik amobilisasi enzim dikenal. Teknik tersebut antara lain adalah pengikatan silang pada matriks pendukung atau *cross-linking*, penjebakan secara fisik atau *entrapment*, adsorpsi enzim pada permukaan zat padat dan pengikatan secara kovalen pada bahan padat pendukung atau *carrier-binding* (Trau dan Renneberg, 2003). Klasifikasi amobilisasi enzim dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Tipe-tipe amobilisasi enzim (Bintang, 2010).

Salah satu metode amobilisasi adalah metode *entrapment* (penjebakan), yaitu dengan melokalisasi enzim dalam kisi matriks atau mikrokapsul (membran semipermeabel) namun tetap mempertahankan kemampuan enzim untuk menerima substrat (Mesla dkk., 2014). Masalah yang menarik agar enzim diamobilisasi jika jumlah substrat sangat besar dan enzim yang digunakan mahal (Wuryanti, 2006).

Salah satu matriks yang biasa digunakan untuk metode penjebakan adalah Ca-alginat. Alginat digunakan untuk menjebak enzim karena kemampuannya untuk membentuk gel cukup besar sehingga enzim yang berukuran besar dapat terjebak di dalamnya. Selain itu, alginat dipilih sebagai agen pengamobil karena tidak beracun, harganya murah, mekanisme kestabilannya cukup tinggi, porositasnya tinggi, dan prosedur penggunaannya relatif sederhana (Hasanah dan Putra, 2010). Kelebihan Ca-alginat sebagai matriks adalah dapat membentuk gel yang kokoh, dan dapat dilakukan pada suhu ruang. Namun metode ini memiliki kekurangan yaitu enzim masih dapat berdifusi keluar matriks melalui pori yang terbentuk di dalam struktur gel alginat dengan ion kalsium. Untuk meminimalisir proses difusi enzim dari matriks Ca-alginat, manik Ca-alginat dapat dilapisi kembali dengan larutan kitosan. Ca-alginat terlapisi kitosan merupakan metode mikroenkapsulasi yang bertujuan untuk meminimalisir proses difusi enzim dari matriks Ca-alginat tersebut (Mesla dkk., 2014).

Kitosan adalah produk deasetilasi kitin yang merupakan polimer rantai panjang glukosamin (2-amino-2-deoksi-D-Glukosa), memiliki rumus molekul $[C_6H_{11}NO_4]_n$. Kitosan berbentuk serpihan putih kekuningan, tidak berbau, tidak berasa, dan tidak larut dalam air. Salah satu cara mengatasi kelemahan dalam penggunaan enzim adalah melalui amobilisasi enzim yaitu mengikatkan

enzim pada bahan pendukung yang tidak larut dalam air (Amalia dan Nawfa, 2010). Sebagai matriks pendukung pada proses imobilisasi enzim, kitosan mempunyai beberapa keuntungan karena mudah didapat, prosedur isolasinya mudah, tidak beracun dan tidak membahayakan. Kitosan merupakan polimer alam yang dapat berikatan secara *crosslink* apabila ditambahkan *crosslinked agent* (Sarah, 2001).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah beras ketan hitam sebagai sumber enzim, akuades, KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH 1 N, buffer asetat, buffer posfat, Na-asetat trihidrat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2CO_3 , NaOH, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KNa-Tartrat, pereaksi follin-ciocalteau, Bovin Serum Albumin (BSA), p-nitrofenil α -Dglukopiranosida (PNPG), Na-EDTA, $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, larutan alginat, CaCl_2 0,15 M, natrium tripolifosfat, kertas saring Whatman no 40, kain kasa, kertas pH universal (Merck), *aluminium foil*, *tissue roll*, kertas label.

3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah spektrometri 20 D⁺ (Thermo), neraca analitik (Ohaus), mikropipet, penangas air, termometer, mesin blender (Kirin), *magnetic stirrer*, mikropipet sentrifuge dingin, ayakan 80-100 mesh, membran selofan untuk dialisis, pH meter (Merck), dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari-Agustus 2017 di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Bioteknologi Terpadu Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel, Isolasi dan Penentuan pH Optimum (Risma, 2012)

Beras ketan hitam dihancurkan menjadi tepung menggunakan blender, kemudian disaring dengan ayakan (ukuran 80-100 Mesh). Tepung beras ketan hitam sebanyak 400 gram ditambahkan 1 L buffer asetat pH 5,00; diaduk dengan *stirer* yang dilengkapi dengan *icebath* selama 1 jam dan didiamkan \pm 12 jam dalam lemari pendingin, disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C, disaring dengan kain kasa. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang akan diuji aktivitasnya. Diulangi prosedur yang sama dengan variasi buffer posfat pH 6,00 sampai pH 8,00. Skema kerja terlihat pada Lampiran 1.

3.4.2 Uji Aktivitas Enzim α -glukosidase (Sigma Aldrich, 1996)

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi pH ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit, kemudian diambil 2 mL campuran tersebut dan ditambahkan 8 mL Na₂CO₃ 100 mM, diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks} .

$$\text{Aktivitas Enzim} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{A \text{ sampel} - A \text{ blanko} \times V_a \times V_t}{K_f \times t \times V_c \times V_e} \quad (1)$$

Keterangan:	A sampel	= Absorbansi sampel
	A blanko	= Absorbansi blanko
	Vt	= V. enzim + substrat + buffer
	Va	= Volume total yang dianalisis
	Ve	= Volume enzim yang dianalisis
	Vc	= Volume campuran yang dianalisis
	Kf	= Koefisien ekstingsi molar
	t	= Waktu inkubasi

3.4.3 Uji Kadar Protein Enzim α -glukosidase (Lowry dkk., 1951)

Kadar protein ditentukan menggunakan metode Lowry dengan terlebih dahulu disiapkan larutan Lowry A dan Lowry B. Lowry A dibuat dengan pencampuran antara Follin Ciocalteus dengan akuades dengan perbandingan 1:1, sedangkan Lowry B dibuat dengan pencampuran antara Na_2CO_3 dalam NaOH 0,1 N; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%; dan Na-K-Tartrat 2% dengan perbandingan 100:1:1. Penentuan kadar protein dilakukan dengan 2 mL larutan enzim, kemudian ditambahkan 2,75 mL Lowry B, lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 15 menit, setelah itu ditambahkan 0,25 mL Lowry A lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm.

3.4.4 Pemurnian Enzim α -glukosidase dengan Metode Fraksinasi Amonium Sulfat (Bollag dan Edelstein, 1991)

Ekstrak kasar enzim ditempatkan pada wadah yang dilengkapi dengan pengocok *stirer* dalam keadaan dingin menggunakan *icebath*, ditambahkan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-20% sedikit demi sedikit. Selama proses penambahan garam, pengadukan dilakukan secara konstan dan setelah penambahan garam yang terakhir pengadukan masih dilanjutkan hingga 20 menit, kemudian didiamkan \pm 20 jam pada suhu 4 °C, disentrifuge 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C, dipisahkan supernatan dan endapannya, endapan ini disebut dengan fraksi I. Supernatan difraksinasi lebih jauh dengan ditambahkan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-40% sampai 80-100% untuk mendapatkan fraksi II-V sesuai dengan tingkat kejenuhan dari 20-40% sampai 80-100%. Ekstrak kasar dari fraksi I-V serta filtrat sisa selanjutnya diuji aktivitasnya dan ditentukan kadar proteinnya.

3.4.5 Dialisis Enzim α -glukosidase dengan Membran Selofan (Stryer, 1995)

3.4.5.1 Preparasi Membran Selofan

Sebelum digunakan membran selofan terlebih dahulu direbus dalam campuran Na-bikarbonat 2% dengan EDTA 1 mM selama 10 menit, kemudian larutan diganti dengan akuades dan kembali direbus selama 10 menit. Membran selofan siap digunakan untuk proses dialisis.

3.4.5.2 Dialisis Enzim α -glukosidase

Fraksi dengan aktivitas spesifik paling tinggi selanjutnya didialisis. Fraksi dimasukkan ke dalam membran selofan, bagian atas dan bagian bawah membran selofan diikat, kemudian direndam dalam larutan buffer dengan konsentrasi 10 kali lebih encer dari pada buffer larutan enzim, dilakukan dialisis selama 10 jam dalam keadaan dingin sambil diaduk dengan *magnetik stirrer*. Setiap 2 jam sekali dialisat diganti, setiap dialisat yang dikeluarkan diuji dengan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 2% untuk mengetahui apakah masih terdapat garam, dialisis dihentikan apabila dialisat sudah tidak mengandung garam yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan. Kemudian dilakukan pengukuran volume larutan enzim, pengujian aktivitas enzim, dan pengujian kadar protein enzim. Setelah itu diperoleh data enzim hasil pemurnian.

3.4.6 Karakterisasi Enzim α -glukosidase (Sigma Aldrich, 1996)

3.4.6.1 Penentuan pH Optimum

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim hasil pemurnian ditambahkan dengan 5 mL buffer asetat pH 5,00 ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit, kemudian diambil 2 mL campuran tersebut dan ditambahkan 8 mL Na_2CO_3 100 mM, diukur serapannya

dengan spektrofotometer pada λ_{maks} . Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1). Diulangi prosedur yang sama dengan variasi buffer posfat pH 6,00 sampai pH 8,00.

3.4.6.2 Penentuan Suhu Optimum

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim hasil pemurnian ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM, diinkubasi pada suhu 20 °C selama 20 menit, kemudian diambil 2 mL campuran tersebut dan ditambahkan 8 mL Na₂CO₃ 100 mM, diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks} . Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1). Diulangi prosedur yang sama dengan variasi suhu 25-50 °C.

3.4.6.3 Penentuan Pengaruh Waktu Inkubasi

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim hasil pemurnian ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit, kemudian diambil 2 mL campuran tersebut dan ditambahkan 8 mL Na₂CO₃ 100 mM, diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks} . Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1). Diulangi prosedur yang sama dengan variasi waktu 10-30 menit.

3.4.6.4 Penentuan Pengaruh Konsentrasi Substrat

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim hasil pemurnian ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL PNPG dengan konsentrasi 1 mM, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit, kemudian diambil 2 mL campuran tersebut dan ditambahkan 8 mL Na₂CO₃ 100 mM, diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks} . Dihitung aktivitas

enzimnya dengan persamaan (1). Diulangi prosedur yang sama dengan variasi konsentrasi substrat 2-10 mM.

3.4.6.5 Penentuan Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim hasil pemurnian ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,2 mL larutan logam $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dengan variasi konsentrasi 10, 50 dan 250 mM, ditambahkan 0,5 mL PNPG dengan konsentrasi 10 mM, diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit, kemudian diambil 2 mL campuran tersebut dan ditambahkan 8 mL Na_2CO_3 100 mM, diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks} . Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1). Diulangi prosedur yang sama dengan variasi logam ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dengan variasi konsentrasi 10, 50, dan 250 mM.

3.4.7 Amobilisasi Enzim α -glukosidase (Mesla dkk., 2014)

Sebanyak 2 mL larutan enzim dicampurkan dengan 8 mL larutan alginat dengan konsentrasi 3%, campuran enzim dan larutan alginat diteteskan menggunakan *syringe* 10 mL ke dalam gelas kimia yang berisi 10 mL larutan CaCl_2 sambil diaduk dengan pengaduk *magnetik stirer*, kemudian manik-manik yang telah terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl_2 0,15 M selama 1 jam. Manik-manik yang terbentuk dipisahkan dari larutan dengan menggunakan kertas saring Whatman no 40, manik-manik selanjutnya disuspensikan dalam larutan kitosan 1,5%, kemudian diteteskan ke dalam larutan natrium tripolifosfat 3%, manik-manik disimpan dalam larutan natrium tripolifosfat tersebut selama 90 menit kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no 40. Enzim amobil yang diperoleh dikarakterisasi dengan cara yang sama dengan enzim bebas.

