

**ISOLASI DAN PEMURNIAN ENZIM  $\alpha$ -GLUKOSIDASE DARI BERAS  
KETAN PUTIH (*Oryza sativa* VAR. GLUTINOSA) SERTA AMOBILISASI  
DENGAN MATRIKS KARAGENAN SECARA MIKROENKAPSULASI**

**ANDI AKBAR**

**H311 13 309**



**DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2017**

**ISOLASI DAN PEMURNIAN ENZIM  $\alpha$ -GLUKOSIDASE DARI BERAS  
KETAN PUTIH (*Oryza sativa* VAR. GLUTINOSA) SERTA AMOBILISASI  
DENGAN MATRIKS KARAGENAN SECARA MIKROENKAPSULASI**

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

**Oleh:**

**ANDI AKBAR**

**H311 13 309**



**DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2017**

**SKRIPSI**

**ISOLASI DAN PEMURNIAN ENZIM  $\alpha$ -GLUKOSIDASE DARI BERAS  
KETAN PUTIH (*Oryza sativa* VAR. GLUTINOSA) SERTA AMOBILISASI  
DENGAN MATRIKS KARAGENAN SECARA MIKROENKAPSULASI**

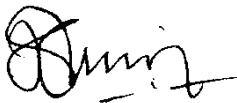
**Disusun dan diajukan oleh:**

**ANDI AKBAR**

**H311 13 309**

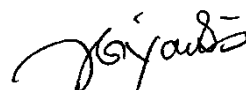
**Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:**

**Pembimbing Utama**



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

**Pembimbing Pertama**



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

## LEMBAR PERSEMBAHAN

**QS. Al A'raf (7) : 55**

Artinya: Berdoalah kepada Tuhanmu dengan berendah diri dan suara yang lembut.  
Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang melampaui batas.

**"Keberhasilan itu hanya bisa dilakukan oleh diri sendiri bukan orang lain"**

**"Keberhasilan bukanlah berapa banyak yang kita dapatkan tetapi berapa banyak yang dapat kita berikan serta berarti untuk orang lain"**

**"The only mistake in life is the lesson not learned."**

**"Skripsi ini kupersembahkan kepada kedua orang tua, saudara, sahabat,  
dan orang-orang yang aku cintai"**

## PRAKATA

Segala puji syukur hanya kepada Allah SWT. atas segala berkat dan penyertaan-Nya selama ini hingga akhirnya penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul “**Isolasi dan Pemurnian Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Ketan Putih (*Oryza sativa* Var. *Glutinosa*) serta Amobilisasi dengan Matriks Karagenan secara Mikroenkapsulasi**”. Berbagai kendala dan tantangan yang dialami penulis namun berkat doa, motivasi, dan dukungan dari berbagai pihak hingga akhirnya laporan hasil penelitian ini dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada orang tua terkasih Andi Sugianti dan Andi Rasyid mendidik dan membesarkan penulis, terima kasih untuk semua kasih sayang, dukungan dan motivasi yang telah diberikan kepada penulis. Berserta adik penulis Andi Jumrah Ilmawaddah dan Andi Amin yang selama ini telah mendukung, membantu, mengasihi dan mendampingi penulis.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan hormat kepada Ibu Dr. Hasnah Natsir, M.Si dan Ibu Dra. Rugaiyah Arfah, M.Si selaku pembimbing yang selama ini telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam mengarahkan penulis hingga terselesaikannya laporan hasil penelitian ini dengan baik. Tak lupa pula penulis ucapkan terima kasih kepada Bapak Prof. Dr. Alfian Noor, M.Sc, Bapak Drs. Fredryk W. Mandey, M.Sc, Bapak Dr. Syahrudin Kasim, S.Si, M.Si, dan Ibu St. Fauziah, S.Si, M.Si sebagai tim penguji yang telah banyak memberikan arahan dan masukan untuk penulis.

Segenap hati tulus dan penuh hormat penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dekan FMIPA Unhas, Dr. Eng, Amiruddin, S.Si, M.Si serta seluruh staf FMIPA Unhas.
2. Ibu Dr. Indah Raya, M.Si selaku Ketua Departemen Kimia dan Bapak Dr. Muhammad Zakir selaku sekretaris Departemen Kimia dan seluruh Dosen yang telah membimbing dan membagi ilmunya kepada penulis selama menempuh pendidikan serta seluruh staf Departemen Kimia atas bantuannya.
3. Bapak Dr. Abd Karim, M.Si selaku penasehat akademik penulis yang telah membimbing dan mengarahkan penulis selama menempuh pendidikan.
4. Seluruh analis pada Departemen Kimia FMIPA Unhas, Kak Anti, Pak Sugeng, Ibu Tini, Kak Linda, Kak Fibhy, dan Pak Iqbal yang telah banyak membantu penulis selama melakukan penelitian.
5. Sahabat penulis D'Bureng Ani, Adji, DSS, dan Usfa yang selama ini telah mendukung dan memotivasi serta bersama-sama berbagi suka dan duka dalam menyelesaikan laporan hasil penelitian.
6. Sahabat sekaligus partner penelitian penulis Ody yang selama ini telah mendukung, mendampingi serta bersama-sama melalui segala suka duka penelitian hingga akhirnya laporan hasil penelitian ini terselesaikan.
7. Teman-teman TITRASI 2013 kalian adalah keluarga terbaik bagi penulis, terima kasih atas persahabatan terlebih rasa persaudaraan yang telah kalian berikan sehingga segala suka duka dalam masa studi dapat terlewati dan semuanya tidak akan terlupakan.

8. Segenap Keluarga Besar KMFMIPA dan KMK FMIPA yang telah menjadi keluarga penulis selama ini.
9. Kakak-kakak yang telah banyak membantu dan mendampingi selama ini, terkhusus untuk Kak Amirah dan Kak Ilham yang selama ini selalu memberikan saran dan masukan kepada penulis, terima kasih banyak.
10. Semua pihak yang tidak sempat tertulis namanya yang telah memberikan dukungan maupun bantuan kepada penulis.

Penulis hanyalah manusia biasa yang tidak luput dari kesalahan sehingga penulis menyadari bahwa apa yang penulis sajikan ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, penulis mengharapkan kritikan dan saran yang membangun dari semua pihak, dan semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2017

## ABSTRAK

Enzim  $\alpha$ -glukosidase (EC 3.2.1.20) merupakan enzim pada membran epitel usus halus dan berperan pada pencernaan karbohidrat makanan yang mencegah karbohidrat menjadi glukosa. Enzim ini diperlukan pada pencarian senyawa inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase dalam rangka penemuan obat diabetes melitus tipe dua. Pada penelitian ini, sebagai sumber enzim yang digunakan adalah beras ketan putih yang memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi. Beras ketan putih selanjutnya dibuat menjadi tepung kemudian diekstraksi menggunakan buffer dengan perbandingan bahan terhadap buffer adalah 2:5. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas sebesar 45,16 mU/mL. Pada fraksinasi dengan amonium sulfat aktivitas spesifik tertinggi ditemukan pada tingkat kejenuhan 60-80% sebesar 129,14 mU/mg. Enzim hasil dialisis memiliki aktivitas spesifik sebesar 3874,55 mU/mg. Enzim  $\alpha$ -glukosidase kemudian diamobilisasi dengan matriks karagenan secara mikroenkapsulasi. Hasil uji perulangan pemakaian menunjukkan bahwa enzim  $\alpha$ -glukosidase amobil dapat digunakan sebanyak 5 kali perulangan pemakaian. Enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras ketan putih baik sebelum dan setelah diamobilisasi memiliki karakteristik yang sama, seperti waktu inkubasi optimum 20 menit, pH optimum 7, suhu optimum 35 °C, konsentrasi substrat optimum 8 mM,  $K_m = 3,47-3,88$  mM dan  $V_{max} = 196,08-200$  mM/menit, aktivator  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$ , serta inhibitor  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$ .

Kata kunci:  $\alpha$ -glukosidase, amobilisasi, beras ketan putih, isolasi, karagenan



## ABSTRACT

The  $\alpha$ -glucosidase enzyme (EC 3.2.1.20) is an enzyme in the small bowel epithelial membrane and plays a role in the digestion of carbohydrate foods that prevent carbohydrates from becoming glucose. This enzyme is needed on the search for the  $\alpha$ -glucosidase enzyme inhibitor compound in the framework of the discovery of a drug of type two diabetes mellitus. In this study, as a source of enzymes used are white sticky rice which has a high carbohydrate content. The white sticky rice is subsequently made into flour and then extracted using a buffer with the ratio of the ingredient to the buffer is 2:5. The results showed that the crude extract of enzyme had activity of 45,16 mU/mL. In fractionation with ammonium sulphate the highest specific activity was found at a saturation level of 60-80% of 129,14 mU/mg. The dialysis enzyme has a specific activity of 3874,55 mU/mg. The  $\alpha$ -glucosidase enzyme is then immobilized with a microencapsulated carrageenan matrix. The results of the recurrence test show that the immobilized  $\alpha$ -glucosidase enzyme can be used for 5 times the iteration of use. The  $\alpha$ -glucosidase enzyme of white glutinous rice both before and after immobilized has the same characteristics, such as optimum incubation time of 20 minutes, optimum pH of 7, optimum temperature of 35 °C, optimum substrate concentration of 8 mM,  $K_m = 3.47-3.88$  mM and  $V_{max} = 196.08-200$  mM/min, activator  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$ , as well as  $Co^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  inhibitors.