3.4.8 Pengaruh Perulangan Pemakaian Enzim α -glukosidase Amobil

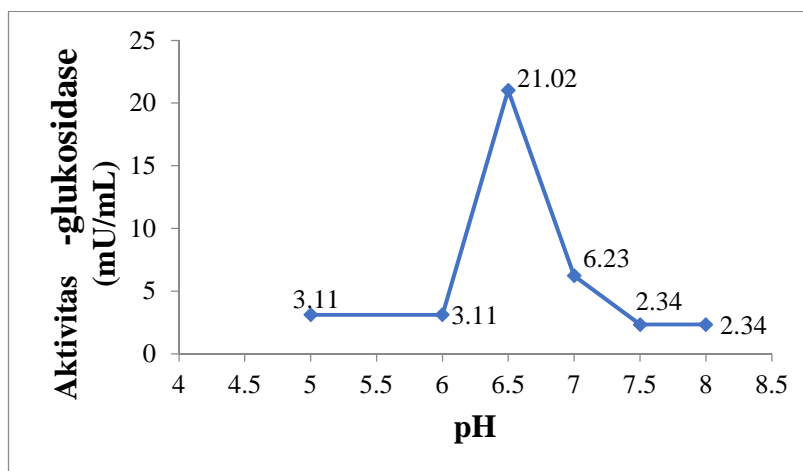
Sebanyak 0,2 mL larutan enzim teramobil ditambahkan 5 mL buffer hasil optimasi ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL PNPG dengan konsentrasi 10 mM, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit, kemudian diambil 2 mL campuran tersebut dan ditambahkan 8 mL Na₂CO₃ 100 mM, diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks} . Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1). Diulangi prosedur tersebut menggunakan enzim amobil yang sama.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penentuan pH Buffer Optimum Ekstrak Kasar Enzim α -glukosidase

Beras ketan hitam yang merupakan sumber enzim α -glukosidase dicari kondisi pH optimum, dimana pH yang digunakan bervariasi yaitu pH 5,00 (dengan buffer asetat), pH 6,00; 6,50; 7,00; 7,50; dan 8,00 (dengan buffer fosfat). Penggunaan jenis buffer yang berbeda disebabkan karena masing-masing buffer memiliki kapasitas yang berbeda-beda. Buffer fosfat memiliki kapasitas minimum pH 5,6 sedangkan buffer asetat memiliki kapasitas minimum pH 3,5. Proses tersebut menghasilkan data yang ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak kasar α -glukosidase pada suhu 37 °C dengan [S] 10 mM dan waktu inkubasi 20 menit.

Data pada Gambar 5 dapat dilihat bahwa aktivitas ekstrak kasar enzim α -glukosidase yang paling tinggi berada pada buffer pH 6,5 yaitu sebesar 21,02 mU/mL. Dari pH optimum yang diperoleh dapat diketahui bahwa untuk mengekstrak enzim α -glukosidase dari beras ketan hitam dibutuhkan buffer dalam

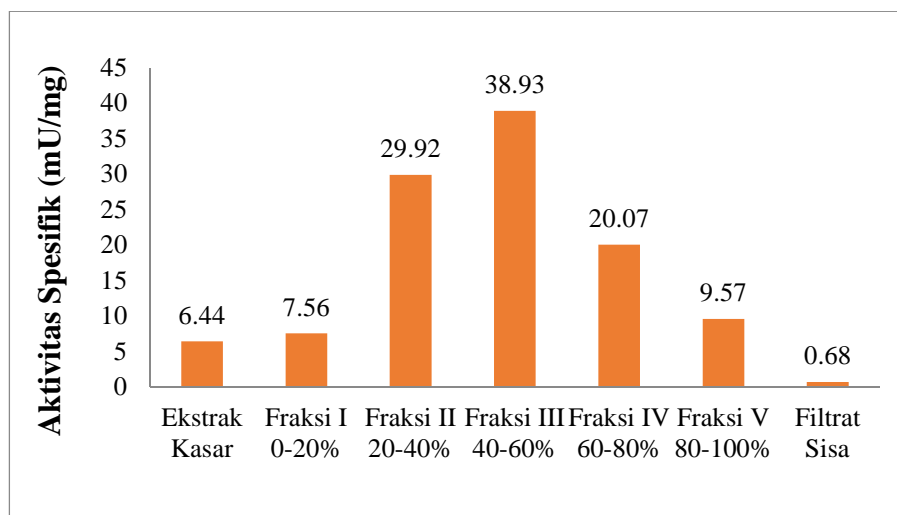
keadaan sedikit asam, karena sifat fisiologis dari enzim tersebut berada pada pH netral atau sedikit asam. Aktivitas enzim pada pH 7 mengalami penurunan yang cukup jauh, diikuti dengan buffer pH 7,5 dan pH 8. Hal tersebut disebabkan karena kondisi enzim tersebut sudah tidak berada pada sifat fisiologis sehingga membuat aktivitas enzim terganggu dan mengalami penurunan. Perhitungan aktivitas ekstrak kasar enzim α -glukosidase pada berbagai nilai pH dapat dilihat pada Lampiran 8.

Hasil yang diperoleh pada penelitian kali ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Risma dan Budiman. Penelitian yang dilakukan oleh Risma pada tahun (2012) yaitu pH buffer optimum yang digunakan untuk mengekstrak enzim kasar dari tepung beras lapuk berada pada pH 6,00 dengan aktivitas sebesar 89,9 mU/mL. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Budiman pada tahun (2011) pH buffer optimum yang digunakan untuk mengekstrak enzim kasar dari tepung gabah yaitu pH 8 dengan aktivitas sebesar 0,381 U/mL. Dari hasil tersebut terjadi perbedaan pH optimum buffer yang digunakan untuk mengekstrak enzim kasar, hal tersebut disebabkan karena sumber enzim yang berbeda yaitu tepung beras lapuk, tepung gabah, dan tepung beras ketan lapuk.

4.2 Pemurnian Awal Enzim α -glukosidase dengan Metode Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Tahap penelitian selanjutnya yaitu pemurnian ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar α -glukosidase yang telah diperoleh kemudian dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan garam amonium sulfat. Fraksinasi bertingkat dilakukan dengan tingkat kejenuhan yaitu 0-20% (fraksi I), 20-40% (fraksi II), 40%-60% (fraksi III), 60-80% (fraksi IV), dan 80-100% (fraksi V). Garam amonium sulfat

digunakan untuk memurnikan enzim karena konsentrasi garam yang tinggi menyebabkan terjadinya interaksi yang kuat antara garam amonium sulfat yang higroskopis dengan air. Hal ini menyebabkan berkurangnya interaksi antara protein dengan air sehingga protein mengalami presipitasi dari larutan dan protein menjadi terpisah dari mono dan oligosakarida, sedangkan protein yang lainnya tetap berada dalam larutan (Palmer, 1991). Pada tahap fraksinasi dengan garam amonium sulfat akan dihasilkan supernatan dan endapan atau disebut dengan fraksi yang kemudian akan diuji aktivitas dan kadar proteinnya. Pada tahap ini dihasilkan data yang dapat dilihat pada Gambar 6.



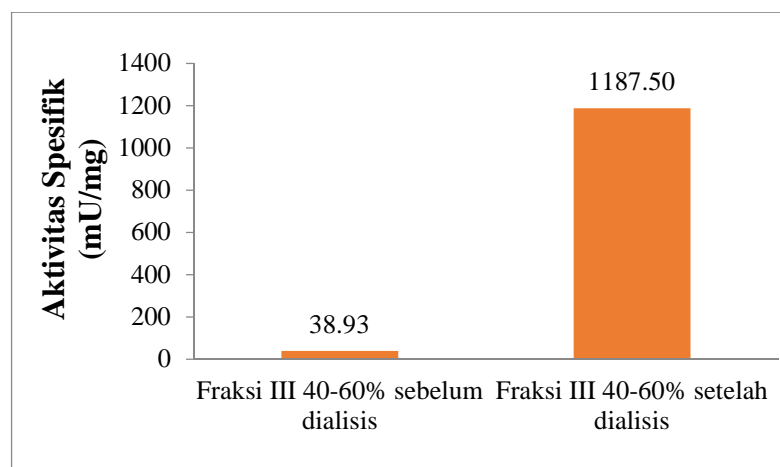
Gambar 6. Tahapan fraksinasi terhadap aktivitas spesifik enzim α -glukosidase

Data pada Gambar 6 terlihat bahwa aktivitas spesifik enzim α -glukosidase yang tertinggi berada pada fraksi III (40-60%) yaitu sebesar 38,93 mU/mg. Pada fraksi I (0-20%) aktivitas spesifik enzim α -glukosidase tidak meningkat terlalu tinggi, hal ini disebabkan karena pada fraksi I kemungkinan besar yang mengendap lebih banyak adalah protein dibandingkan dengan enzim, begitupun dengan fraksi II (20-40%). Pada fraksi IV dengan tingkat kejenuhan 60-80%

sampai dengan filtrat sisa dapat dilihat aktivitas spesifik enzim terus mengalami penurunan yang kemungkinan disebabkan karena enzim α -glukosidase sudah habis mengendap dan pada filtrat sisa kadar protein yang dihasilkan sangat tinggi yaitu 3,99 mg/mL sehingga aktivitas spesifik enzim tersebut sangat rendah sebesar 0,68 mU/mg. Pada filtrat sisa, protein yang tidak ikut mengendap lebih banyak dibandingkan enzim, sehingga membuat aktivitas enzim mengalami penurunan. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa setiap jenis protein memiliki kelarutan yang berbeda dalam air sehingga penambahan garam dengan kejenuhan tertentu dapat menyebabkan terjadinya pengendapan protein tertentu dengan tidak mengendapkan protein yang lainnya (Poedjiadi, 1994). Perhitungan aktivitas enzim dengan tingkat kejenuhan yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 9.

4.3 Dialisis Enzim α -glukosidase

Tahap selanjutnya yaitu dialisis enzim α -glukosidase, dimana fraksi III (40-60%) dengan aktivitas spesifik sebesar 38,93 mU/mg dilanjutkan pada tahap dialisis menggunakan membran selofan. Tujuan dari proses dialisis enzim adalah untuk menghilangkan kelebihan garam amonium sulfat yang turut mengendap bersama dengan protein. Data hasil dialisis dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Aktivitas spesifik α -glukosidase sebelum dan setelah dialisis

Hasil dari proses dialisis enzim pada fraksi III, setelah dialisis memiliki aktivitas spesifik yang lebih tinggi yaitu sebesar 1187,50 mU/mg, sedangkan sebelum dialisis aktivitas spesifik enzim yaitu sebesar 38,93 mU/mg dengan perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 10. Hal tersebut terjadi karena kadar protein setelah dialisis mengalami penurunan yang disebabkan pada proses dialisis semua molekul berbobot rendah keluar dari sampel melalui membran selofan. Tujuan dari proses dialisis yaitu untuk menghilangkan kelebihan garam yang ikut mengendap, maka protein yang molekulnya rendah akan ikut keluar melalui membran selofan, sehingga kurangnya kadar protein setelah dialisis membuat aktivitas spesifik enzim α -glukosidase pada fraksi III sangat tinggi dibandingkan dengan sebelum dialisis dengan tingkat kemurnian dapat dilihat pada Tabel 4.

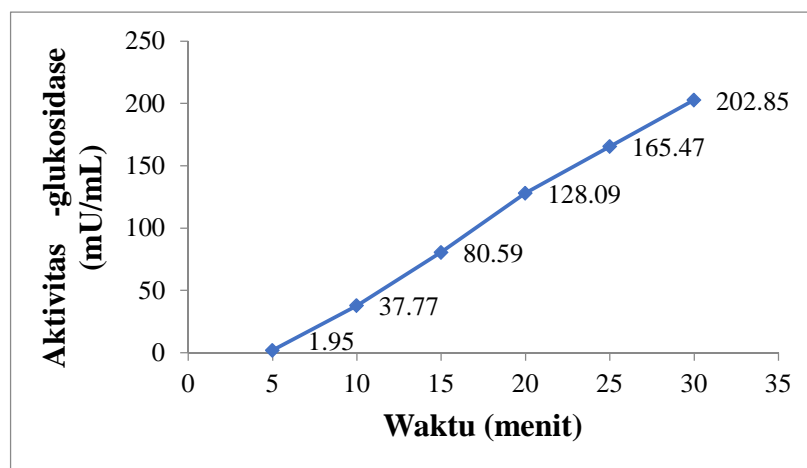
Tabel 4. Tahapan fraksinasi terhadap aktivitas spesifik α -glukosidase

Tahapan Pemurnian	Aktivitas (mU/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (mU/mg)	Tingkat Kemurnian (%)
Ekstrak Kasar	21,02	3,27	6,44	1,00
Fraksi I 0-20%	36,60	4,84	7,56	1,17
Fraksi II 20-40%	52,95	1,77	29,92	4,65
Fraksi III 40-60%	38,93	1,00	38,93	6,05
Fraksi IV 60-80%	26,09	1,30	20,07	3,12
Fraksi V 80-100%	11,29	1,18	9,57	1,49
Filtrat Sisa	2,73	3,99	0,68	0,11
Fraksi III setelah dialisis	47,50	0,04	1187,50	184,41

4.4 Karakterisasi Enzim α -glukosidase Bebas

4.4.1 Pengaruh Waktu Inkubasi

Karakterisasi enzim α -glukosidase bebas dengan menentukan pengaruh waktu inkubasi. Waktu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kerja enzim. Penentuan pengaruh waktu kerja enzim dilakukan sesuai dengan prosedur pada penentuan aktivitas enzim dengan pH buffer 6,5 serta konsentrasi substrat 10 mM, suhu yang digunakan 37 °C dengan waktu inkubasi yang bervariasi yaitu 5-30 menit. Data yang dihasilkan dari penentuan pengaruh waktu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 8.

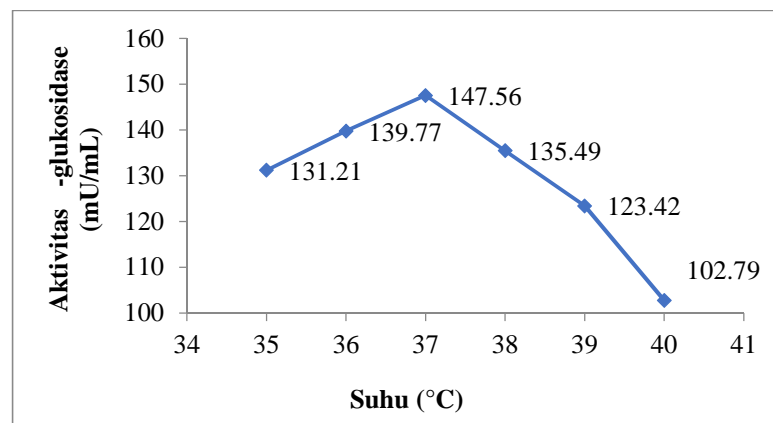


Gambar 8. Grafik pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas α -glukosidase bebas pada kondisi pH 6,5 suhu 37 °C dengan [S] 10 mM.

Berdasarkan data yang diperoleh pada Lampiran 11, dimana aktivitas enzim terus meningkat seiring dengan lama waktu inkubasi. Variasi waktu yang digunakan dari 5–30 menit tidak menunjukkan adanya waktu optimum karena waktu yang makin panjang terus meningkatkan aktivitas enzim. Tidak menutup kemungkinan bahwa waktu yang makin panjang dapat menyebabkan aktivitas enzim menjadi menurun akibat sudah jenuhnya sisi aktif enzim oleh substrat sehingga aktivitas enzim terganggu dan mengalami penurunan.

4.4.2 Penentuan Suhu Optimum

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kerja enzim. Penentuan suhu optimum kerja enzim α -glukosidase dilakukan sesuai dengan prosedur yang dilakukan pada penentuan aktivitas enzim dengan menggunakan pH buffer 6,5 serta konsentrasi substrat 10 mM dan lama waktu inkubasi selama 20 menit, kemudian divariasikan suhu yang digunakan yaitu 35-40 °C. Hasil penentuan suhu optimum kerja enzim α -glukosidase yang diproduksi dari beras ketan hitam dapat dilihat pada Gambar 9.

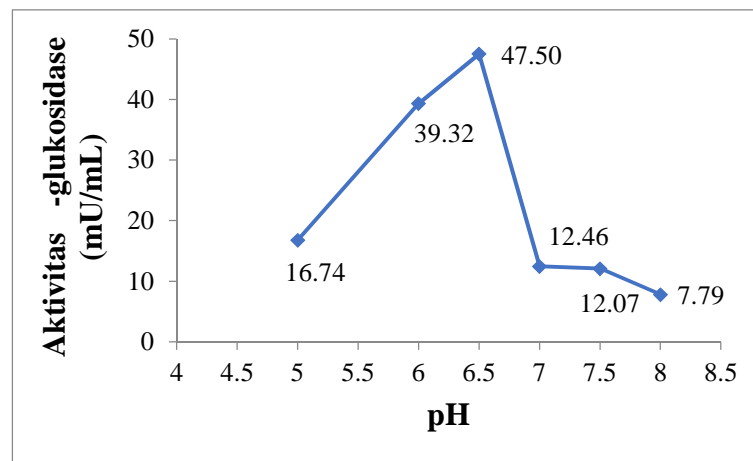


Gambar 9. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas α -glukosidase bebas pada kondisi pH 6,5 dengan [S] 10 mM dan waktu inkubasi 20 menit.

Data pada Gambar 9 dapat dilihat bahwa suhu optimum dari aktivitas kerja enzim α -glukosidase berada pada suhu 37 °C sebesar 147,56 mU/mL. Pada suhu 35-36 °C aktivitas enzim terus meningkat sehingga mencapai keadaan optimum pada suhu 37 °C, sedangkan pada suhu 38-40 °C aktivitas enzim mengalami penurunan. Pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat sehingga aktivitas enzim terus mencari keadaan optimum, sedangkan pada suhu tinggi biasanya terjadi denaturasi yang menyebabkan bagian aktif enzim menjadi terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan mengalami penurunan.

4.4.3 Penentuan pH Buffer Optimum

pH merupakan salah satu yang mempengaruhi kerja enzim. Penentuan pH optimum kerja enzim α -glukosidase dilakukan sesuai dengan prosedur pada penentuan aktivitas enzim dengan pH buffer yang digunakan bervariasi yaitu pH 5; 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8 serta konsentrasi substrat 10 mM dan lama waktu inkubasi selama 20 menit dengan suhu 37 °C. Data yang dihasilkan dari pH optimum kerja enzim α -glukosidase dapat dilihat pada Gambar 10.



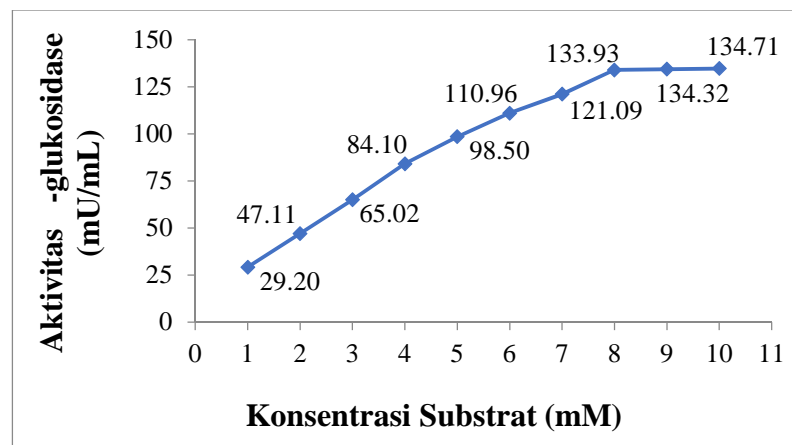
Gambar 10. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas enzim α -glukosidase bebas pada kondisi suhu 37 °C, [S] 10 mM dan waktu inkubasi 20 menit.

Data yang dihasilkan dari penentuan pH buffer optimum terdapat pada Lampiran 11. Grafik pada Gambar 10 menjelaskan bahwa pH optimum dari aktivitas enzim α -glukosidase bebas yang berada pada pH 6,5 memiliki aktivitas sebesar 47,50 mU/mL. pH optimum yang diperoleh pada karakterisasi enzim α -glukosidase bebas sesuai dengan pH optimum yang diperoleh pada ekstrak kasar enzim α -glukosidase yaitu pada pH 6,5 dengan aktivitas sebesar 21,02 mU/mL. Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan pH biasanya disebabkan oleh perubahan ionisasi enzim, substrat, atau kompleks enzim-substrat. Ketika pH

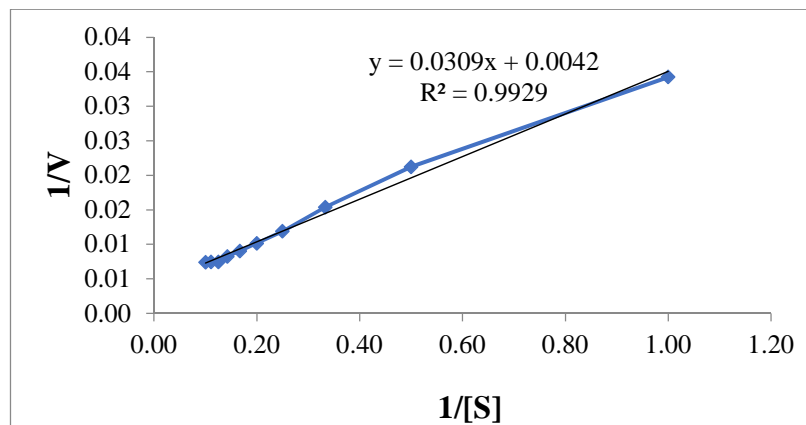
lingkungan berubah, maka struktur tiga dimensi protein akan terganggu sehingga perubahan pH akan menyebabkan proses denaturasi protein (Whitaker, 1996).

4.4.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat

Setelah karakterisasi enzim dengan menentukan waktu, pH dan suhu optimum, selanjutnya yaitu pengaruh konsentrasi substrat. Untuk menentukan parameter kinetika enzim, nilai yang perlu diketahui adalah K_m dan V_{max} . Pada penelitian ini, substrat PNPG divariasikan dengan konsentrasi 1–10 mM. Kemudian dilakukan uji aktivitas seperti prosedur sebelumnya pada kondisi pH optimum 6,5 dan suhu 37 °C dengan waktu inkubasi selama 20 menit. Data yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas α -glukosidase bebas pada kondisi pH 6,5 suhu 37 °C, dan waktu inkubasi 20 menit.



Gambar 12. Grafik hubungan antara $1/[S]$ terhadap $1/V$

Dari data yang diperoleh pada penelitian ini, kondisi optimum berada pada konsentrasi substrat 8 mM dengan aktivitas sebesar 133,93 mU/mL, setelah konsentrasi tersebut aktivitas menjadi konstan. Untuk mengetahui nilai V_{max} dan K_m yaitu didasarkan pada hubungan konsentrasi substrat dan aktivitas enzim. Hubungan antara konsentrasi substrat [S] dan aktivitas enzim V dapat dilihat pada Gambar 11, dimana nilai V terus meningkat sejalan dengan meningkatnya konsentrasi [S], dan pada konsentrasi 8-10 aktivitas enzim mulai konstan. Untuk menentukan nilai V_{max} dan K_m maka digunakan persamaan kurva

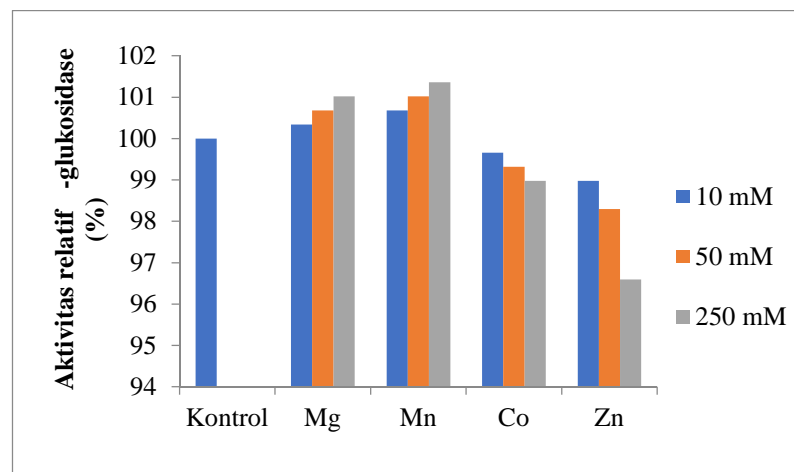
$$\text{Lineweaver-Burk: } \frac{1}{V} = \frac{K}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

Persamaan garis regresi grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$ dapat dilihat pada Gambar 12. Dari persamaan regresi $Y=0,030x + 0,004$, maka diperoleh $1/V_{max} = 0,004$, sehingga $V_{max} = 250$ mM/menit dan $K_m/V_{max} = 0,030$, sehingga $K_m = 7,5$ mM. Data perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 11.

Data pada Gambar 11 dapat dilihat aktivitas enzim -glukosidase terus meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, tetapi menjadi konstan pada konsentrasi substrat 8–10 mM. Hal tersebut terjadi karena reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat [S], akan tetapi setelah [S] meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap yaitu dimana kecepatan enzimatik tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya [S] yang disebut dengan kecepatan maksimum (V_{max}). Penentuan nilai V_{max} akan menghasilkan nilai K_m , yaitu kecepatan reaksi enzimatik ketika telah mencapai setengah dari kecepatan maksimum. Apabila nilai K_m kecil, berarti afinitas enzim terhadap substrat tinggi, sedangkan jika nilai K_m besar afinitas enzim terhadap substrat rendah.

4.4.5 Pengaruh Ion Logam

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah aktivator dan inhibitor. Ion logam yang digunakan pada penelitian ini adalah ion Mg, Mn, Co, dan Zn. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Risma pada tahun (2012) ion logam tersebut diduga dapat mempengaruhi aktivitas dari enzim -glukosidase. Penentuan pengaruh ion logam dilakukan sesuai dengan prosedur penentuan aktivitas enzim dengan penambahan ion logam yang bervariasi. Pengaruh ion logam pada aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Grafik hubungan pengaruh konsentrasi ion logam terhadap aktivitas -glukosidase bebas pada pH 6,5 suhu 37 °C dengan [S] 8 mM, dan waktu inkubasi 20 menit.