Keywords:  $\alpha$ -glucosidase, carrageenan, immobilization, isolation, white sticky rice

## DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Beras Ketan Putih ( <i>Oryza sativa</i> Var. Glutinosa).....	6
2.2 Enzim $\alpha$ -glukosidase dan Manfaatnya.....	7
2.3 Pati.....	8
2.4 Tahapan Isolasi Enzim.....	10
2.5 Metode Amobilisasi Enzim.....	13
2.6 Karagenan.....	15
BAB III METODE PENELITIAN.....	18
	x

3.1	Bahan Penelitian.....	18
3.2	Alat Penelitian.....	18
3.3	Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
3.4	Prosedur Penelitian.....	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....		27
4.1	Preparasi Sampel sebagai Sumber Enzim $\alpha$ -Glukosidase ...	27
4.2	Isolasi dan Penentuan pH Buffer Optimum Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase.....	28
4.3	Pemurnian Enzim $\alpha$ -Glukosidase .....	29
4.4	Karakterisasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase Bebas.....	33
4.5	Karakterisasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase Amobil .....	39
4.6	Uji Perulangan Pemakaian Optimum Enzim $\alpha$ -Glukosidase Amobil .....	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		47
5.1	Kesimpulan .....	47
5.2	Saran .....	47
DAFTAR PUSTAKA .....		49
LAMPIRAN.....		53

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>halaman</b>
1. Komposisi beras ketan putih dalam 100 g bahan.....	6
2. Aktivitas $\alpha$ -glukosidase hasil pemurnian.....	32

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Beras ketan putih.....	7
2. Struktur amilosa dan amilopektin .....	9
3. Pemurnian enzim metode dialisis .....	12
4. Struktur karagenan .....	16
5. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase.....	29
6. Grafik aktivitas spesifik $\alpha$ -glukosidase hasil fraksinasi dengan amonium sulfat .....	30
7. Grafik aktivitas spesifik $\alpha$ -glukosidase sebelum dan setelah dialisis ...	31
8. Grafik pengaruh waktu terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis	33
9. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis .....	34
10. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis	35
11. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis .....	36
12. Grafik hubungan antara $1/[S]$ terhadap $1/V$ $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis.....	37
13. Grafik variasi konsentrasi ion logam terhadap aktivitas relatif $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis .....	39
14. Grafik pengaruh waktu terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase amobil.....	40
15. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase amobil.....	41
16. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase .....	41
17. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase amobil.....	42
18. Grafik hubungan antara $1/[S]$ terhadap $1/V$ $\alpha$ -glukosidase amobil.....	43

19. Grafik variasi konsentrasi ion logam terhadap aktivitas relatif $\alpha$ -glukosidase amobil .....	44
20. Grafik hubungan antara perulangan pemakaian terhadap aktivitas $\alpha$ -glukosidase amobil .....	45

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Preparasi sampel, isolasi dan penentuan pH buffer optimum ekstrak kasar enzim.....	53
2. Tabel aktivitas $\alpha$ -glukosidase pada berbagai nilai pH .....	54
3. Uji aktivitas dan kadar protein $\alpha$ -Glukosidase .....	55
4. Kurva standar BSA untuk pengukuran kadar protein dengan metode Lowry .....	56
5. Pemurnian enzim $\alpha$ -glukosidase .....	57
6. Tabel aktivitas $\alpha$ -glukosidase hasil fraksinasi dengan amonium sulfat .....	58
7. Tabel kejenuhan amonium sulfat dan perhitungan massa amonium sulfat untuk fraksinasi .....	59
8. Karakterisasi enzim $\alpha$ -glukosidase bebas .....	60
9. Tabel hasil karakterisasi $\alpha$ -glukosidase bebas .....	61
10. Amobilisasi dan uji perulangan enzim $\alpha$ -glukosidase.....	63
11. Tabel hasil karakterisasi $\alpha$ -glukosidase amobil .....	64
12. Dokumentasi penelitian tahap isolasi enzim $\alpha$ -glukosidase.....	66
13. Dokumentasi penelitian tahap fraksinasi enzim $\alpha$ -glukosidase .....	67
14. Dokumentasi penelitian tahap dialisis enzim $\alpha$ -glukosidase .....	68
15. Dokumentasi penelitian tahap karakterisasi enzim $\alpha$ -glukosidase bebas dan yang telah diamobilisasi .....	69

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara maritim dan negara kepulauan dengan wilayah daratan yang sangat subur. Oleh sebab itu, Indonesia memiliki hasil pertanian yang beragam dan bermutu cukup baik. Sekitar 20% dari daratan Indonesia merupakan lahan pertanian khususnya padi (Lasabuda, 2013; Marhawati dan Laapo, 2001). Pada tahun 1986-1987 dan 2006-2008, Indonesia menjadi negara swasembada beras terbesar di dunia (BPS dan The Rice report, 2003).

Beras dengan nama latin *Oryza sativa* mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin, air, dan mineral, sehingga tidak mengherankan beras dijadikan sebagai makanan pokok di berbagai negara. Selain zat-zat gizi tersebut, beras dapat pula mengandung enzim karena mikroorganisme penghasil enzim di dalamnya seperti bakteri endofit dapat tumbuh dan berkembang (Pujiyanto dan Rejeki, 2010). Enzim yang dapat diperoleh dari beras adalah enzim  $\alpha$ -glukosidase. Enzim  $\alpha$ -glukosidase (EC 3.2.1.20) merupakan enzim golongan hidrolase dan subgolongan karbohidrolase yang mengkatalisis reaksi hidrolisis dari ikatan 1,4- $\alpha$ -glikosida pada titik percabangan amilopektin dan glikogen disertai dengan pembebasan  $\alpha$ -glukosa (Budiman, 2011).

Tanaman golongan serelia (Poaceae atau Graminae) seperti *barley* dan padi merupakan sumber  $\alpha$ -glukosidase yang telah banyak diisolasi dan diteliti. Pada beras, enzim  $\alpha$ -glukosidase terdapat pada bagian dinding sel yang berdampingan dengan substratnya dan enzim-enzim lain yang berperan pada



metabolisme karbohidrat. Enzim  $\alpha$ -glukosidase berfungsi untuk menghidrolisis pati dan pada perkecambahan biji enzim ini berfungsi untuk menghidrolisis oligosakarida (Risma, 2012).

Enzim  $\alpha$ -glukosidase pada manusia, terdapat pada membran lisosom sel epitel instin dan berperan pada pencernaan karbohidrat makanan.  $\alpha$ -glukosidase dapat memutus ikatan glikosida  $\alpha(1\rightarrow6)$  pada titik percabangan amilopektin dan glikogen menghasilkan glukosa terlarut (Risma, 2012). Penderita Diabetes Melitus (DM) tipe 2, inhibisi terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase menyebabkan penghambatan absorpsi glukosa sehingga dapat mengurangi keadaan hiperglikemia setelah makan (Bösenberg dan Zyl, 2008). Saat ini, ada 3 jenis obat golongan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang digunakan pada pengobatan DM tipe 2, yaitu: acarbose (glucobay), miglitol (glyset) dan voglibose, namun terdapat beberapa efek samping dari penggunaan inhibitor tersebut, yaitu: perut kembung, rasa tidak nyaman pada perut, diare, dan hepatitis akut (Bösenberg dan Zyl, 2008). Penelitian untuk mencari senyawa analog obat sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dari berbagai sumber bahan alam seperti, tanaman dan mikroorganisme telah banyak dilakukan. Senyawa analog tersebut diharapkan memiliki efek samping minimal, sehingga aman digunakan pada penderita DM tipe 2 (Febrinda dkk., 2013). Dalam menunjang kegiatan penelitian, pencarian senyawa analog sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase diperlukan ketersediaan enzim  $\alpha$ -glukosidase dalam jumlah dan kadar kemurnian yang cukup. Enzim ini tersedia di pasaran, tetapi harganya relatif mahal, sehingga perlu dilakukan isolasi dan pemurnian enzim  $\alpha$ -glukosidase dari berbagai sumber bahan alam yang terdapat di Indonesia (Febrinda dkk., 2013).

Penelitian terkait mengenai isolasi enzim  $\alpha$ -glukosidase dari gabah telah dilakukan oleh Budiman (2011) memperoleh aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase tepung gabah sebesar 23,75 mU/mL, enzim tersebut setelah dimurnikan melalui fraksinasi dengan amonium sulfat (20-70%) menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik menjadi 41,16 mU/mg pada pH optimum 6. Risma (2012) menggunakan sampel beras lapuk memperoleh aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase sebesar 90,3 mU/mL, enzim tersebut setelah dimurnikan melalui fraksinasi dengan amonium sulfat (20-50%) menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik menjadi 238,9 mU/mg pada pH optimum 5, serta hasil uji kinetiknya menunjukkan nilai  $V_{max}$  sebesar 0,55 dan  $K_m$  sebesar 5,17 mM. Sampel beras ketan putih digunakan dalam penelitian ini karena mempunyai kandungan karbohidrat yang cukup tinggi yaitu 79,40 gram dalam 100 gram bahan (Haryadi, 2013). Tingginya kadar karbohidrat dalam beras ketan ini, menyebabkan kadar patinya pun cukup tinggi, sehingga dapat diisolasi lebih banyak enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras ketan tersebut (Lukman dkk., 2013).

Enzim pada umumnya hanya dapat digunakan sekali, setelah itu enzim tersebut akan rusak. Agar enzim dapat digunakan berulang kali, maka enzim perlu untuk diamobilisasi. Metode amobilisasi ada beberapa cara, namun dalam penelitian ini dilakukan metode amobilisasi mikroenkapsulasi, karena menurut Sebayang (2006) enzim yang telah diamobilisasi dengan metode mikroenkapsulasi dapat digunakan sampai 5 kali pemakaian. Matriks mikroenkapsulasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah karagenan, karena memiliki kelebihan yakni sebagian besar karagenan mengandung natrium, magnesium dan kalsium yang dapat terikat dengan kopolimer 3,6-anhidro-galaktosa (Imeson, 2010). Karagenan memiliki kemampuan untuk membentuk gel

secara *thermoreversible* (Compo dkk., 2009), proses pemanasan dengan temperatur yang lebih tinggi mengakibatkan polimer karagenan dalam larutan menjadi *random coil*, bila temperatur terus diturunkan, maka polimer akan membentuk struktur *double helix* sehingga polimer-polimer ini akan terikat silang secara kuat dan gel yang terbentuk semakin kuat (Tanjung dkk., 2013). Berdasarkan latar belakang maka dilakukan penelitian isolasi dan pemurnian enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras ketan putih serta amobilisasi dengan matriks karagenan secara mikroenkapsulasi.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang, maka masalah dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. berapa aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase yang diisolasi dari beras ketan putih sebelum dan setelah dimurnikan?
2. bagaimana karakteristik enzim  $\alpha$ -glukosidase bebas dari beras ketan putih dan yang telah diamobilisasi dengan matriks karagenan secara mikroenkapsulasi?
3. berapa pemakaian ulang optimum enzim  $\alpha$ -glukosidase amobil?

## **1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Maksud Penelitian**

Maksud penelitian adalah untuk mengetahui dan mempelajari isolasi, pemurnian dan karakteristik enzim  $\alpha$ -glukosidase bebas dari beras ketan putih serta enzim  $\alpha$ -glukosidase amobil dengan matriks karagenan secara mikroenkapsulasi.

### **1.3.2 Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah, maka penelitian ini bertujuan untuk:

1. menentukan aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase yang diisolasi dari beras ketan putih sebelum dan setelah dimurnikan,
2. menentukan waktu inkubasi optimum, pH optimum, suhu optimum, konsentrasi substrat optimum dan pengaruh ion-logam terhadap aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase bebas dari beras ketan putih dan yang telah diamobilisasi dengan matriks karagenan secara mikroenkapsulasi, dan
3. menentukan perulangan pemakaian optimum enzim  $\alpha$ -glukosidase amobil.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. dapat dijadikan informasi tambahan bagi civitas akademika mengenai produksi enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras ketan putih dan amobilisasi dengan matriks karagenan secara mikroenkapsulasi.
2. dapat memperkaya sumber enzim  $\alpha$ -glukosidase untuk keperluan pencarian inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase yang dapat digunakan sebagai senyawa analog obat khususnya dalam pengobatan DM tipe 2.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Beras Ketan Putih (*Oryza sativa* Var. *Glutinosa*)

Menurut Steenis (2003), ketan adalah sejenis beras yang diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisio	: Spermatophyta
Sub divisio	: Angiospermae
Classis	: Monocotyledonae
Ordo	: Graminales/Poales
Familia	: Gramineae/Poaceae
Genus	: <i>Oryza</i>
Spesies	: <i>Oryza sativa</i> L.
Varietas	: <i>Oryza sativa</i> Var. <i>Glutinosa</i>

Tabel 1. Komposisi beras ketan putih dalam 100 g bahan (Direktorat gizi,1981)

Komponen	Jumlah
Kalori (Kal)	362
Protein (g)	6,7
Lemak (g)	0,7
Karbohidrat (g)	79,4
Kalsium (mg)	12
Besi (mg)	0,8
Vitamin B1 (mg)	0,16
Air (g)	12

Beras ketan putih banyak terdapat di Indonesia dengan jumlah produksi sekitar 42.000 ton per tahun, namun penggunaannya di Indonesia masih terbatas pada industri makanan (Kadan dkk., 1997). Sesuai dengan Tabel 1, beras ketan

putih merupakan bahan yang mempunyai kandungan karbohidrat yang cukup tinggi yaitu 79,40 gram dalam 100 gram bahan (Haryadi, 2013). Tingginya kadar karbohidrat dalam beras ketan putih ini, maka kadar patinya pun cukup tinggi, sehingga dapat diisolasi lebih banyak enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras ketan tersebut (Lukman dkk., 2013).



Gambar 1. Beras ketan putih (Anonim, 2016)

## 2.2 Enzim $\alpha$ -glukosidase dan Manfaatnya

Enzim  $\alpha$ -glukosidase yang diisolasi dari tanaman seperti gandum, jagung, beras, bayam, dan bit tergolong dalam enzim  $\alpha$ -glukosidase tipe II. Dari tipe I dan II, hanya tipe II yang mampu menghidrolisis substrat polisakarida yaitu pati yang larut air (Kimura dkk., 2004).

Enzim  $\alpha$ -glukosidase adalah enzim hidrolitik yang terlibat dalam degradasi pati simpanan pada biji yang berada dalam tahap perkecambahan dan secara umum dianggap sebagai enzim yang mengubah oligosakarida yang diproduksi oleh  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase dan enzim pemecah cabang menjadi glukosa. Namun  $\alpha$ -glukosidase telah dilaporkan menghidrolisis pati terlarut dan memecah butiran pati yang ada sebagai polisakarida tak larut pada benih tanaman. Selain itu, enzim  $\alpha$ -glukosidase bekerja secara sinergis dengan  $\alpha$ -amilase dalam pemecahan butiran pati (Nakai, 2007).

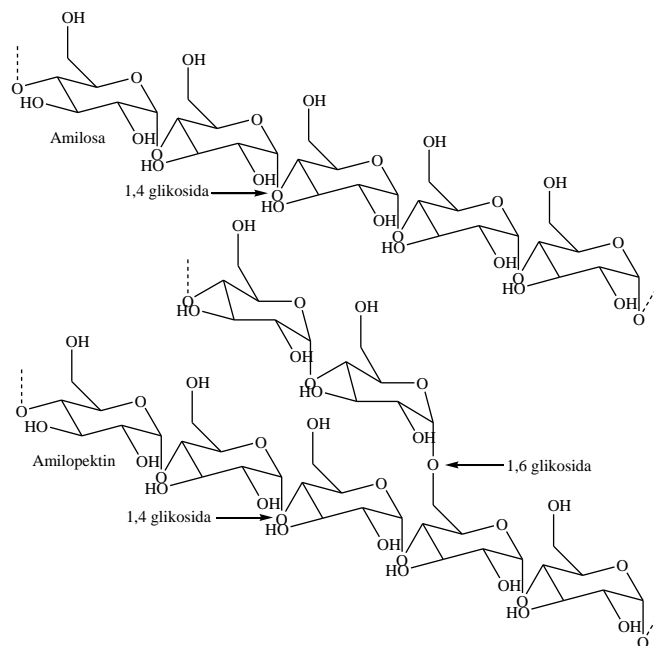
Enzim  $\alpha$ -glukosidase pada manusia terdapat pada membran lisosom sel epitel instin dan berperan pada pencernaan karbohidrat makanan.  $\alpha$ -glukosidase dapat memutus ikatan glikosida  $\alpha(1\rightarrow6)$  pada titik percabangan amilopektin dan glikogen menghasilkan glukosa (Risma, 2012). Enzim  $\alpha$ -glukosidase berperan penting dalam bidang medis, untuk pencarian inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase dan senyawa obat baru untuk keperluan pengobatan Diabetes Melitus (DM) khususnya DM tipe 2, inhibisi terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase menyebabkan penghambatan absorpsi glukosa sehingga dapat mengurangi keadaan hiperglikemia setelah makan. Saat ini, ada 3 jenis senyawa inhibitor  $\alpha$ -glukosidase yang digunakan pada pengobatan DM tipe 2, yaitu: acarbose (glucobay), miglitol (glyset) dan voglibose (Bösenberg dan Zyl, 2008).

Penelitian terkait mengenai isolasi enzim  $\alpha$ -glukosidase dari gabah telah dilakukan oleh Budiman (2011) memperoleh aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase tepung gabah sebesar 23,75 mU/mL, enzim tersebut setelah dimurnikan melalui fraksinasi dengan amonium sulfat (20-70%) menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik menjadi 41,16 mU/mg pada pH optimum 6. Risma (2012) menggunakan sampel beras lapuk memperoleh aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase sebesar 90,3 mU/mL, enzim tersebut setelah dimurnikan melalui fraksinasi dengan amonium sulfat (20-50%) menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik menjadi 238,9 mU/mg pada pH optimum 5, serta hasil uji kinetiknya menunjukkan nilai  $V_{max}$  sebesar 0,55 dan  $K_m$  sebesar 5,17 mM.

### **2.3 Pati**

Pati merupakan polimer tersusun dari monomer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik dan ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik. Pati terdiri

atas dua komponen utama yaitu: amilosa dan amilopektin (Arfah, 2016). Menurut Poedjiadi (1994), kandungan amilosa dan amilopektin pada setiap pati berbeda tergantung dari sumber pati tersebut. Semakin banyak kandungan amilopektin, maka pati tersebut akan mudah larut dalam air, sehingga akan lebih mudah memutus ikatan glikosida pada pati tersebut menjadi glukosa (Bailey, 1986).



Gambar 2. Struktur amilosa dan amilopektin (Parker dan Ring, 2001)

Pemutusan rantai polimer pati dapat dilakukan dengan berbagai cara misalnya secara enzimatik, asam ataupun kombinasi keduanya. Hidrolisis secara enzimatik memiliki perbedaan mendasar dibandingkan hidrolisis secara asam dalam hal spesifitas pemutusan rantai polimer pati. Hidrolisis secara kimiawi dan fisik akan memutus rantai secara acak sedangkan hidrolisis enzimatik akan memutus rantai polimer pati secara spesifik pada percabangan tertentu (Norman, 1981). Contohnya, enzim  $\alpha$ -glukosidase yang dapat memutus ikatan glikosida  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  pada titik percabangan amilopektin dan glikogen menghasilkan glukosa (Risma, 2012).



## **2.4 Tahapan Pemurnian Enzim**

Menurut Dennision (2002), tahapan pemurnian enzim sangat erat kaitannya dengan pemurnian protein. Dasar dari pemisahan ini adalah memisahkan protein dari semua protein lain yang tidak diperlukan yang semuanya berada pada material yang sama. Secara umum, pemurnian protein dapat digolongkan dalam tiga tahapan yaitu: ekstraksi, fraksinasi dengan *salting out* dan dialisis.

### **2.4.1 Ekstraksi**

Material yang memiliki aktivitas enzim diperlakukan untuk memindahkan protein ke dalam bentuk terlarut sehingga dapat dimanipulasi. Bila material awal merupakan sel hewan atau tanaman, maka metode penghancuran sel dan melepaskan enzim ke dalam larutan ekstrak jernih dapat diperoleh dengan melakukan filtrasi atau sentrifugasi untuk memisahkan material yang tidak larut, sehingga didapatkan homogenat (Palmer, 1991).

Enzim-enzim yang terdapat dalam sitoplasma dapat diekstrak dengan penghancuran membran plasma sel sehingga enzim dapat keluar ke dalam medium ekstraksi. Dari material berupa sereal atau tepung enzim dapat diekstrak dengan menemukannya dalam medium cair dan pengadukan (Scopes, 1994).

Medium ekstraksi (larutan buffer) dimana enzim akan keluar setelah sel mengalami pemecahan harus dijaga temperaturnya di bawah 4 °C agar enzim dalam sel hidup tidak aktif sehingga meminimalkan kehilangan aktivitas. Selain itu, pH yang dipakai adalah pH dimana enzim tersebut stabil serta harus jauh dari titik isoelektrik enzim karena pada titik ini kelarutan protein paling rendah (Scopes, 1994).

#### **2.4.2 Fraksinasi dengan *Salting out***

Metode fraksinasi enzim yang paling banyak dipakai adalah fraksinasi dengan menggunakan garam amonium sulfat (Palmer, 1991). Prinsip pengendapan dengan amonium sulfat berdasarkan pada kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak-menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein pada pH dan suhu tertentu akan meningkat saat konsentrasi garam meningkat sampai pada konsentrasi tertentu (*salting in*). Selanjutnya, pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu, kelarutan protein akan menurun (*salting out*), karena molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak sehingga terjadi penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa pengendapan dengan garam amonium sulfat mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi dan kemudian mengendap (Scopes, 1994).

Ikatan hidrogen antara protein dengan air menstabilkan protein dalam larutan, namun di samping itu, terbentuk pula interaksi antara yang bersifat nonpolar antara sesama molekul protein. Interaksi ini membentuk suatu daerah non-polar tunggal yang memaksa air keluar dan membentuk suatu lingkaran yang hidrofobik (Palmer, 1991).

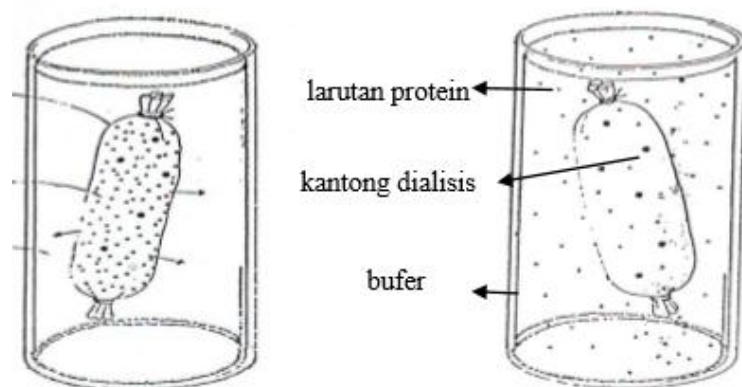
Enzim yang diendapkan dengan metode ini akan terpisah dari protein lain yang tertinggal dalam larutan. Konsentrasi garam ditingkatkan bertahap dengan tujuan mendapatkan endapan protein yang diinginkan dan membuang endapan protein yang tidak diinginkan. Kemudian endapan tersebut dilarutkan kembali dan sisa garam dihilangkan dengan dialisis, maka sampai disini didapatkan ekstrak enzim kasar (Scopes, 1994).