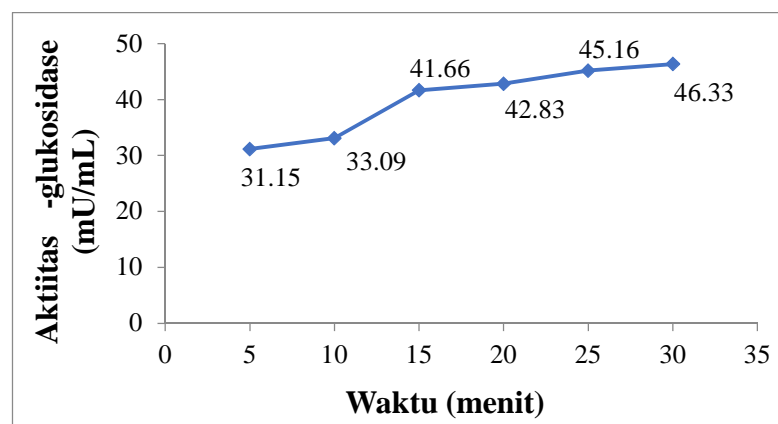
Data dari Gambar 13 dapat dilihat bahwa ion logam Mg dan Mn merupakan aktivator enzim -glukosidase karena ion logam tersebut dapat meningkatkan aktivitas enzim. Pada ion logam Mg aktivitas enzim semakin tinggi dengan penambahan konsentrasi, sehingga aktivitas enzim yang tertinggi diperoleh pada konsentrasi ion logam 250 mM sebesar 101,02 mU/mL, sama halnya dengan ion logam Mn yang aktivitas tertingginya terdapat pada konsentrasi ion logam 250 mM sebesar 101,36 mU/mL. Data aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi ion logam dapat dilihat pada Lampiran 11.

Pengaruh ion logam Co dan Zn jika dilihat pada grafik, logam tersebut dapat berperan sebagai inhibitor yang menghambat aktivitas enzim, sehingga dengan penambahan konsentrasi ion logam aktivitas enzim semakin menurun. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini dengan pengaruh ion logam sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Risma pada tahun (2012) yang menyatakan bahwa ion logam Mg dan Mn berperan sebagai aktivator, sedangkan Co dan Zn berperan sebagai inhibitor.

4.5 Karakterisasi Enzim Amobil

4.5.1 Pengaruh Waktu Inkubasi

Enzim α -glukosidase yang telah dimurnikan kemudian diamobilisasi dengan menggunakan matriks Ca-alginat-kitosan secara mikroenkapsulasi. Tujuan dari amobilisasi enzim adalah menggabungkan suatu enzim dengan matriks padat (*support*) sehingga dapat digunakan secara berulang (Kurniawan dkk., 2014). Enzim α -glukosidase amobil selanjutnya dikarakterisasi dengan menentukan pengaruh waktu inkubasi sesuai dengan prosedur penentuan aktivitas enzim α -glukosidase bebas. Variasi waktu yang digunakan yaitu 5-30 menit. Data yang diperoleh dari aktivitas enzim amobil dapat dilihat pada Gambar 14.

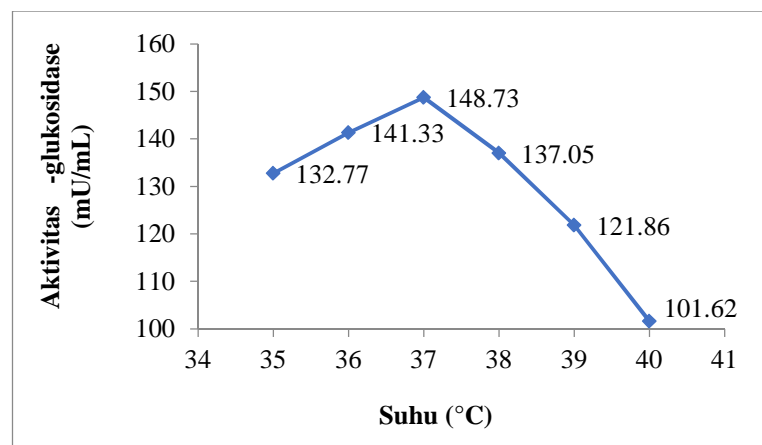


Gambar 14. Grafik pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas α -glukosidase amobil pada kondisi pH 6,5 suhu 37 °C dengan [S] 8 mM.

Data yang diperoleh pada Gambar 14 yaitu aktivitas enzim α -glukosidase yang telah diamobilisasi terus mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Pengaruh waktu terhadap aktivitas enzim amobil sama dengan pengaruh waktu terhadap aktivitas enzim bebas, dimana aktivitas enzim terus mengalami peningkatan dengan penambahan waktu inkubasi sehingga tidak diperoleh waktu optimum.

4.5.2 Penentuan Suhu Optimum

Karakterisasi selanjutnya yaitu penentuan suhu optimum. Penentuan suhu optimum kerja enzim amobil dilakukan sesuai dengan prosedur penentuan aktivitas enzim α -glukosidase bebas. Variasi suhu yang digunakan yaitu 35-40 °C dengan kondisi pH 6,5 dan lama waktu inkubasi selama 20 menit dengan [S] 8 mM. Data yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 15.



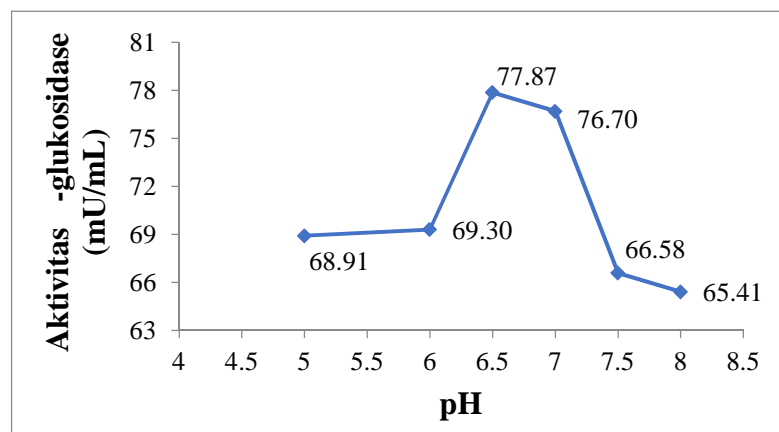
Gambar 15. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas α -glukosidase amobil pada kondisi pH 6,5 dengan [S] 8 mM, dan waktu inkubasi 20 menit.

Dapat dilihat data yang diperoleh pada Gambar 15 bahwa suhu optimum enzim α -glukosidase yang telah diamobilisasi berada pada suhu 37 °C dengan aktivitas sebesar 148.73 mU/mL. Aktivitas enzim amobil mengalami penurunan

yang sangat jauh pada suhu 38 °C dengan aktivitas sebesar 137.05 mU/mL, hal tersebut terjadi karena pada suhu tinggi, biasanya terjadi denaturasi yang menyebabkan bagian sisi aktif enzim terganggu dan aktivitas enzim akan mengalami penurunan. Data yang diperoleh pada pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim -glukosidase amobil sama dengan data yang diperoleh pada pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim -glukosidase bebas yaitu pada suhu optimum 37 °C.

4.5.3 Penentuan pH Buffer Optimum

Tahap karakterisasi selanjutnya yaitu penentuan pH buffer optimum. Enzim -glukosidase yang telah diamobilisasi selanjutnya dikarakterisasi dengan cara ditentukan pH buffer optimum sesuai dengan prosedur yang dilakukan pada aktivitas enzim bebas sebelumnya dengan pH yang digunakan bervariasi yaitu pH buffer 5–8. Data yang diperoleh dari penentuan pH buffer optimum dapat dilihat pada Gambar 16.



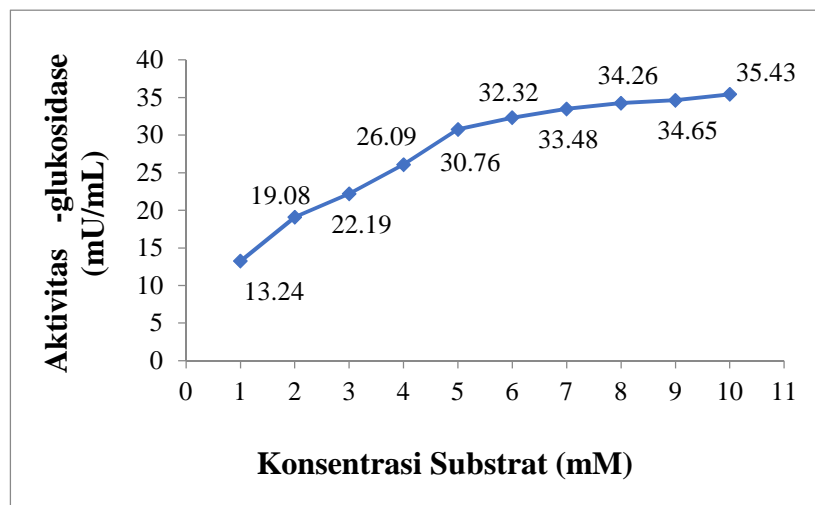
Gambar 16. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas -glukosidase amobil pada kondisi suhu 37 °C, dengan [S] 8 mM, dan waktu inkubasi 20 menit.

Data yang dihasilkan pada penentuan pH optimum terhadap aktivitas enzim -glukosidase amobil dapat dilihat pada Lampiran 12. Jika dilihat dari

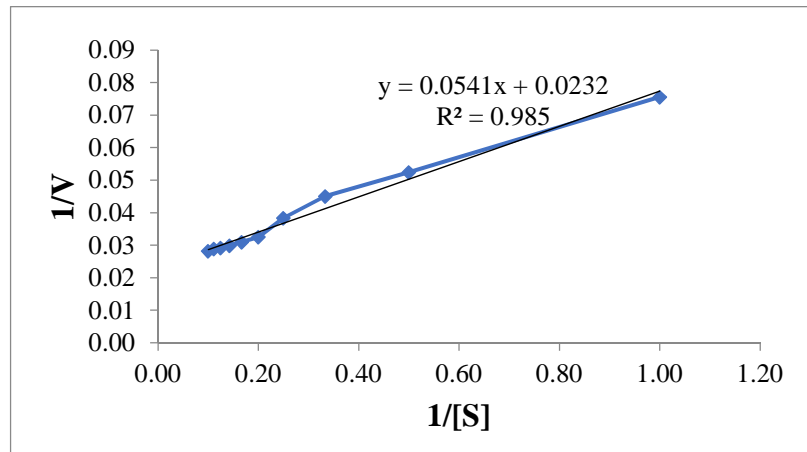
Gambar 16 aktivitas tertinggi berada pada pH 6,5 sebesar 77,87 mU/mL, setelah itu aktivitas enzim mengalami penurunan sampai dengan pH 8. pH optimum yang diperoleh pada aktivitas enzim -glukosidase amobil sama dengan pH optimum pada aktivitas enzim -glukosidase bebas yaitu pada pH optimum 6,5.

4.5.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat

Karakterisasi selanjutnya yaitu pengaruh konsentrasi substrat. Enzim -glukosidase yang telah diamobilisasi ditentukan pengaruh konsentrasi substrat dengan prosedur yang sama pada enzim bebas, konsentrasi yang digunakan yaitu 1–10 mM. Dari data yang diperoleh kemudian ditentukan nilai V_{max} dan K_m dengan perhitungan seperti pada enzim bebas. Hasil yang diperoleh dari pengaruh konsentrasi substrat dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas -glukosidase amobil pada kondisi pH 6,5; suhu 37 °C, dan waktu inkubasi 20 menit.



Gambar 18. Grafik hubungan antara $1/[S]$ terhadap $1/V$

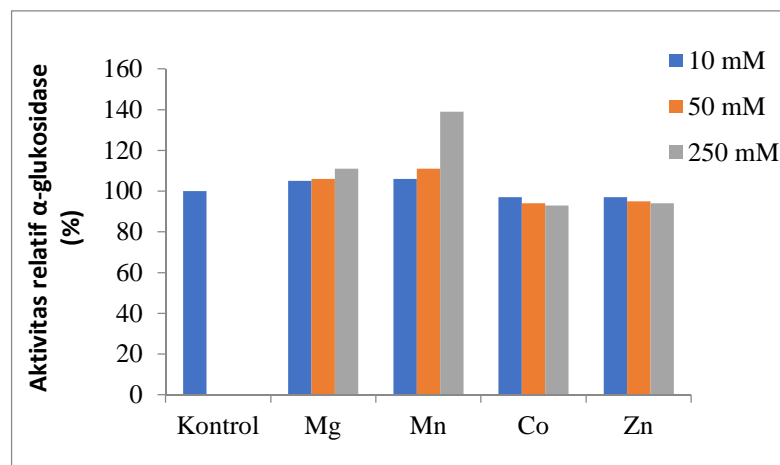
Data pada Gambar 17 yaitu aktivitas enzim α -glukosidase amobil terus meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi substrat, tetapi pada konsentrasi 8–10 mM aktivitas enzim mulai konstant. Kondisi enzim amobil pada pengaruh substrat sama dengan kondisi pada enzim bebas. Pada pengaruh konsentrasi substrat aktivitas enzim akan terus meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, karena konsentrasi substrat yang kecil membuat aktivitas enzim juga kecil. Ketika enzim sampai pada keadaan optimum, maka aktivitas enzim akan menjadi konstant dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Untuk mengetahui nilai V_{max} dan K_m yaitu didasarkan pada hubungan konsentrasi substrat dan aktivitas enzim, seperti pada pengaruh konsentrasi substrat enzim bebas yang menggunakan persamaan *Lineweaver-Burk*.