Menurut Scopes (1994), bahwa amonium sulfat merupakan garam yang umumnya digunakan untuk mengendapkan protein karena mempunyai keuntungan yaitu:

1. memiliki daya larut yang tinggi dalam air,
2. tidak mengandung zat yang bersifat toksik,
3. protein stabil di dalam larutan amonium sulfat 2-4 M,
4. protein terlindungi dari denaturasi, dan
5. membatasi pertumbuhan bakteri serta relatif murah.

### 2.4.3 Dialisis

Dialisis merupakan proses yang digunakan untuk menghilangkan molekul kecil seperti garam atau larutan protein dari enzim yang didapatkan melalui tahapan sebelumnya atau tahapan pemurnian dengan garam amonium sulfat. Prinsip dialisis adalah difusi zat terlarut melalui membran semipermeabel ketika membran menjadi batas antara dua larutan yang berbeda konsentrasi. Membran bertindak seperti saringan dengan ukuran pori tertentu. Molekul dengan jari-jari molekul yang lebih besar dari ukuran pori akan tertahan seluruhnya sedangkan yang berjari-jari lebih kecil akan lolos (Scopes, 1994).



Gambar 3. Pemurnian enzim metode dialisis (Stryer, 1995)

## 2.5 Metode Amobilisasi Enzim

Menurut Lee (1996), secara tradisional enzim digunakan secara langsung, dengan melarutkan enzim bebas ke dalam larutan substrat. Penggunaan secara langsung dari enzim bebas pada skala besar mempunyai beberapa kelemahan antara lain:

1. enzim bebas hanya dapat digunakan untuk satu kali proses karena enzim sukar dipisahkan dari produknya, dan
2. Diperlukan proses inaktivasi enzim pada akhir reaksi, sehingga enzim dapat digunakan lebih efisien dan berulang kali.

Amobilisasi enzim artinya enzim dibatasi atau terlokalisasi sehingga enzim dapat digunakan secara berkelanjutan (James dkk., 1977). 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 (Yeshajahu dan Clifton, 1987), dapat digunakan berulang-ulang, penghentian reaksi dapat dikerjakan secara cepat dengan memindahkan enzim dari larutan reaksi. Pada proses analitik waktu paruh panjang, kecepatan peluruhan yang dapat diramalkan dan pembuatan reagen dapat dihemat (Wuryanti, 2006).

Menurut Kourkoutas dkk. (2004), amobilisasi sel dalam sebuah matriks dapat dilakukan dengan absorpsi, penjebakan dalam matriks berpori dan mikroenkapsulasi. Sedangkan menurut Lee (1996), amobilisasi enzim diklasifikasikan menjadi tipe ikatan karier, ikatan silang dan penjebakan.

Menurut Lee (1996), amobilisasi enzim dapat dianggap sebagai perubahan enzim dari larut dalam air keadaan bebas menjadi keadaan tidak bebas

dan tidak larut. Amobilisasi mencegah difusi enzim ke dalam campuran reaksi dan mempermudah memperoleh kembali enzim tersebut dari aliran produk dengan teknik pemisahan padat atau cair yang sederhana. Ada 5 metode amobilisasi yaitu:

1. absorpsi enzim pada bahan pendukung,
2. pengikatan enzim secara kovalen pada bahan pendukung,
3. pengikatan silang enzim pada bahan pendukung,
4. penjeratan enzim dalam suatu bahan pendukung, dan
5. mikroenkapsulasi.

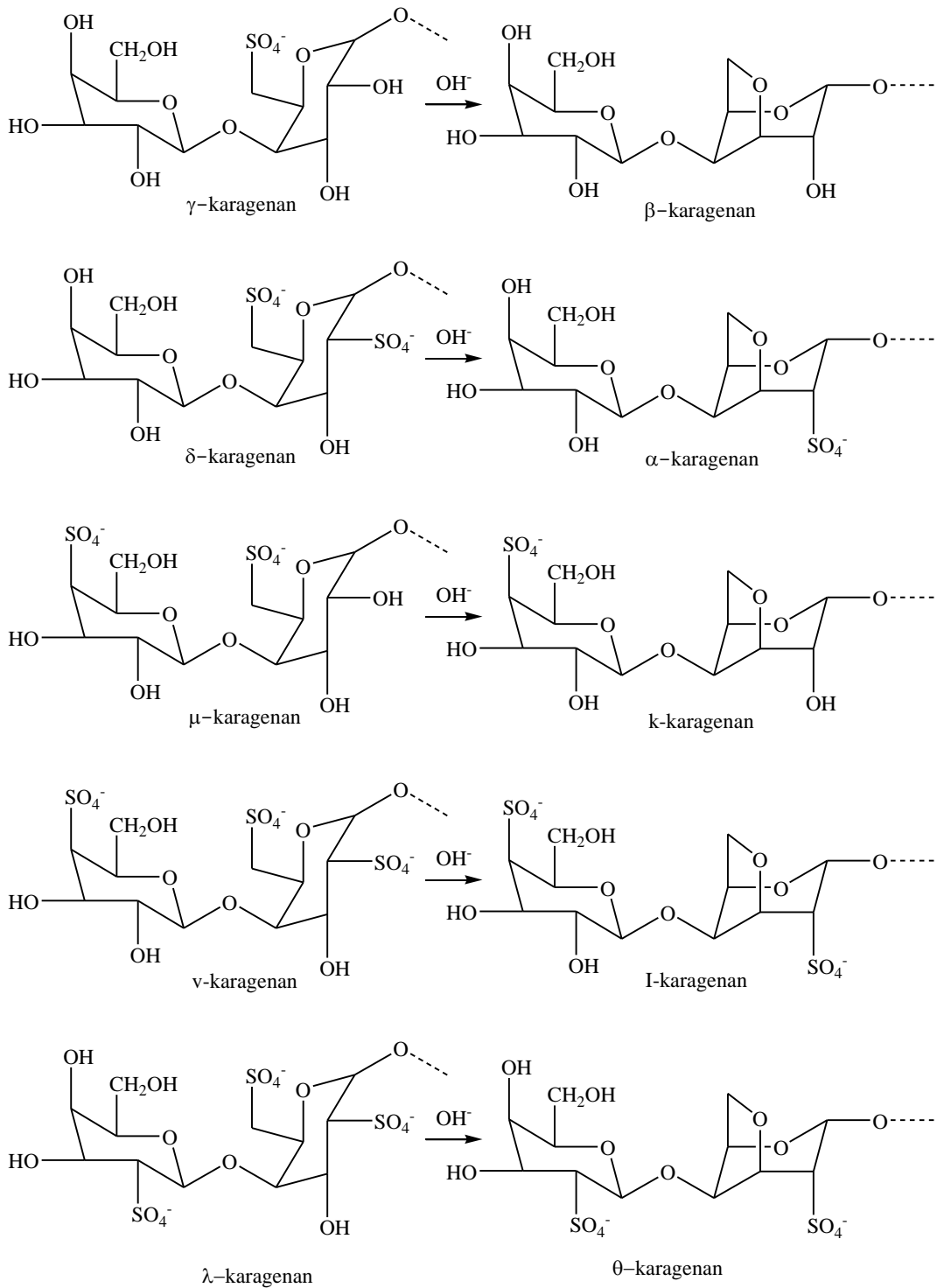
Ide awal penggunaan mikroenkapsul dilakukan untuk melindungi transplantasi sel. Sel dikelilingi oleh matriks yang mempunyai kekuatan mekanik yang cukup tetapi dapat dilewati oleh molekul-molekul kecil nutrisi dan oksigen yang diperlukan oleh pertumbuhan sel. Material palapis biasanya terbuat dari polimer alam (Talebnia dkk., 2006). Alasan utama penggunaan polimer untuk enkapsulasi adalah kemampuannya untuk berada pada fasa yang berbeda seperti cair, gel maupun padat yang memungkinkan untuk mempunyai kekuatan mekanik dan fisik yang cukup (Kampf, 2002). Imobilisasi sel dapat meningkatkan yield produk fermentasi. *Saccharomyces cerevisiae* yang dimobilisasi dengan menggunakan alginat dapat meningkatkan etanol yang dihasilkan hingga 3,5 kali dibandingkan dengan sel bebas (Talebnia dkk., 2006). Imobilisasi sel juga dapat digunakan dalam proses berkelanjutan tanpa mengalami kehilangan biomassa sel (Pilkington dkk., 1998). Metode enkapsulasi mulai digunakan sejak tahun 1993 sebagai teknologi alternatif dalam teknik penjebakan sel dalam matriks dan telah banyak diaplikasikan dalam berbagai proses bioproses seperti imobilisasi enzim, sel buatan dan biosorben (Park dan Chang, 2000). Metode penjebakan

(entrapping) yaitu enzim ditempatkan pada suatu kisi dari polimer membran ataupun pada suatu matriks salah satunya adalah karagenan (Wuryanti, 2006).

Beberapa penelitian mengenai amobilisasi enzim menggunakan matriks karagenan telah dilakukan seperti Wuryanti (2006), melaporkan bahwa enzim bromelin dari bonggol nanas dapat distabilkan dengan proses amobilisasi. Aktivitas spesifik enzim bromelin amobil dapat dipertahankan pada pemakaian 2 kali dengan kondisi optimum enzim bromelin amobil, waktu inkubasi 5 menit, suhu inkubasi 33 °C dan pH 6,5. Tanjung dkk. (2013), melaporkan bahwa kondisi optimum amobilisasi pektinase dicapai pada konsentrasi karagenan 0,050 g/mL dan konsentrasi pektinase 1,263 mg/mL menghasilkan pektinase terjebak sebanyak 3,048 mg/g karagenan dengan aktivitas pektinase amobil sebesar 348,5 unit. Sebayang (2006), melaporkan bahwa enzim bromelin dari bonggol nanas mempunyai aktivitas enzim sebesar 107,80 unit/mL pada kondisi pH 7,5, suhu 55 °C dengan lama inkubasi 15 menit. Enzim bromelin amobil dengan karagenan sebagai matriks polimer diperoleh aktivitas enzim 106,12 unit/mL pada kondisi pH 7,5 suhu 60 °C dengan lama inkubasi 15 menit.

## **2.6 Karagenan**

Karagenan adalah polisakarida yang mengandung sulfat, lebih dari 20% bagian gula tersulfonasi tidak larut dalam air dingin. Tetapi dapat dilarutkan dengan pemanasan dan pada pendinginan berbentuk gel. Temperatur terjadinya gel dan kualitas gel tergantung pada konsentrasi polimer setara dengan jumlah dan tipe ikatan yang ada. Karagenan dapat diperoleh dari rumput laut jenis *Euchema cottonii*. Unit-unit penyusun polisakarida karagenan adalah beta-D-galaktosa sulfat dan 5,6-anhidro-alfa-D-galaktosa (Wuryanti, 2006).