Persamaan garis regresi grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$ dapat dilihat pada Gambar 18. Dari persamaan regresi $Y=0,054x + 0,023$, maka diperoleh $1/V_{max} = 0,023$, sehingga $V_{max} = 43,48$ mM/menit dan $K_m/V_{max} = 0,030$, sehingga $K_m = 2,35$ mM. Nilai K_m yang diperoleh enzim

amobil sangat kecil dibandingkan dengan nilai K_m pada enzim bebas. Kecilnya nilai K_m berarti afinitas enzim terhadap substrat tinggi.

4.5.5 Pengaruh Ion Logam

Karakterisasi yang terakhir yaitu pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim amobil. Prosedur yang digunakan sama dengan pengaruh ion logam pada enzim bebas. Variasi ion logam yang digunakan yaitu Mg, Mn, Co, dan Zn dengan variasi konsentrasi yaitu 10 mM, 50 mM, dan 250 mM. Data yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 19.

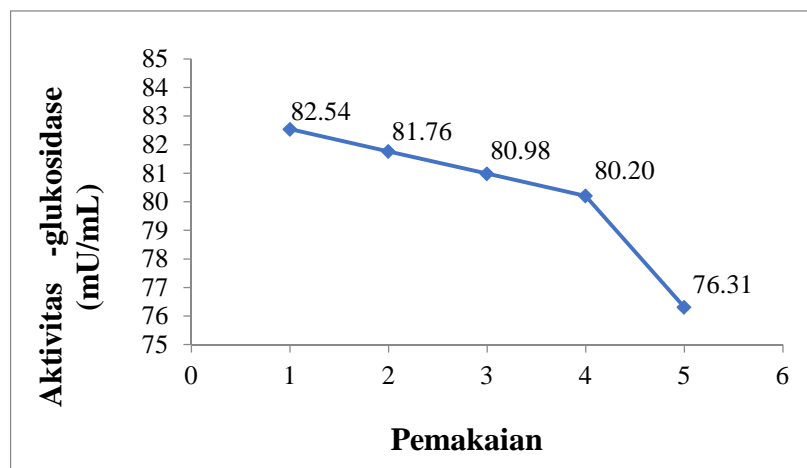


Gambar 19. Grafik hubungan pengaruh konsentrasi ion logam terhadap aktivitas α -glukosidase amobil pada pH 6,5 suhu 37 °C dengan [S] 8 mM, dan waktu inkubasi 20 menit.

Hasil yang diperoleh pada pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim α -glukosidase amobil sama dengan yang diperoleh dari enzim bebas. Ion logam Mg dan Mn dapat meningkatkan aktivitas enzim, maka dengan bertambahnya konsentrasi ion logam aktivitas enzim juga semakin tinggi, begitupun sebaliknya dengan ion logam Co dan Zn yang dapat menurunkan aktivitas enzim, semakin tinggi konsentrasi maka aktivitas enzim semakin menurun.

4.6 Pengaruh Perulangan Pemakaian Enzim Amobil

Prosedur selanjutnya yaitu enzim α -glukosidase yang telah diamobilisasi kemudian ditentukan pemakaian optimum dengan cara yang sama pada saat penentuan aktivitas enzim bebas pada pH optimum. Dilakukan prosedur yang sama dengan enzim amobil yang sama secara berulang-ulang sampai aktivitas enzim mengalami penurunan yang besar. Data yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Grafik pengaruh perulangan pemakaian α -glukosidase amobil pada kondisi pH 6,5 suhu 37 °C dengan [S] 8 mM, dan waktu inkubasi 20 menit.

Berdasarkan grafik pada Gambar 20 enzim α -glukosidase dari beras ketan hitam yang telah diamobilisasi dengan matriks Ca-alginat-kitosan hanya dapat digunakan secara berulang sebanyak 4 kali. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan Mesla, dkk pada tahun (2014) yang menggunakan enzim amobil dengan matriks yang sama sebanyak 5 kali pemakaian berulang. Pada penelitian ini enzim hanya dapat digunakan berulang sebanyak 4 kali karena pada pemakaian ke 5 aktivitas enzim mengalami penurunan sangat besar yang disebabkan karena

matriks Ca-alginat-kitosan yang digunakan pada proses amobilisasi sudah pecah sehingga enzim berdifusi keluar matriks. Enzim amobil yang telah berdifusi keluar matriks akan terganggu dengan kondisi lingkungan yang menyebabkan aktivitas menjadi turun dari 80,20 mU/mL sampai pada aktivitas 76,31 mU/mL.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan: Aktivitas enzim α -glukosidase yang diproduksi dari beras ketan hitam sebelum dimurnikan sebesar 38,93 mU/mL dengan pH optimum buffer 6,5. Kemudian setelah dimurnikan aktivitas meningkat menjadi 47,50 mU/mL dengan kondisi pH optimum buffer 6,5; suhu 37 °C, dan konsentrasi substrat 8 mM, serta pengaruh ion logam Mg dan Mn yang bersifat sebagai aktivator, dan ion logam Co dan Zn yang bersifat sebagai inhibitor. Pengaruh pH buffer optimum, suhu, dan konsentrasi substrat serta ion logam terhadap aktivitas enzim α -glukosidase amobil sama dengan enzim α -glukosidase bebas setelah dimurnikan.

Enzim α -glukosidase yang telah diamobilisasi secara mikroenkapsulasi dengan menggunakan matriks Ca-alginat-kitosan dapat digunakan secara berulang sebanyak 4 kali.

5.2 Saran

Enzim α -glukosidase perlu diisolasi dari sumber yang lain seperti dari gabah beras ketan hitam untuk membandingkan aktivitas enzim yang diperoleh.

Matriks yang digunakan pada proses amobilisasi kurang maksimal sehingga perlu digunakan matriks lain untuk memperoleh enzim yang dapat digunakan secara berulang yang lebih maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

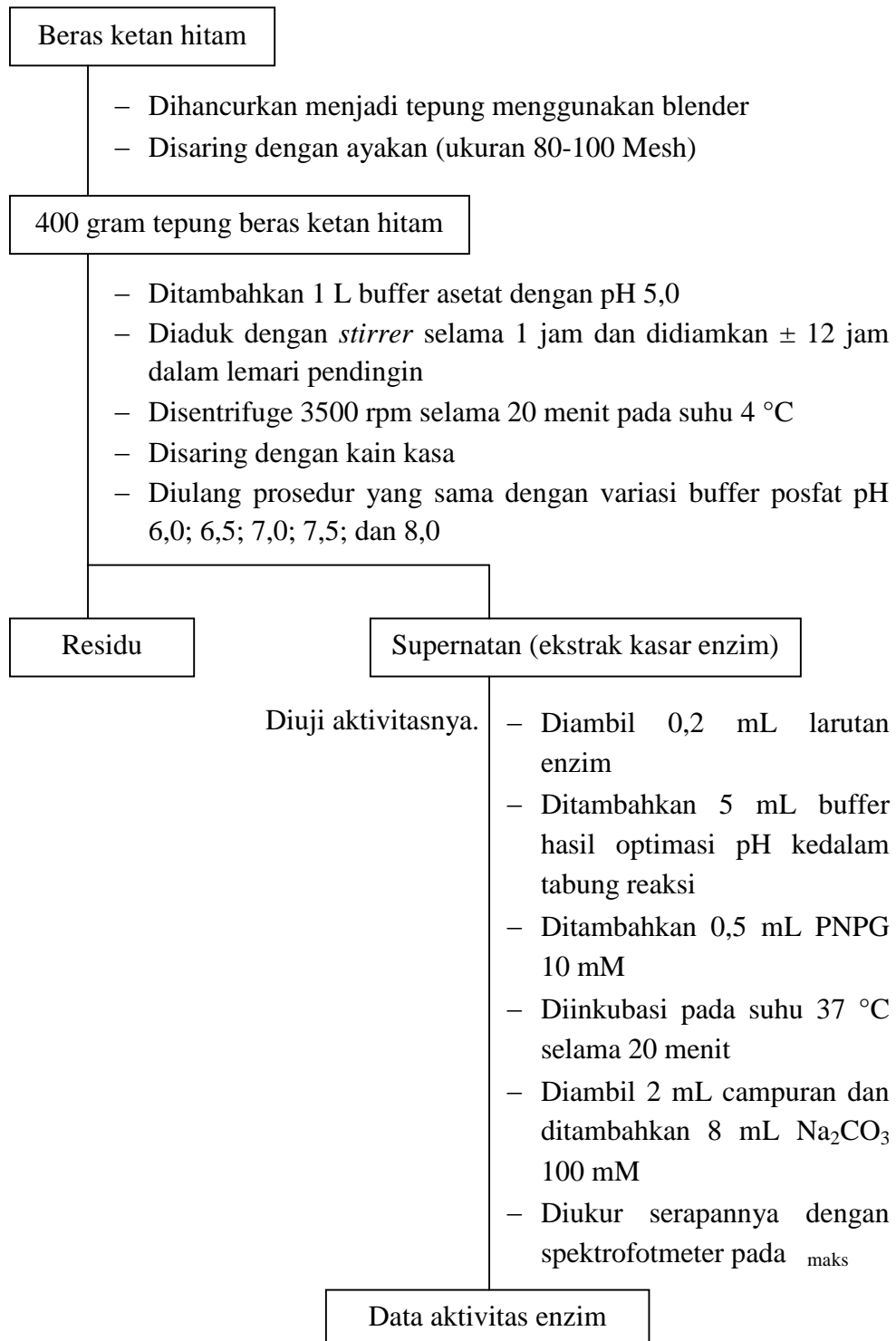
- Amalia, A., dan Nawfa, R., 2010, *Amobilisasi Bromelin Dengan Menggunakan Kitosan Sebagai Matriks Pendukung*, Skripsi tidak diterbitkan, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Anggriawan, M. B., Roswim, A. P., dan Nurcholis, W., 2015, Potensi Ekstrak Air dan Etanol Kulit Batang Kayu Manis Padang (*Cinnamomum Burmanii*) Terhadap Aktivitas Enzim A-Glukosidase, *Jurnal Kedokteran Yarsi*, **23**(2): 091-102.
- Bayer, 2008, *Precose (Akarbose Tablets)*, <http://www.univgraph.com/Bayer/inserts/Precose.pdf>, diakses pada tanggal 27 Desember 2016.
- Bintang, M., 2010, *BIOKIMIA-Teknik Penelitian*, Erlangga, Jakarta.
- Belitz, H. D., Grosch, W., dan Schieberle, P., 2009, *Food Chemistry 4th Revised and Extended ad*, Spinger, Berlin.
- Bollag, D. M., and Edelstein, S. J., 1991, *Protein Methods*, Weley-Less, New York.
- Bosenberg, L. H., 2008, The Mechanism of Action of Oral Antidiabetic Drugs: a Review of Recent Literature, *The Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*, **13**(3): 80-88.
- Budiman, A., 2011, *Isolasi Enzim -Glusidase Dari Gabah (Oryza Sativa var. Ciherang)*, skripsi tidak diterbitkan, Universitas Indonesia, Depok.
- Chrisnasari, R., Widi, R. K., Halim, B. A., dan Purwanto, M. G. M., 2014, *Imobilisasi Enzim Lipase pada Ca-Bentonit serta Aplikasinya pada Produksi Asam Lemak Omega-3 dari Limbah Minyak Ikan*, Skripsi tidak diterbitkan, Departemen Biologi Fakultas Teknologi Universitas Surabaya, Surabaya.
- Damayanti, E., Tjing, L. T., dan Arbianto, L., 2007, *Rice Bran*, Penebar Swadaya, Depok.
- Deepa, G., Singh, V., dan Naidu, A., 2008, Nutrient Composition and Physicochemical Properties of Indian Medicinal Rice-Njavara, *Journal Food Chem*, **106**: 165-171.
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., dan Posey, L. M., 2005, *Pharmacoteraphy sixth edition*, McGraw-Hill, New York.