Gambar 4. Struktur karagenan (Anggadiredja dkk., 2010)

Karagenan merupakan kelompok polisakarida galaktosa yang diekstraksi dari rumput laut. Sebagian besar karagenan mengandung natrium, magnesium dan

kalsium yang dapat terikat pada gugus ester sulfat dari galaktosa dan kopolimer 3,6-anhidro-galaktosa (Imeson, 2010). Karagenan memiliki kemampuan untuk membentuk gel secara *thermoreversible* yaitu meleleh jika dipanaskan dan membentuk gel kembali jika didinginkan (Compo dkk., 2009). Proses pemanasan dengan temperatur yang lebih tinggi dari temperatur pembentukan gel akan mengakibatkan polimer karagenan dalam larutan menjadi *random coil* (acak). Bila temperatur diturunkan, maka polimer akan membentuk struktur *double helix* (pilinan ganda) dan apabila temperatur terus dilanjutkan, polimer-polimer ini akan terikat silang secara kuat dan gel yang terbentuk semakin kuat. Oleh karena itu, karagenan dapat digunakan sebagai matriks untuk mengamobilisasi enzim dengan menggunakan metode penjebakan (Tanjung dkk., 2013).



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras ketan putih sebagai enzim  $\alpha$ -glukosidase diperoleh dari pasar Daya, Makassar, akuades, akuabides,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1 N, Na-asetat trihidrat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , K-Na-Tartrat, Peraksi Folin-Ciocalteu, Bovin Serum Albumin (BSA), p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), Na-EDTA,  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , karagenan, NaCl, KCl, kertas saring, kain kasa, kertas pH universal (Merck), *icebath*, *aluminum foil*, *tissue roll*, dan kertas label.

#### **3.2 Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektronik 20 D+ (Thermo), neraca analitik (Ohaus), mikropipet, penangas air, termometer, mesin blender (Kirin), *magnetic stirrer*, sentrifuge dingin (Kubota 6800), ayakan 100 mesh, kantong selofan untuk dialisis, pH meter (Merck), dan alat-alat gelas yang umum digunakan dalam laboratorium.

#### **3.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini berlangsung selama 6 bulan, mulai dari bulan Februari-Juli 2017, bertempat di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Bioteknologi terpadu, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar.

### **3.4 Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Preparasi Sampel sebagai Sumber Enzim $\alpha$ -Glukosidase**

Sampel sumber enzim berupa beras ketan putih dihaluskan menjadi tepung menggunakan blender, kemudian disaring dengan ayakan (ukuran 100 Mesh). Sampel tersebut digunakan lebih lanjut dalam penelitian ini.

#### **3.4.2 Isolasi dan Penentuan pH Buffer Optimum Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase (Risma, 2012)**

Tepung beras ketan sebanyak 20 g dicampurkan ke dalam 50 mL buffer asetat pH 5,0; dan buffer fosfat pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0, diaduk satu jam dengan *magnetic stirrer* dilengkapi dengan *icebath*, dibiarkan  $\pm$  12 jam dalam lemari pendingin. Selanjutnya homogenat yang diperoleh, disaring dengan kain kasa dan filtratnya disentrifugasi 3500 rpm suhu 4 °C selama 20 menit. Supernatan dipisahkan dengan residu, volume supernatan diukur dan ditempatkan dalam wadah berbeda kemudian diuji aktivitas enzimnya untuk masing-masing variasi pH. Larutan enzim dengan aktivitas paling tinggi akan digunakan lebih lanjut untuk dimurnikan.

#### **3.4.3 Uji Aktivitas Enzim $\alpha$ -Glukosidase (Sigma Aldrich, 1996)**

Uji aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan cara mencampurkan 5 mL buffer hasil optimasi dan 0,2 mL larutan enzim ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 mM. Larutan tersebut kemudian diukur serapannya dengan spektrometri UV pada panjang gelombang maksimum (400 nm) dan dihitung aktivitas enzimnya menggunakan rumus pada persamaan (1).

$$AE = \frac{(A \text{ Sampel} - A \text{ Blanko}) \cdot V_k \cdot V_c}{k \cdot t \cdot V_{ck} \cdot V_e} \quad (1)$$

Keterangan:

- AE = aktivitas enzim (Unit/mL)
- $V_c$  = volume campuran reaksi
- $V_k$  = volume total penentuan kolorimetrik
- $V_{ck}$  = volume campuran reaksi dalam penentuan kolorimetrik
- $V_e$  = volume larutan enzim
- k = koefisien ekstingsi milimolar
- t = waktu pengujian

Satu unit aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang membebaskan 1  $\mu$ mol D-glukosa dari substrat p-Nitrofenil  $\alpha$ -D-Glukopiranosida per menit pada pH optimum dan suhu 37 °C.

#### 3.4.5 Penentuan Kadar Protein Enzim $\alpha$ -Glukosidase (Lowry dkk., 1951)

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry dengan terlebih dahulu menyiapkan larutan berikut:

- Larutan A : 2 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 0,4 gram NaOH dalam 100 mL air
- Larutan B : 0,25 gram  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan 0,5 g NaK-Tartrat dalam 50 ml air
- Larutan C : ke dalam 50 mL Larutan A tambahkan 1 mL larutan B
- Larutan D : ke dalam 10 mL Folin tambahkan 10 mL air

Sebanyak 0,5 mL larutan enzim dicampur dengan 3,5 mL akuades kemudian ditambahkan 5,5 mL pereaksi C, lalu dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit. Selanjutnya, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, lalu dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dan dihitung kadar proteinnya. Serapan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (660 nm). Sebagai larutan standar digunakan BSA dengan variasi konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; dan 0,6 mg/mL. Pada pengukuran blanko, larutan enzim diganti dengan akuades.

### 3.4.6 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Glukosidase

#### 3.4.6.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat (Bollag dan Edelstein, 1991)

Ekstrak kasar enzim terpilih difraksinasi menggunakan garam amonium sulfat pada beberapa tingkat kejenuhan (0-100%) berdasarkan metode dengan menggunakan tabel pada Lampiran 7. Proses pengendapan dilakukan pada tingkat kejenuhan yaitu 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100%. Ekstrak kasar enzim yang diketahui volumenya ditempatkan dalam wadah di atas *magnetic stirrer* yang dilengkapi *ice bath*. Garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-20% ditambahkan ke dalam ekstrak kasar sedikit demi sedikit. Selama proses penambahan garam, pengadukan dilakukan secara konstan dan setelah penambahan garam yang terakhir pengadukan masih dilanjutkan hingga 20 menit. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama  $\pm 20$  jam pada suhu 4 °C. Campuran tersebut selanjutnya disentrifugasi 8000 rpm selama 20 menit suhu 4 °C. Endapan yang diperoleh dipisahkan dari supernatan dan dicampurkan dengan buffer hasil optimasi pH hingga larut. Endapan ini untuk selanjutnya disebut fraksi I. Supernatan difraksinasi lebih lanjut setelah didiamkan  $\pm 12$  jam dalam lemari pendingin dengan ditambahkan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100% untuk mendapatkan endapan pada setiap fraksi yang selanjutnya secara berturut-turut disebut fraksi II, III, IV, dan V. Ekstrak kasar, fraksi I, II, III, IV, V, dan filtrat sisa selanjutnya diuji aktivitasnya dan ditentukan kadar proteinnya. Rumus untuk menghitung banyaknya amonium sulfat yang ditambahkan pada masing-masing tingkat kejenuhannya terlihat pada persamaan (2).

$$\text{gram} = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - (0,3 \times S_1)} \times \frac{\text{Volume filtrat (mL)}}{1000} \quad (2)$$

Keterangan:

$S_1$  = tingkat kejenuhan awal

$S_2$  = tingkat kejenuhan akhir

### 3.4.6.2 Dialisis dalam Membran Selofan (Stryer, 1995)

Fraksi amonium sulfat dengan aktivitas enzim tertinggi didialisis. Sebelum dilakukan dialisis, membran selofan dipreparasi dengan cara sebagai berikut: 10 cm membran selofan direbus dalam larutan Na-bikarbonat 2% b/v dalam EDTA 1 mM selama 10 menit (diulang 2-3 kali).

Fraksi amonium sulfat dengan aktivitas enzim tertinggi dimasukkan ke dalam membran selofan, kemudian bagian atas dan bagian bawah membran selofan diikat. Selanjutnya, membran berisi enzim direndam dalam larutan buffer dengan konsentrasi sepuluh kali lebih encer daripada buffer larutan enzim kemudian dilakukan dialisis selama 10 jam pada kondisi dingin, sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Setiap 2 jam dialisat atau buffer diganti, setiap dialisat yang dikeluarkan diuji dengan larutan  $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  2% untuk mengetahui apakah masih terdapat garam. Dialisis dihentikan bila dialisat sudah tidak mengandung garam yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan warna putih. Fraksi enzim hasil dialisis dilakukan pengujian kadar protein, pengujian aktivitas enzim, sehingga dapat ditentukan aktivitas spesifik enzim.

### 3.4.7 Karakterisasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase Bebas (Sigma Aldrich, 1996)

#### 3.4.7.1 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Enzim

Larutan enzim sebanyak 0,2 mL dicampurkan dengan buffer pH optimum sebanyak 5 mL ke dalam 6 tabung reaksi berbeda. Kemudian

ditambahkannya 0,5 mL PNPG 10 mM dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan waktu inkubasi yang bervariasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 menit. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM. Larutan tersebut kemudian diukur serapannya dengan spektrometri 20 D+ pada panjang gelombang maksimum (400 nm) dan dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1), sehingga diperoleh waktu inkubasi optimum yang memiliki aktivitas paling besar.

#### **3.4.7.2 Penentuan pH Optimum Enzim**

Larutan enzim sebanyak 0,2 mL dicampurkan dengan buffer sebanyak 5 mL dengan variasi buffer asetat pH 5,0; dan buffer fosfat pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 ke dalam tabung reaksi berbeda. Kemudian ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan waktu inkubasi optimum. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM. Larutan tersebut kemudian diukur serapannya dengan spektrometri 20 D+ pada panjang gelombang maksimum (400 nm) dan dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1), sehingga diperoleh pH buffer optimum yang memiliki aktivitas paling besar.

#### **3.4.7.3 Penentuan Suhu Optimum Enzim**

Larutan enzim sebanyak 0,2 mL dicampurkan dengan buffer pH optimum sebanyak 5 mL ke dalam 7 tabung reaksi berbeda. Kemudian ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM dan diinkubasi pada variasi suhu 20, 25, 30, 35, 40, 45, dan 50 °C dengan waktu inkubasi optimum. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM. Larutan

tersebut kemudian diukur serapannya dengan spektrometri UV pada panjang gelombang maksimum (400 nm) dan dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1), sehingga diperoleh suhu optimum yang memiliki aktivitas paling besar.

#### 3.4.7.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim

Larutan enzim sebanyak 0,2 mL dicampurkan dengan buffer hasil optimasi sebanyak 5 mL ke dalam 10 tabung reaksi berbeda. Kemudian ditambahkan 0,5 mL PNPG dengan variasi konsentrasi 1-10 mM dan diinkubasi pada suhu hasil optimasi dengan waktu inkubasi hasil optimasi. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM. Larutan tersebut kemudian diukur serapannya dengan spektrometri UV pada panjang gelombang maksimum (400 nm) dan dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1), sehingga diperoleh konsentrasi substrat (S) optimum yang memiliki aktivitas enzim (V) paling besar.