- Departemen Kesehatan RI, 2005, *Pedoman Pengelolaan Obat Publik dan Perbekalan Kesehatan*, Dirjen Binfar dan Alkes, Jakarta.
- Febrinda, A. E., Astawan, M., Wresdiyati, T., dan Yuliana, N. D., 2013, Kapasitas Antioksidan dan Inhibitor Alfa Glukosidase Ekstrak Umbi Bawang Dayak, *J. Teknol dan Industri Pangan*, **24**(2): 161-167.
- Febriyanti, 2012, *Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Penghambatan aktivitas Alfa-Glukosidase dari Kulit Batang Kayu Tuah (Antidesma celebicum Miq.) dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif*, Skripsi tidak diterbitkan, Universitas Indonesia, Depok.
- Feng, J., Yang, X. W., dan Wang, R. F., 2011, Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitor from the leaves of *Aquilaria sinensis*, *Phytochemistry*, **72**: 242-247.
- Grist, D. H., 1960, *Rice, Formerly Agricultural Economist Colonial Agricultural Service*, Green and Co Ltd, London.
- Haryadi, 2006, *Teknologi Pengolahan Beras*, Gadjra Mada University Press, Yogyakarta.
- Hasanah, E. N. I., dan Putra, S. R., 2010, *Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Invertase yang Diamobilisasi dengan Na-Alginat*, Skripsi tidak diterbitkan, ITS, Surabaya.
- Irawan, D., 2009, *Isolasi Aktinomiset Endofit Tanaman Obat Yang Berpotensi Sebagai Antidiabetes Melalui Aktivitas α -Glukosidase*, Skripsi tidak diterbitkan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Isselbacher, K. J., Braunwald, E., dan Wilson, J. D., 1999, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, Massach Usetts.
- Kadirantau, D. M. E., 2000, *Kajian Isothermi Sorpsi Air (ISA) dan Stabilitas Tepung Ketan selama Penyimpanan*, skripsi tidak diterbitkan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kita, A., Matsui, H., Somoto, A., Kimura, A., Takata, M., Chiba, S., 1991, Substrate Specificity and Subsite Affinities of Crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*, *Agric Biol Chem*, **55**(9): 2327-2335.
- Kurniawan, A. B., Laeli, N., Puspitasari, A. P., Dan Pudjihastuti, I., 2014, *Teknik Imobilisasi Enzim Secara Entrapment dalam Sintesis Metil Ester Berbahan Minyak Jelantah*, skripsi tidak diterbitkan, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Lehninger, 1993, *Dasar-Dasar Biokimia Jilid I*, diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagen, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275
- Lukman, A., Lucida, H., dan Ben, E. S., 2012, Pemanfaatan Pati Beras Ketan Prigelatinasi Sebagai Matriks Tablet Lepas Lambat Natrium Diklorofenat, *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, **17**(1): 1-6.
- Mesla, W., Mahdi, C., dan Sutrisno, 2014, Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* Menggunakan Matriks Ca-Alginat-Kitosan, *Kimia Student Journal*, **2**(1): 428-434.
- Nailufar, Amalia, A., Basito, dan Anam, C., 2012, Kajian Karakteristik Ketan Hitam (*Oryza sativa glutinosa*) pada Beberapa Jenis Pengemas Selama Penyimpanan, *Jurnal Teknosains Pangan*, **1**(1): 121-132.
- Narwidina, P., 2009, *Pengembangan Minuman Isotonik Antosianin Beras Hitam (Oryza Sativa L. Indica) dan Efeknya terhadap Kebugaran dan Aktivitas Antioksidan pada Manusia Pasca Stress Fisik*, skripsi tidak diterbitkan, FTP UGM, Yogyakarta.
- Palmer, T., 1991, *Understanding Enzymes 3rd ed*, West Sussex, Ellis Horwood Limited.
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.
- Pujiyanto, S., Sunarno, Widyasari, A., 2015, *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Penghasil Inhibitor α -glukosidase dari Tanaman Pare (Momordica Charantia L)*. skripsi tidak diterbitkan, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Risma, D., 2012, *Isolasi dan Karakterisasi Enzim α -Glukosidase Dari Beras Lapuk (Oryza Sativa)*, skripsi tidak diterbitkan, Universitas Indonesia, Depok.
- Sarah, A., 2001, Immobilization and Stabilization of Papain on Chelating Sepharose, *Electronic J. Biotechnology*, Catolica de Velparaaiso Chile.
- Sebayang, F., 2006, Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi Menggunakan Sel *Saccharomyces Cerevisiae* yang Teramobil Pada Kalsium Alginat, *Jurnal Teknologi Proses*, **5**(2): 68-74.
- Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J., dan Zito, S. W., 2008, α -Glukosidase Inhibitory Activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels Seed Kernel In Vitro and In Goto-Kakizaki (GK) rats, *Carbohydrate Research*, 343: 1278-1281.
- Sigma Quality Control Test Procedure, *Enzymatic Assay of α -Glukosidase*, (Online), (https://www.sigmaaldrich.com/content/.../sigma.../Sigma.../alpha_glucosidase_sed.pdf), diakses 18 november 2016.
- Soeharto, dan Iman, 2004, *Serangan Jantung dan Stroke Hubungannya dengan Lemak dan Kolestrol*, Edisi Kedua, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

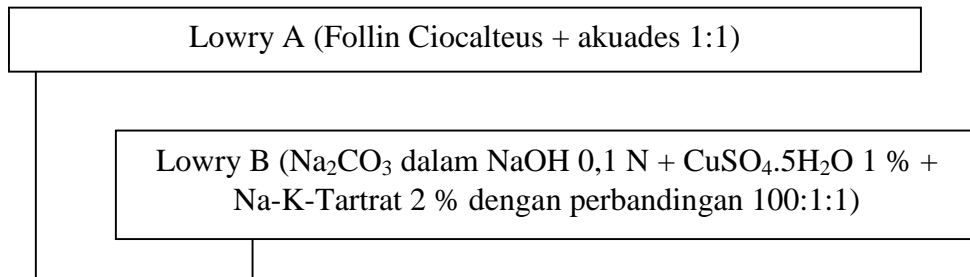
- Stryer, L., 1995, *Biochemistry* 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York.
- Tarwotjo dan Soejoeti, 2008, *Dasar-dasar Gizi Kuliner*, Grasindo, Jakarta.
- Trau, D., and Renneberg, R., 2003, Encapsulation of Glucose Oxidase Microparticles within a Nanoscale Layer-by-layer Film: Immobilization and Biosensor Application, *Biosens, bioelec*, **18**: 1491-1499.
- Tuankotta, A., Kurniaty, N., dan Arumsari, A., 2015, *Perbandingan Kadar Protein pada Tepung Beras Putih (Oryza sativa L), tepung beras ketan hitam (Oryza sativa L. Glutinosa), dan sagu (Metroxylon Sagu Rottb) dengan menggunakan Metode Kjeldahl*, skripsi tidak diterbitkan, Universitas Islam Bandung, Bandung.
- Whitaker, J. R., 1996, *Enzyme In Food Chemistry: Third Edition*, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Wikipedia, *Alpha-glucosidase*, (Online), <https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-glucosidase>, diakses 18 November 2016.
- Wuryanti, 2006, Amobilisasi Enzim Bromelin dari Bonggol Nanas Dengan Bahan Pendukung (Support) Karagenan Dari Rumput Laut (*Euchema Cottonii*), *Jurnal Sains Kimia dan Aplikasi*, **9**(3): 1-5.
- Yulia, R., dan Casper, S. A., 2012, *Pengaruh Penyimpanan Terhadap Kualitas Beras Perubahan Sifat Kimia Selama Penyimpanan*, skripsi tidak diterbitkan, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Zuhro, F., 2015, *Uji Aktivitas Inhibitor -Glukosidase Ekstrak Etanol 70% Daun Kenitu (Chrysophyllum cainito L)*, Skripsi tidak diterbitkan, Universitas Jember, Jawa Timur.

Lampiran 1. Skema Kerja Preparasi Sampel, Isolasi, Penentuan pH Buffer Optimum Ekstrak Kasar Enzim, dan Uji Aktivitas