Menurut Putra (2009) V dan S dapat dikonversi menjadi 1/V dan 1/S, lalu ditentukan nilai V<sub>max</sub> dan K<sub>m</sub> yang didasarkan atas persamaan (3), kurva *Lineweaver-Burk*.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

Keterangan:

- V = kecepatan reaksi enzim
- V<sub>max</sub> = kecepatan reaksi maksimum enzim
- K<sub>m</sub> = konstanta Michaelis Menten
- [S] = konsentrasi substrat

Persamaan tersebut analog dengan persamaan linear  $y = ax + b$ , yaitu:

$$\begin{aligned} 1/V &= y \\ Km/ V_{\max} &= a \\ 1/[S] &= x \\ 1/ V_{\max} &= b \end{aligned}$$

#### **3.4.7.5 Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Aktivitas Enzim**

Beberapa ion logam yang digunakan dalam penelitian ini seperti:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , dan  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  dengan variasi konsentrasi 10, 50 dan 250 mM. Larutan enzim sebanyak 0,2 mL dicampurkan dengan buffer hasil optimasi sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,2 mL larutan logam, ditambahkan 0,5 mL PNPG dengan konsentrasi hasil optimasi dan diinkubasi pada suhu hasil optimasi dengan waktu inkubasi hasil optimasi. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL  $Na_2CO_3$  100 mM. Larutan tersebut kemudian diukur serapannya dengan spektrometri UV pada panjang gelombang maksimum (400 nm) dan dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1), sehingga dapat ditentukan pengaruh ion logam tertentu terhadap aktivitas enzim.

#### **3.4.8 Amobilisasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase (Sebayang, 2006)**

Enzim sebanyak 20 mL dimasukkan ke dalam gelas kimia, ditambahkan dengan 5 ml larutan NaCl 0,85%, diaduk pelan-pelan dan dibiarkan selama 3 menit pada suhu 37 °C (larutan 1). Ke dalam gelas kimia dimasukkan 3,5 g karagenan dan 80 ml larutan NaCl 0,85% dipanaskan sampai suhu 80 °C sambil diaduk hingga larut sempurna, lalu dibiarkan hingga suhu 55 °C (larutan 2). Larutan (1) dan (2) dicampur sampai homogen, dibiarkan dingin pada suhu kamar selama 10 menit sampai terbentuk gel. Untuk menambah kekerasan gel direndam



dalam larutan KCl 0,3 M dingin selama  $\pm 20$  jam pada suhu 4 °C. Selanjutnya, gel dipotong-potong. Gel yang sudah dipotong-potong dicuci dengan akuades. Dilakukan uji perulangan untuk menentukan jumlah perulangan pemakaian optimumnya dan dikarakterisasi cara yang sama dengan enzim  $\alpha$ -glukosidase bebas.

#### **3.4.9 Penentuan Perulangan Pemakaian Enzim**

Enzim amobil sebanyak 0,2 mL dicampurkan dengan buffer hasil optimasi sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,5 mL PNPG dengan konsentrasi hasil optimasi dan diinkubasi pada suhu hasil optimasi dengan waktu inkubasi hasil optimasi. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 mM. Larutan tersebut kemudian diukur serapannya dengan spektrometri UV pada panjang gelombang maksimum (400 nm) dan dihitung aktivitas enzimnya dengan persamaan (1). Prosedur tersebut diulangi dengan menggunakan enzim amobil yang sama. Perulangan dihentikan ketika enzim amobil menunjukkan penurunan aktivitas yang signifikan.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Preparasi Sampel sebagai Sumber Enzim $\alpha$ -Glukosidase**

Pemilihan sumber enzim merupakan tahap pertama yang harus dilakukan pada isolasi  $\alpha$ -glukosidase. Pada penelitian ini beras ketan putih lapuk yang berasal dari pasar Daya, Makassar digunakan sebagai sumber enzim. Sumber enzim tersebut dipilih karena beberapa alasan seperti ketersediaan dan kemudahan mendapatkannya, serta kandungan karbohidatnya yang lebih tinggi daripada beras biasa lainnya. Penggunaan beras ketan putih lapuk sebagai sumber enzim adalah untuk memanfaatkan limbah beras ketan putih lapuk yang kandungan gizinya sudah berkurang dan sudah tidak dikonsumsi lagi oleh masyarakat.

Preparasi sampel dilakukan dengan menghancurkan 500 g beras ketan putih menggunakan *blender*, kemudian disaring dengan ayakan sehingga menghasilkan 490 g tepung beras ketan putih. Tepung yang dihasilkan lebih sedikit daripada massa awal beras, karena terdapat beberapa gram beras yang susah untuk dihancurkan sehingga tidak lolos dari ayakan. Proses penepungan ini bertujuan untuk memecah sel dan memperluas permukaan kontak antara beras dengan larutan buffer sehingga enzim yang tersimpan dapat dengan mudah keluar dari beras dan masuk ke dalam buffer. Tepung beras ketan putih kemudian disimpan di dalam *freezer* untuk meng-inaktifkan enzim sehingga meminimalkan penurunan aktivitas enzim serta mencegah adanya pertumbuhan mikroorganisme yang mungkin dapat mengubah kandungan kimia sumber enzim yang akan digunakan (Risma, 2012).

#### **4.2 Isolasi dan Penentuan pH Buffer Optimum Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase**

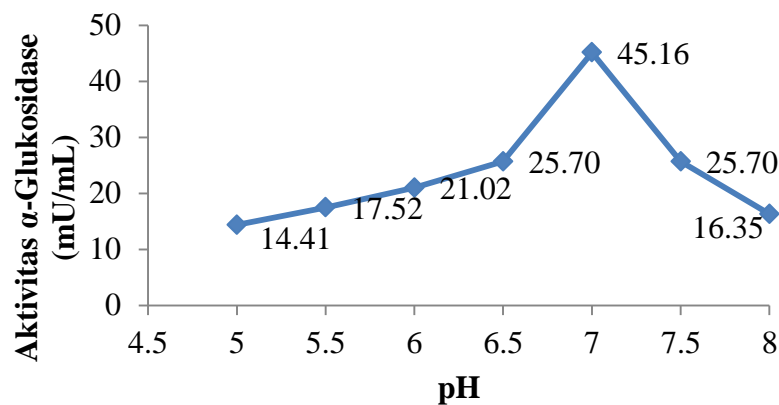
Pada pembuatan ekstrak kasar enzim digunakan tepung beras ketan putih sebagai sumber enzim. Tepung beras ketan putih sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam 50 mL buffer dengan variasi pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0.

Jumlah volume buffer yang digunakan untuk mengekstrak sekurangnya adalah dua kali bahan awal beras ketan putih. Semakin banyak volume buffer yang digunakan maka semakin banyak juga enzim yang akan terekstrak, tetapi ekstrak kasar yang diperoleh menjadi lebih encer. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan perbandingan bahan dengan buffer adalah 2:5, agar enzim dapat terekstrak dan larutan ekstraknya tidak terlalu encer sehingga enzim mudah untuk diisolasi (Budiman, 2011).

Buffer yang digunakan adalah buffer asetat (pH 5) dan fosfat (pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0), karena memiliki beberapa keuntungan yaitu: kisaran kerjanya pada pH 5 hingga 8,8 yang secara umum merupakan pH fisiologis, serta dapat meniru komponen tertentu dari cairan ekstraseluler, tidak beracun pada sel, perubahan suhu tidak mempengaruhi pH secara drastis, serta stabil selama beberapa minggu pada suhu 4 °C. Tujuan variasi pH adalah untuk mengetahui pH optimum medium cair yang baik digunakan dalam ekstraksi  $\alpha$ -glukosidase yang terdapat di dalam beras ketan putih, ditandai dengan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi (Risma, 2012).

Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi berdasarkan Gambar 5 diperoleh pada ekstrak enzim kasar dengan buffer fosfat pH 7 sebesar 45,16 mU/mL. pH optimum yang diperoleh sesuai dengan pH fisiologis enzim. Beras lapuk yang berperan sebagai sumber enzim ini diperkirakan memiliki suasana pH netral

hingga sedikit asam. Hal ini kemungkinan karena jamur dan kutu beras yang terdapat pada beras lapuk dapat memproduksi senyawa-senyawa bersifat asam. Pada pH 5 terlihat aktivitas enzim rendah, karena pH 5 masih terlalu asam untuk  $\alpha$ -glukosidase, sehingga  $\alpha$ -glukosidase tidak maksimal dalam menghidrolisis. Namun, pada pH di atas 7 terlihat aktivitas enzim menurun. Hal ini dikarenakan pada pH basa tidak cocok dengan situasi fisiologis enzim, dengan kata lain pH yang terlalu asam atau basa tidak cocok dengan  $\alpha$ -glukosidase (Risma, 2012).

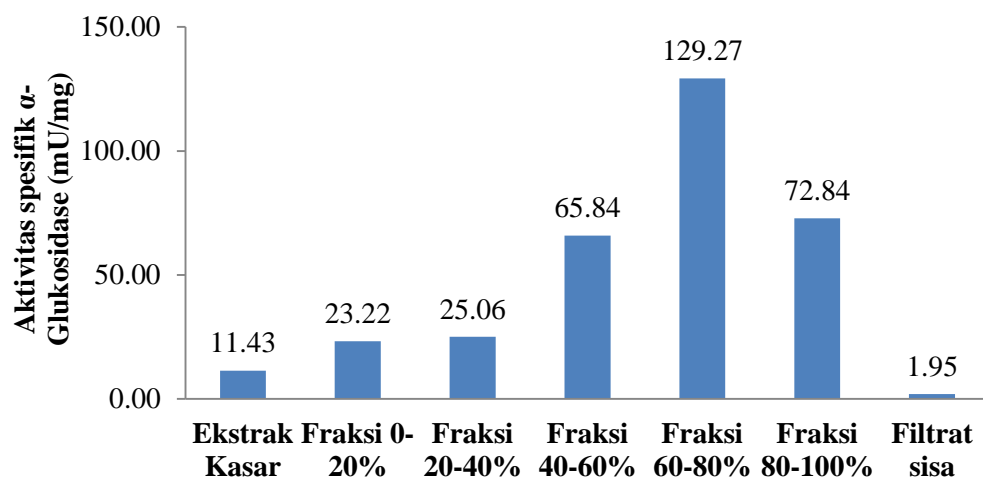


Gambar 5. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase ekstrak kasar (suhu 37 °C, waktu 20 menit dan konsentrasi substrat 10 mM)

#### 4.3 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Glukosidase

Isolasi enzim pada buffer pH 7 selanjutnya dilakukan dalam skala yang lebih besar, sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dimurnikan dengan fraksinasi bertingkat menggunakan garam amonium sulfat. Garam amonium sulfat digunakan untuk memurnikan enzim karena bersifat higroskopis sehingga dapat berinteraksi kuat dengan air. Hal ini menyebabkan berkurangnya interaksi antara protein dengan air sehingga protein mengalami presipitasi dari larutan dan protein terpisah dari mono dan oligosakarida, nukleotida, asam amino bebas, sedangkan protein lainnya tetap berada dalam larutan (Palmer, 1991).