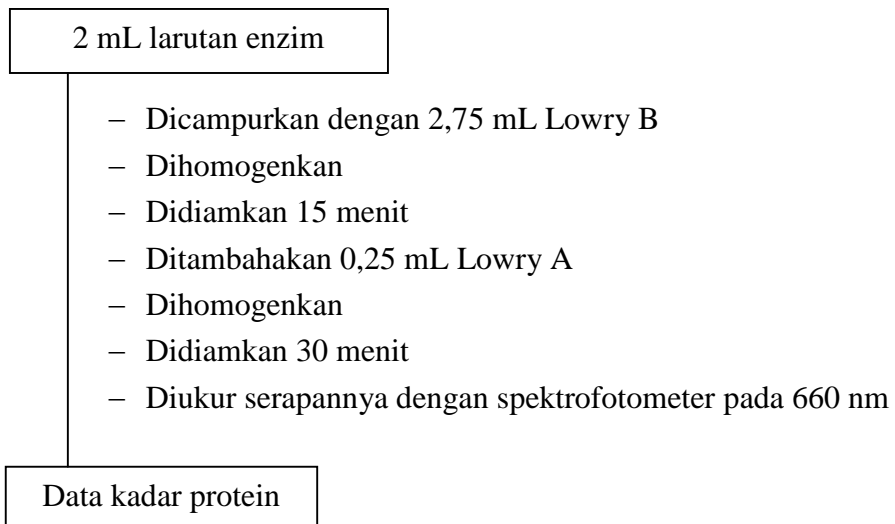


Lampiran 2. Uji Kadar Protein

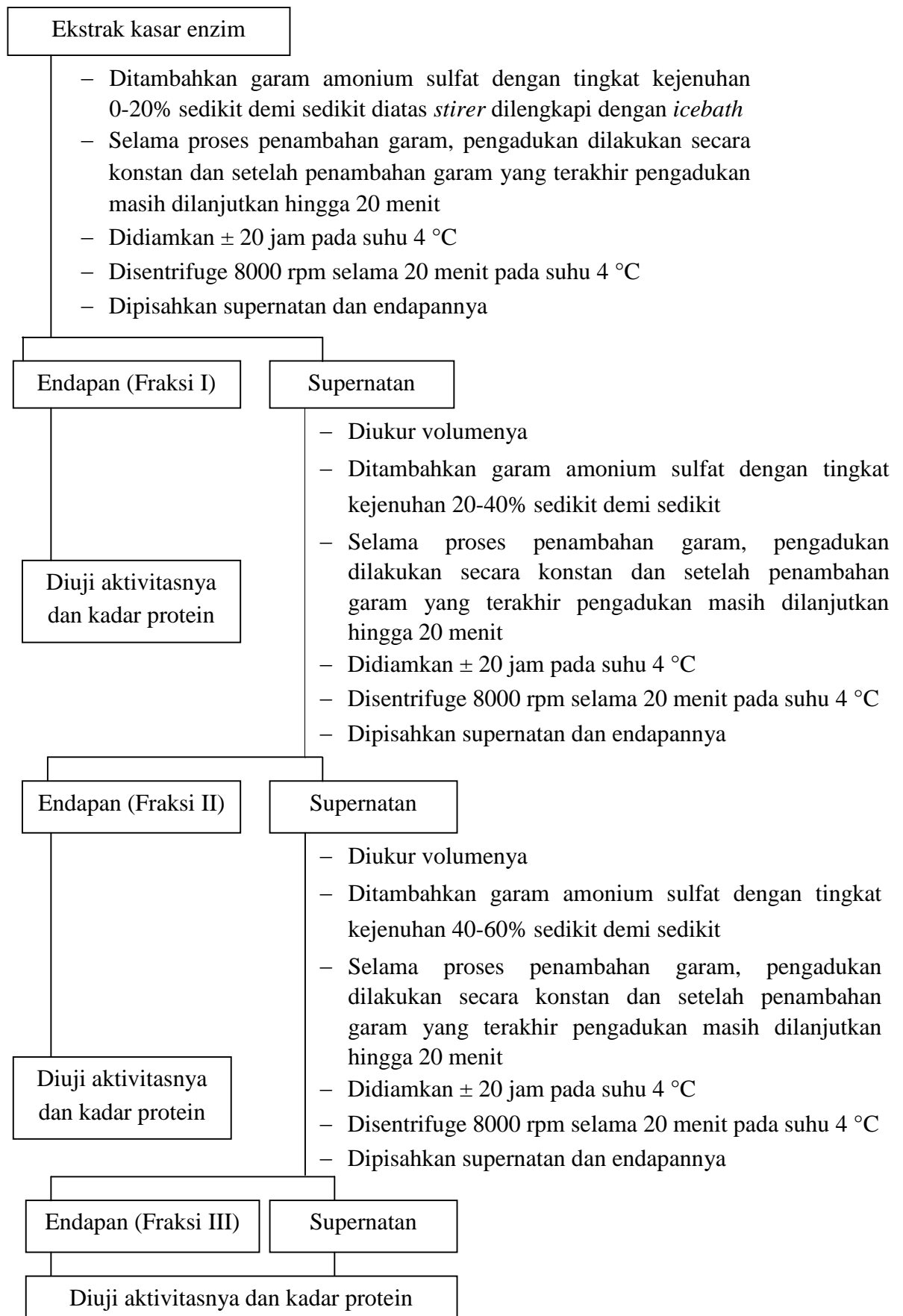
a. Pembuatan pereaksi



b. Penentuan kadar protein

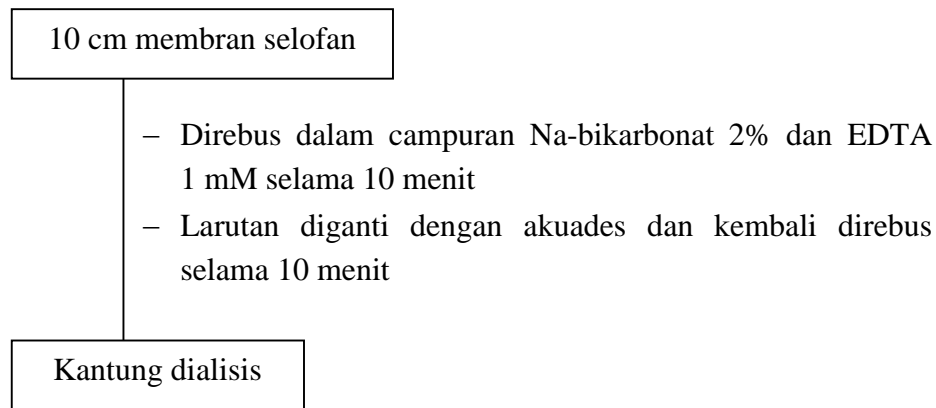


Lampiran 3. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

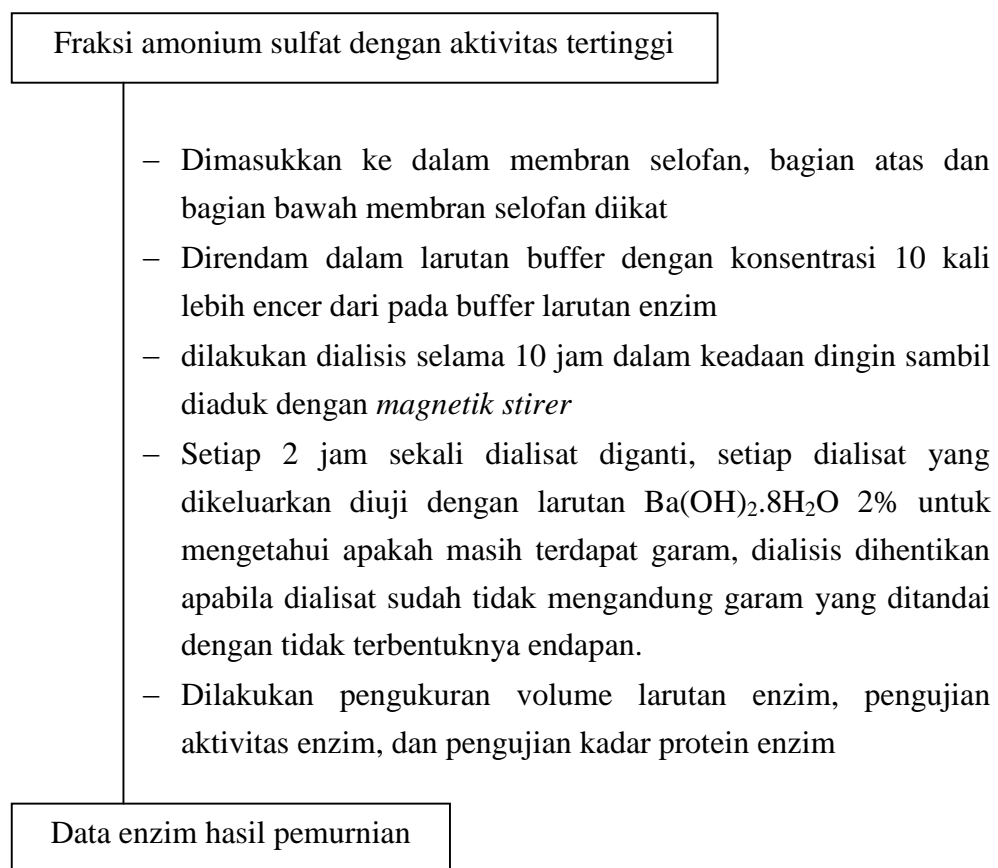


Lampiran 4. Dialisis dengan Membran Selofan

a. Preparasi membran selofan

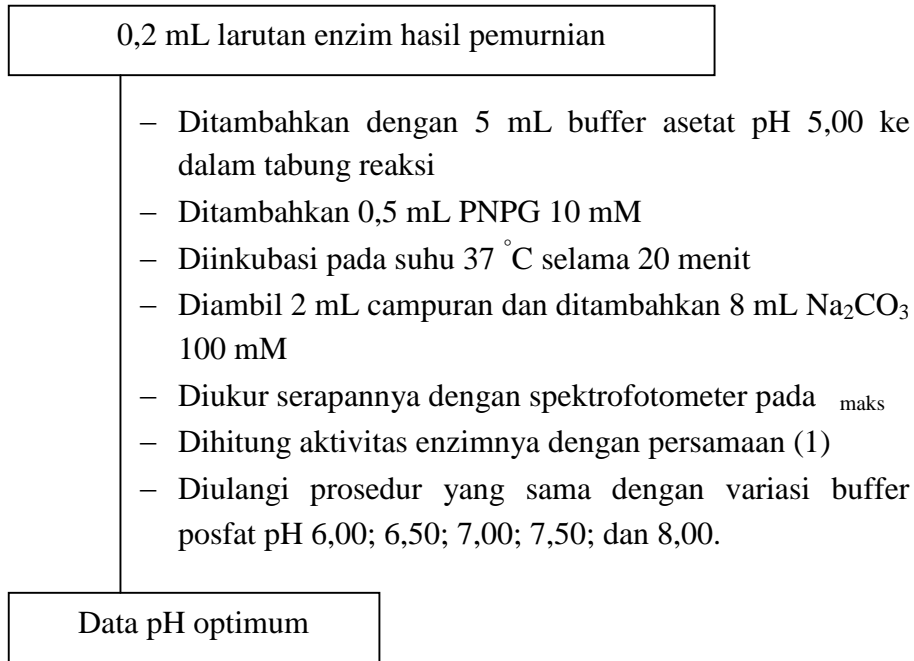


b. Dialisis enzim

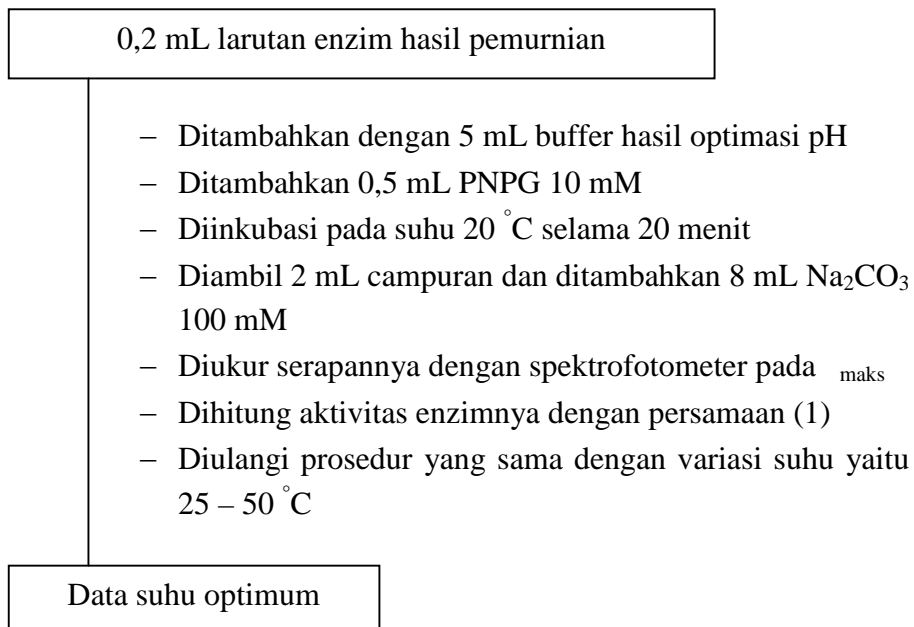


Lampiran 5. Karakterisasi Enzim α -glukosidase

a. Penentuan pH optimum



b. Penentuan suhu optimum



c. Penentuan pengaruh waktu inkubasi

0,2 mL larutan enzim hasil pemurnian

- Ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi pH
- Ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM
- Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit
- Diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na₂CO₃ 100 mM
- Diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks}
- Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1)
- Diulangi prosedur yang sama dengan variasi waktu inkubasi 10 – 30 menit

Data pengaruh waktu inkubasi

d. Penentuan pengaruh konsentrasi substrat

0,2 mL larutan enzim hasil pemurnian

- Ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi pH
- Ditambahkan 0,5 mL PNPG dengan konsentrasi 1 mM
- Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit
- Diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na₂CO₃ 100 mM
- Diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks}
- Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1)
- Diulangi prosedur yang sama dengan variasi konsentrasi substrat 2-10 mM.

Data substrat optimum

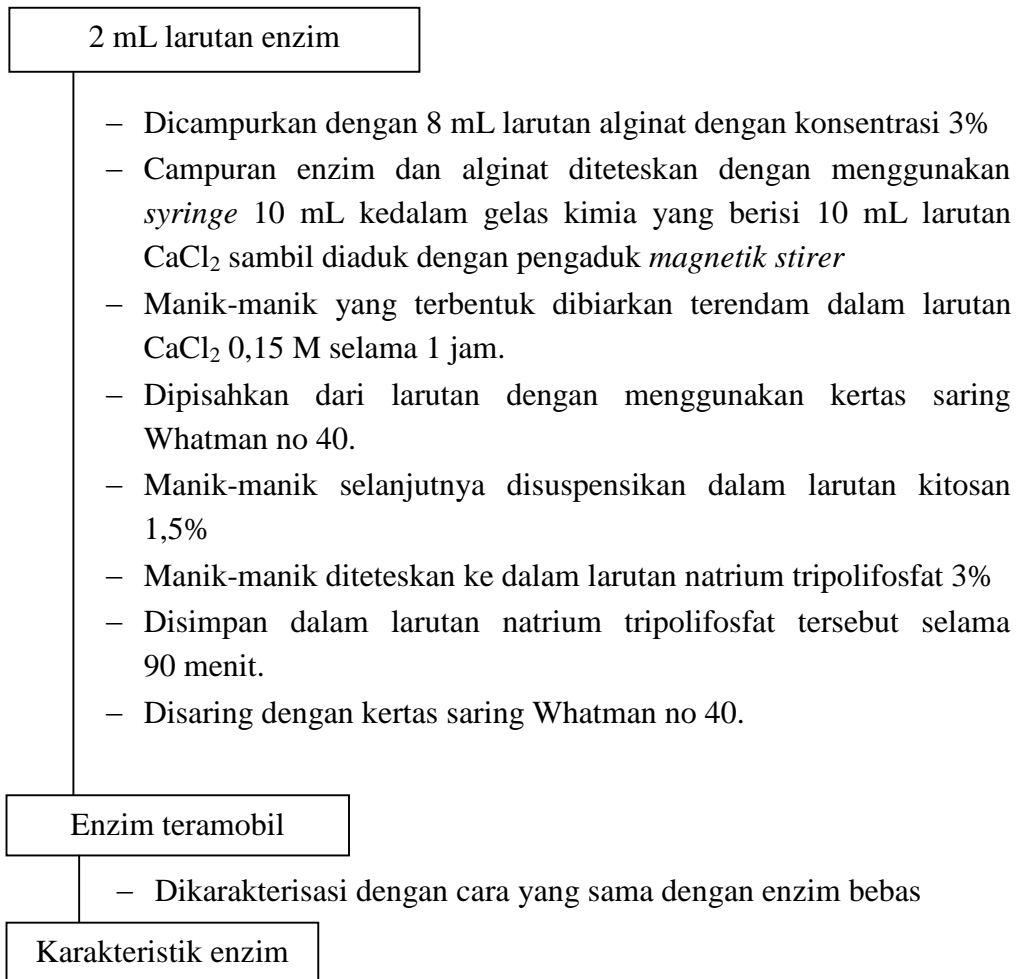
e. Penentuan pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim

0,2 mL larutan enzim hasil pemurnian

- Ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi pH
- Ditambahkan 0,2 mL larutan logam $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dengan variasi konsentrasi 10, 50, dan 250 mM
- Ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit
- Diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na_2CO_3 100 mM
- Diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks}
- Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1)
- Diulangi prosedur yang sama dengan variasi ion logam ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dengan variasi konsentrasi 10, 50, dan 250 mM

Data pengaruh ion logam

Lampiran 6. Amobilisasi Enzim α -glukosidase



Lampiran 7. Pengaruh Perulangan Pemakaian Enzim α -glukosidase Teramobilisasi

0,2 mL larutan enzim teramobil

- Ditambahkan dengan 5 mL buffer hasil optimasi pH
- Ditambahkan 0,5 mL PNPG dengan konsentrasi 10 mM
- Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit
- Diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na₂CO₃ 100 mM
- Diukur serapannya dengan spektrofotometer pada λ_{maks}
- Dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1)
- Diulangi prosedur tersebut menggunakan enzim teramobil yang sama

Data pemakaian ulang optimum

Lampiran 8. Perhitungan aktivitas ekstrak kasar enzim α -glukosidase pada berbagai nilai pH

pH	Absorban sampel-blanko	Aktivitas mU/mL
5	0,008	3,11
6	0,008	3,11
6.5	0,054	21,02
7	0,016	6,23
7.5	0,006	2,34
8	0,006	2,34

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Enzim} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) &= \frac{A \text{ sampel} - A \text{ blanko} \times V_a \times V_t}{K_f \times t \times V_c \times V_e} \\ &= \frac{0,054 \times 10 \times 5,7}{18,3 \times 20 \times 2 \times 0,2} \times 1000 \\ &= 21,02 \text{ mU/mL} \end{aligned}$$

Keterangan: A sampel = Absorbansi sampel
A blanko = Absorbansi blanko
Vt = V. enzim + substrat + buffer
Va = Volume total yang dianalisis
Ve = Volume enzim yang dianalisis
Vc = Volume campuran yang dianalisis
Kf = Koefisien ekstingsi molar
t = Waktu inkubasi

Lampiran 9. Perhitungan aktivitas enzim α -glukosidase pada proses pemurnian dengan metode fraksinasi

Tahapan Pemurnian	Absorban Aktivitas	Aktivitas (mU/mL)	Absorban Protein	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (mU/mg)	Tingkat Kemurnian (%)
Ekstrak Kasar	0,054	21,02	1,045	3,27	6,44	1,00
Fraksi I 0-20%	0,094	36,60	1,360	4,84	7,56	1,17
Fraksi II 20-40%	0,136	52,95	0,746	1,77	29,92	4,65
Fraksi III 40-60%	0,1	38,93	0,592	1,00	38,93	6,05
Fraksi IV 60-80%	0,067	26,09	0,652	1,30	20,07	3,12
Fraksi V 80-100%	0,029	11,29	0,628	1,18	9,57	1,49
Filtrat Sisa	0,007	2,73	1,190	3,99	0,68	0,11

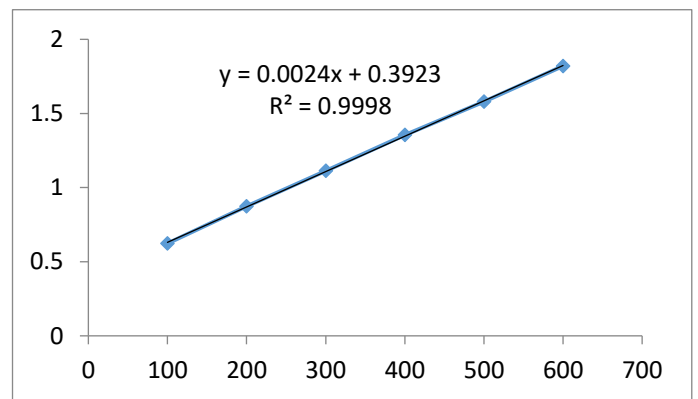
a. Kadar Protein

$$y = ax + b$$

$$x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \left(\frac{0,592 - 0,392}{0,002} \right) \times 10 \times 10^{-3}$$

$$= 1,00 \text{ mg/mL}$$



b. Aktivitas Spesifik

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{Aktivitas Enzim}}{\text{Kadar Protein}}$$

$$= \frac{38,93 \text{ mU/mL}}{1,00 \text{ mg/mL}}$$

$$= 38,93 \text{ mU/mg}$$

c. Tingkat Kemurnian

$$= \frac{\text{Aktivitas Spesifik Fraksi III}}{\text{Aktivitas Spesifik Ekstrak}}$$

$$= \frac{38,93 \text{ mU/mg}}{6,44 \text{ mU/mg}}$$

$$= 6,05\%$$

Lampiran 10. Perhitungan aktivitas enzim α -glukosidase pada proses pemurnian dengan proses dialisis

Tahapan Pemurnian	Absorban Aktivitas	Aktivitas (mU/ mL)	Absorban Protein	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (mU/mg)
Fraksi III 40-60% sebelum dialisis	0,1	38,93	0,592	1,00	38,93
Fraksi III 40-60% setelah dialisis	0,122	47,50	0,398	0,04	1187,50

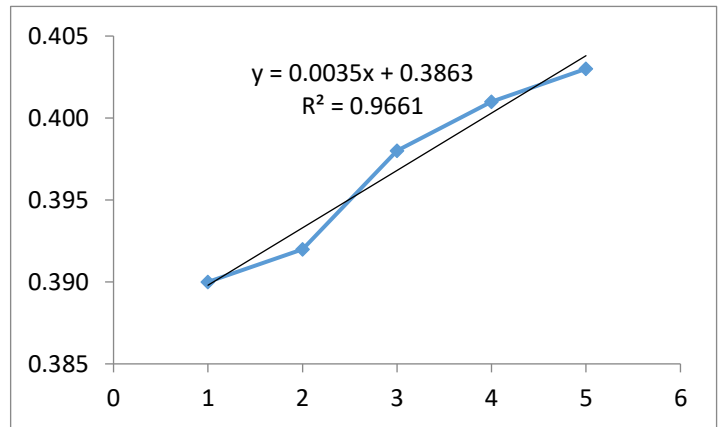
Kadar Protein

$$y = ax + b$$

$$x = \frac{y-b}{a}$$

$$x = \left(\frac{0,398 - 0,386}{0,003} \right) \times 10 \times 10^{-3}$$

$$= 0,04 \text{ mg/mL}$$



Lampiran 11. Karakterisasi enzim α -glukosidase bebas (pengaruh waktu, suhu, pH, konsentrasi substrat dan pengaruh ion logam).

Waktu (Menit)	Absorban	Aktivitas (mU/mL)
5	0,005	1,95
10	0,097	37,77
15	0,207	80,59
20	0,329	128,09
25	0,425	165,47
30	0,521	202,85

Suhu ($^{\circ}$ C)	Absorban	Aktivitas (mU/mL)
35	0,337	131,21
36	0,359	139,77
37	0,379	147,56
38	0,348	135,49
39	0,317	123,42
40	0,264	102,79

pH	Absorban	Aktivitas (mU/mL)
5	0,043	16,74
6	0,101	39,32
6.5	0,122	47,50
7	0,032	12,46
7.5	0,031	12,07
8	0,020	7,79

[S] (mM)	Absorban	V (mU/mL)	1/[S]	1/V
1	0,075	29,20	1,00	0.03
2	0,121	47,11	0,50	0.02
3	0,167	65,02	0,33	0.02
4	0,216	84,10	0,25	0.01
5	0,253	98,50	0,20	0.01
6	0,285	110,96	0,17	0.01
7	0,311	121,09	0,14	0.01
8	0,344	133,93	0,13	0.01
9	0,345	134,32	0,11	0.01
10	0,346	134,71	0,10	0.01

$$y = 0,030x + 0,004$$

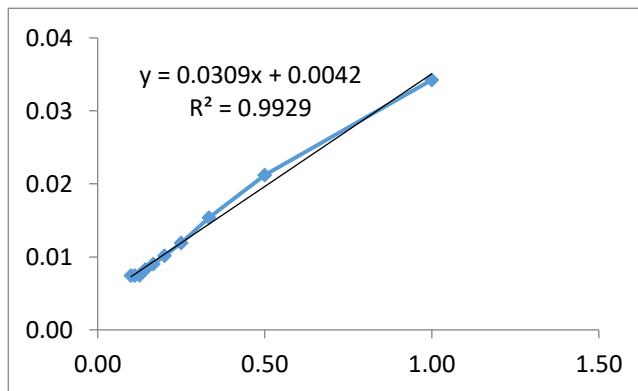
$$\frac{1}{V_{\max}} = 0,004$$

$$V_{\max} = \frac{1}{0,004} = 250 \text{ mM}$$

$$\frac{K_m}{V_{\max}} = 0,030$$

$$\frac{K_m}{250} = 0,030$$

$$K_m = 0,030 \times 250 = 7,5 \text{ mM}$$



Logam	Aktivitas (mU/mL)			Aktivitas relatif (%)		
	10 mM	50 mM	250 mM	10 mM	50 mM	250 mM
Kontrol		114,47			100	
Mg	114,86	115,25	115,64	100,34	100,68	101,02
Mn	115,25	115,64	116,02	100,68	101,02	101,36
Co	114,08	113,69	113,30	99,66	99,32	98,98
Zn	113,30	112,52	110,57	98,98	98,30	96,60

Logam	Absorban		
	10 mM	50 mM	250 mM
Kontrol		0,294	
Mg	0,295	0,296	0,297
Mn	0,296	0,297	0,298
Co	0,293	0,292	0,291
Zn	0,291	0,289	0,294

$$\text{Aktivitas Relatif} = \frac{\text{Aktivitas logam}}{\text{Aktivitas kontrol}} \times 100$$

$$= \frac{114,86}{114,47} \times 100$$

$$= 100,34\%$$

Lampiran 12. Karakterisasi enzim α -glukosidase amobil (pengaruh waktu, suhu, pH, konsentrasi substrat dan pengaruh ion logam).

Waktu (Menit)	Absorban	Aktivitas (mU/mL)
5	0,080	31,15
10	0,085	33,09
15	0,107	41,66
20	0,110	42,83
25	0,116	45,16
30	0,119	46,33

Suhu ($^{\circ}$C)	Absorban	Aktivitas (mU/mL)
35	0,341	132,77
36	0,363	141,33
37	0,382	148,73
38	0,352	137,05
39	0,313	121,86
40	0,261	101,62

pH	Absorban	Aktivitas (mU/mL)
5	0,177	68,91
6	0,178	69,30
6.5	0,200	77,87
7	0,197	76,70
7.5	0,171	66,58
8	0,168	65,41

[S] (mM)	Absorban	V (mU/mL)	1/[S]	1/V
1	0,034	13,24	1,00	0,08
2	0,049	19,08	0,50	0,05
3	0,057	22,19	0,33	0,05
4	0,067	26,09	0,25	0,04
5	0,079	30,76	0,20	0,03
6	0,083	32,32	0,17	0,03
7	0,086	33,48	0,14	0,03
8	0,088	34,26	0,13	0,03
9	0,089	34,65	0,11	0,03
10	0,091	35,43	0,10	0,03

Logam	Aktivitas (mU/mL)			Aktivitas relatif (%)		
	10 mM	50 mM	250 mM	10 mM	50 mM	250 mM
Kontrol		77,87			100	
Mg	81,76	82,54	86,43	105,00	106,00	110,99
Mn	82,54	86,43	108,24	106,00	110,99	139,00
Co	75,53	73,20	72,42	96,99	94,00	93,00
Zn	75,53	73,98	73,20	96,99	95,00	94,00

Logam	Absorban		
	10 mM	50 mM	250 mM
Kontrol		0.200	
Mg	0.210	0.212	0.222
Mn	0.212	0.222	0.278
Co	0.194	0.188	0.186
Zn	0.194	0.190	0.188

Lampiran 13. Pengaruh perulangan pemakaian enzim amobil

Enzim	Absorban	Aktivitas (mU/mL)
1	0,212	82,54
2	0,210	81,76
3	0,208	80,98
4	0,206	80,20
5	0,196	76,31

Lampiran 14. Foto Penelitian



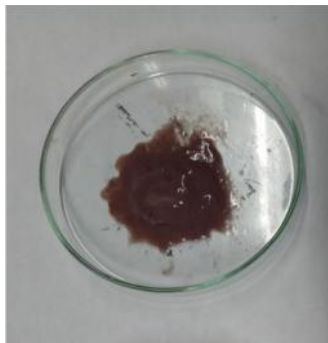
Beras ketan hitam



Tepung
beras ketan hitam



Ekstrak kasar enzim
-glukosidase



Fraksi III (40-60%)



Proses dialisis



Enzim -glukosidase
hasil pemurnian



Enzim -glukosidase amobil