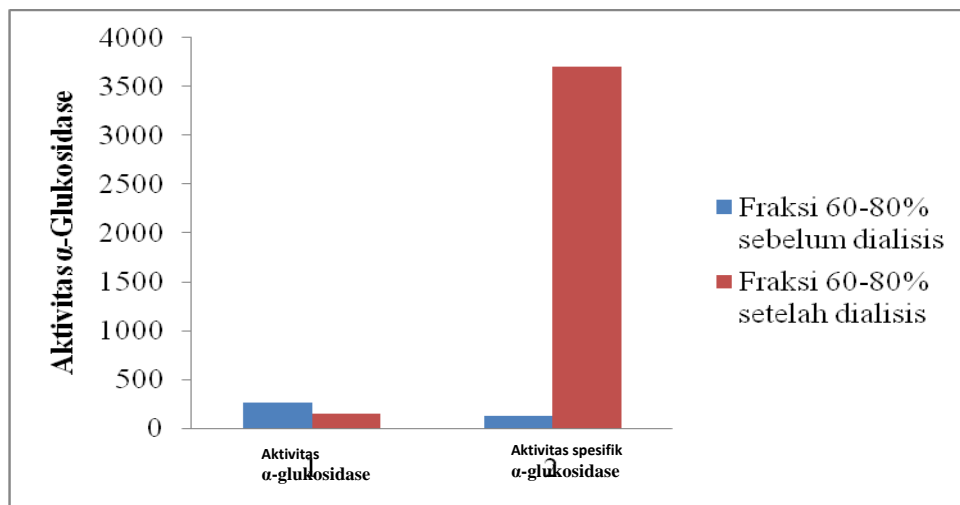
Pada penelitian ini dilakukan fraksinasi bertingkat dengan garam amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20% (fraksi I), 20-40% (fraksi II), 40-60% (fraksi III), 60-80% (fraksi IV), dan 80-100% (fraksi V). Selanjutnya, terhadap setiap fraksi dan filtrat sisa pemurnian, dilakukan uji aktivitas enzim dan ditentukan kadar proteinnya untuk menentukan aktivitas dan aktivitas spesifik enzim.



Gambar 6. Grafik aktivitas spesifik  $\alpha$ -glukosidase hasil fraksinasi dengan amonium sulfat

Aktivitas spesifik tertinggi berdasarkan Gambar 6 terdapat pada fraksi IV (60-80%) sebesar 129,27 mU/mg dengan tingkat kemurnian 11,31 kali lipat. Pada fraksi I (0-20%) aktivitas spesifik  $\alpha$ -glukosidase hanya meningkat sedikit. Hal ini karena endapan fraksi dengan tingkat kejenuhan sampai dengan 25% biasanya adalah materi partikulat berupa ribosom, fragmen membran, agregat protein besar, dan bahkan protein yang terdenaturasi (Deutscher, 1990). Sedangkan pada filtrat sisa, terdapat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang sangat kecil. Hal ini mengindikasikan bahwa hampir sebagian besar enzim  $\alpha$ -glukosidase telah berhasil diendapkan dan dipisahkan dari larutan.

Enzim yang telah dimurnikan pada tahap fraksinasi dengan amonium sulfat merupakan enzim semimurni, sebab masih mengandung sisa-sisa garam sehingga perlu pemurnian lebih lanjut untuk menghilangkan sisa garam atau ion pengganggu lainnya yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Metode yang dapat digunakan adalah metode dialisis.



Gambar 7. Grafik aktivitas spesifik  $\alpha$ -glukosidase sebelum dan setelah dialisis (pH 7, suhu 37 °C, waktu 20 menit, konsentrasi substrat 10 mM)

Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase setelah dialisis mengalami penurunan. Hal ini dikarenakan selama proses dialisis terjadi pengenceran, yang diakibatkan oleh tingginya konsentrasi dalam sampel enzim sehingga terjadi pembungan akibat tekanan osmotik dimana air memasuki kantung dialisis. Namun, kadar protein dari sampel juga mengalami penurunan. Hal ini karena selama proses dialisis semua molekul berbobot rendah, termasuk protein-protein kecil keluar dari sampel melalui membran (Scopes, 1994). Pada akhirnya berdasarkan Gambar 7 aktivitas spesifik enzim setelah dialisis secara total mengalami kenaikan dari sebelum dialisis. Pada tabel berikut dapat dilihat tingkat kemurnian enzim pada berbagai tahapan pemurnian.

Tabel 2. Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase hasil pemurnian

	Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase (mU/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik $\alpha$ - Glukosidase (mU/mg)	Tingkat Kemurnian
Ekstrak Kasar	45,16	3,95	11,43	1
Fraksi 0-20%	39,71	1,71	23,22	2,03
Fraksi 20-40%	43,61	1,74	25,06	2,19
Fraksi 40-60%	117,19	1,78	65,84	5,76
<b>Fraksi 60-80%</b>	<b>262,42</b>	<b>2,03</b>	<b>129,27</b>	<b>11,31</b>
Fraksi 80-100%	107,07	1,47	72,84	6,37
Filtrat sisa	0,39	0,20	1,95	0,17
<b>Fraksi 60-80% setelah dialisis</b>	<b>148,34</b>	<b>0,04</b>	<b>3708,50</b>	<b>324,45</b>

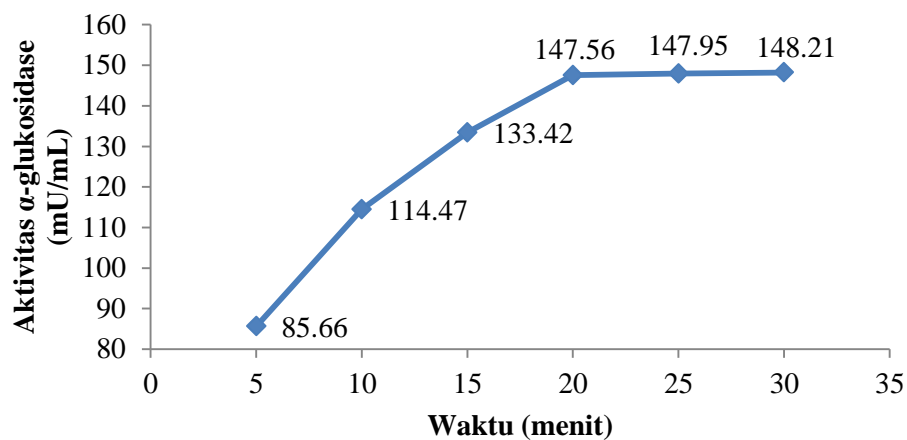
Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase enzim kasar merupakan enzim dengan tingkat kemurnian 1, artinya nilai tersebut merupakan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase mula-mula. Berdasarkan Tabel 2, dapat dilihat bahwa proses fraksinasi dapat meningkatkan kemurnian enzim, mulai dari fraksinasi dengan tingkat kejenuhan garam amonium sulfat 0-20% tingkat kemurnian enzim telah meningkat menjadi 2,03 kali lipat dari enzim kasar, hingga pada fraksinasi dengan tingkat kejenuhan garam amonium sulfat 60-80% tingkat kemurnian enzim mencapai optimum sebesar 11,31 kali lipat dari enzim kasar. Hal tersebut dapat terjadi karena proses fraksinasi dapat memisahkan protein berdasarkan persamaan bobot molekulnya, sehingga.

Enzim  $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis menunjukkan peningkatan tingkat kemurnian dari 11,31 kali menjadi 324,45 kali lipat dari enzim kasar. Hal tersebut membuktikan bahwa proses dialisis enzim yang dilakukan dapat meningkatkan kemurnian enzim  $\alpha$ -glukosidase, karena proses dialisis dapat memisahkan larutan enzim dengan garam-garam yang merupakan pengotornya.

#### 4.4 Karakterisasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase Bebas

##### 4.4.1 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum $\alpha$ -Glukosidase

Waktu optimum enzim adalah waktu pada saat enzim memiliki aktivitas optimum. Untuk menentukan waktu optimum enzim, maka enzim hasil dialisis diinkubasi dengan waktu yang bervariasi. Pada Gambar 8 dapat dilihat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada berbagai variasi waktu.



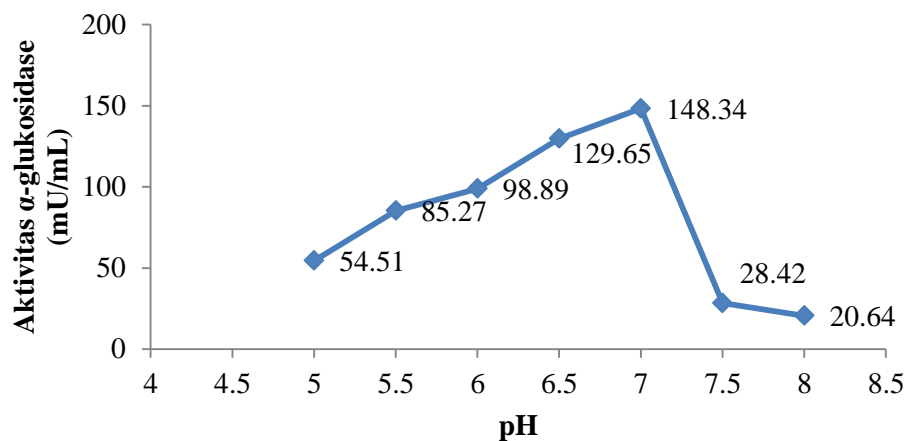
Gambar 8. Grafik pengaruh waktu terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis (pH 7, suhu 37 °C dan konsentrasi substrat 10 mM)

Waktu inkubasi 5 menit pertama sampai 20 menit pertama, aktivitas enzim mengalami peningkatan, karena semakin lama waktu inkubasi, maka semakin lama pula waktu kontak substrat dengan enzim, kemudian dari waktu inkubasi 20 menit sampai 30 menit aktivitas enzim relatif konstan, karena pada waktu lebih dari 20 menit, enzim dan substrat telah jenuh. Sehingga dapat disimpulkan bahwa waktu inkubasi optimum  $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis adalah 20 menit. Waktu inkubasi optimum yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan kesamaan dengan *sigma quality control test procedure*, yaitu enzim  $\alpha$ -glukosidase memiliki aktivitas optimum pada waktu inkubasi 20 menit (Sigma Quality Control Test Procedure, 1996).



#### 4.4.2 Penentuan pH Optimum $\alpha$ -Glukosidase

pH optimum enzim adalah suatu nilai pH pada saat enzim memiliki aktivitas optimum. Untuk menentukan pH optimum enzim, maka enzim hasil dialisis ditambahkan ke dalam larutan buffer dengan pH yang bervariasi. Pada Gambar 9 dapat dilihat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada berbagai nilai pH buffer.

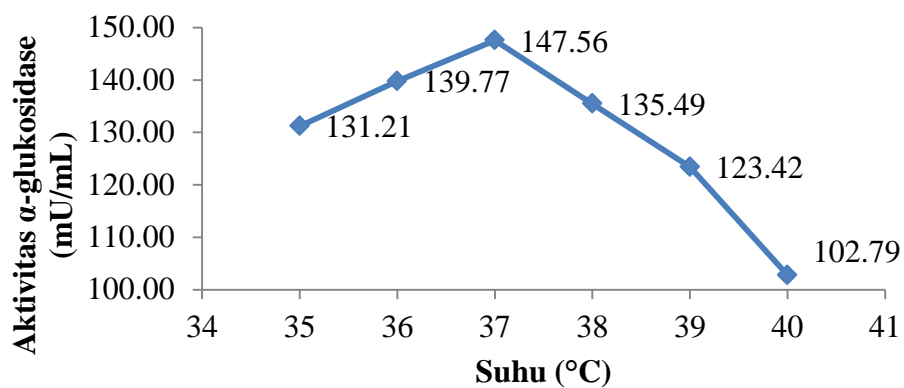


Gambar 9. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis (suhu 37 °C, waktu 20 menit dan konsentrasi substrat 10 mM)

Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase meningkat dengan meningkatnya pH, hingga mencapai aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi pada pH 7 sebesar 148,34 mU/mL. pH optimum yang diperoleh sesuai dengan pH fisiologis enzim. Beras lapuk yang berperan sebagai sumber enzim ini diperkirakan memiliki suasana pH netral hingga sedikit asam. Namun, pada pH di atas 7 terlihat aktivitas enzim mengalami penurunan. Hal ini dikarenakan pada pH yang terlalu asam atau basa tidak cocok dengan situasi fisiologis enzim (Risma, 2012). Sehingga dapat disimpulkan bahwa  $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis memiliki aktivitas optimum pada pH 7.

#### 4.4.3 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Perubahan suhu dapat menyebabkan terjadinya pelipatan molekul protein enzim sehingga sisi aktif enzim berada dalam posisi yang tepat untuk mengkatalisis substratnya (Arfah, 2016). Suhu optimum enzim adalah suatu nilai suhu pada saat enzim memiliki aktivitas optimum. Enzim hasil dialisis diinkubasi pada suhu yang bervariasi untuk menentukan suhu optimum enzim. Pada Gambar 10 dapat dilihat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada berbagai nilai suhu.



Gambar 10. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis (pH 7, waktu 20 menit dan konsentrasi substrat 10 mM)

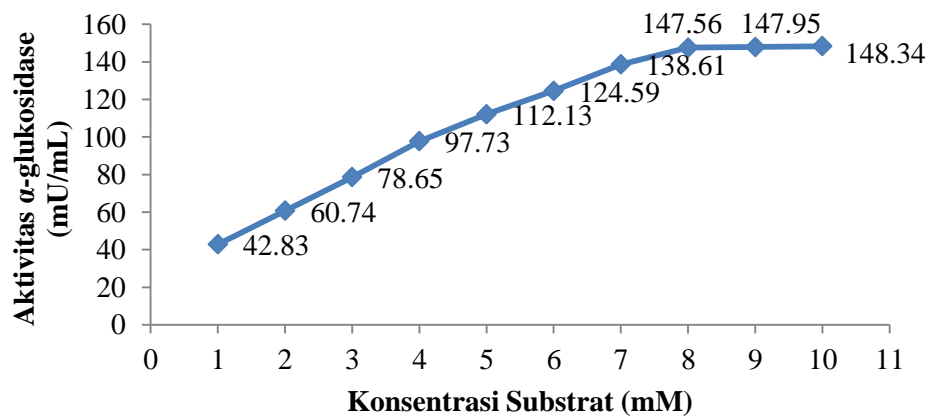
Aktivitas enzim berdasarkan Gambar 10 terus mengalami peningkatan hingga mencapai aktivitas tertinggi pada suhu 37 °C sebesar 147,56 mU/mL. Kenaikan aktivitas enzim di bawah suhu optimum disebabkan karena kenaikan energi kinetika molekul-molekul yang bereaksi (Arfah, 2016). Ketika suhu terus menerus ditingkatkan, aktivitas enzim mengalami penurunan, karena adanya perubahan suhu juga akan mempengaruhi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim. Perubahan konformasi sangat mempengaruhi sisi aktif dari enzim, kondisi panas

tertentu menyebabkan ikatan hidrogen tersebut akan putus. Putusnya satu ikatan hidrogen akan menyebabkan mudahnya pemutusan ikatan hidrogen selanjutnya dalam rantai polipeptida tersebut, sehingga protein enzim mengalami denaturasi (Withaker, 1996).

Suhu optimum yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 37 °C. Hasil penelitian tersebut menunjukkan persamaan dengan *sigma quality control test procedure*, yaitu enzim  $\alpha$ -glukosidase memiliki aktivitas optimum pada suhu 37 °C (Sigma Quality Control Test Procedure, 1996).

#### 4.4.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

PNPG divariasikan dengan konsentrasi antara 1-10 mM, kemudian dilakukan uji aktivitas seperti prosedur sebelumnya. Data yang diperoleh dari prosedur ini kemudian digunakan untuk menentukan parameter kinetika enzim yaitu nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$ .

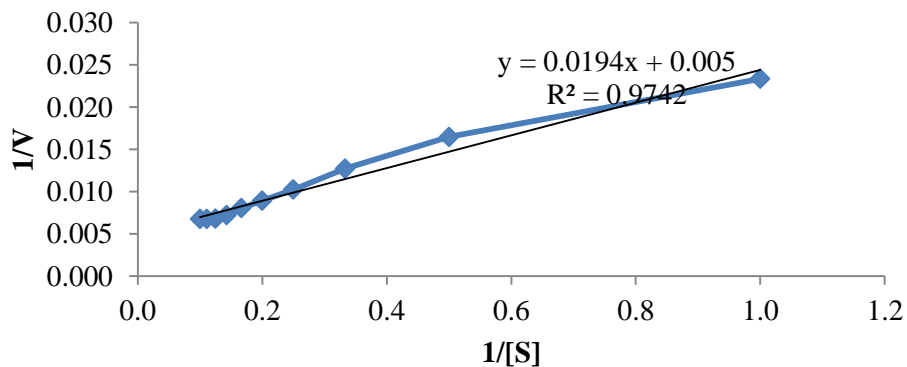


Gambar 11. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis (pH 7, suhu 37 °C dan waktu 20 menit)

Karakteristik utama yang ditentukan dalam mempelajari sifat kinetika enzim adalah kecepatan katalitik maksimum ( $V_{max}$ ) dan konsentrasi substrat

pada saat kecepatan katalitik mencapai setengah maksimum ( $K_m$ ). Penentuan  $V_{max}$  dan  $K_m$  didasarkan atas hubungan antara konsentrasi substrat ( $[S]$ ) dan aktivitas enzim. Aktivitas enzim sebanding dengan *velocity* ( $V$ ) yang menjelaskan kecepatan enzim  $\alpha$ -glukosidase untuk menghidrolisis substrat PNPG untuk melepaskan 1  $\mu\text{mol}$  D-glukosa per menit pada 37 °C (Risma, 2012).

Hubungan antara  $[S]$  dan  $V$  dapat dilihat pada Gambar 11. Nilai  $V$  meningkat sejalan dengan besarnya  $[S]$ , tetapi pada konsentrasi 8 mM dan seterusnya, nilai  $V$  menjadi konstan. Dengan demikian pada konsentrasi substrat PNPG 8 mM merupakan konsentrasi optimum terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase. Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase terus meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, tetapi menjadi konstan ketika substrat terus menerus ditingkatkan. Hal ini terjadi karena suatu reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat  $[S]$ , akan tetapi setelah  $[S]$  meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Kondisi dimana kecepatan enzimatik tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya  $[S]$  disebut kecepatan maksimum ( $V_{max}$ ) (Putra, 2009). Untuk menentukan nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$ , digunakan persamaan kurva *Lineweaver-Burk*.



Gambar 12. Grafik hubungan antara  $1/[S]$  terhadap  $1/V$   $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis

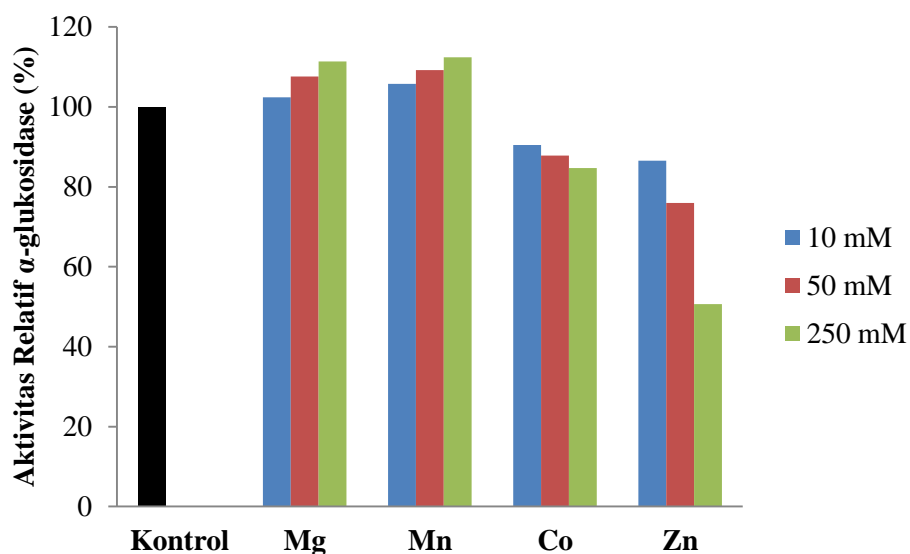
Persamaan garis regresi grafik hubungan antara  $1/[S]$  dan  $1/V$  dapat dilihat pada Gambar 12. Dari persamaan regresi  $y = 0,0194x + 0,005$ , maka diperoleh  $0,005 = 1/V_{max}$  sehingga  $V_{max} = 200$  mM/menit dan  $0,0194 = K_m/V_{max}$  sehingga  $K_m = 3,88$  mM. Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  digunakan untuk mengetahui afinitas enzim terhadap substrat yaitu dengan mengetahui nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  suatu katalisator dalam reaksi hidrolisis substrat menjadi produk. Apabila nilai  $K_m$  tinggi, menunjukkan afinitas terhadap substrat yang rendah. Semakin kecil nilai  $K_m$  semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang dibutuhkan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimumnya ( $V_{maks}$ ).

#### **4.4.5 Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase**

Enzim pada umumnya membutuhkan senyawa lain yang bukan protein dalam bioktivitiesnya seperti kofaktor dan koenzim. Kofaktor merupakan bagian anorganik dari enzim. Ion logam yang merupakan kofaktor dapat berfungsi sebagai aktivator (meningkatkan aktivitas enzim) atau inhibitor (menurunkan aktivitas enzim) dalam proses katalitik enzim. Ion logam yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , dan  $Zn^{2+}$  karena diduga dapat mempengaruhi aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (Li dan Chan, 1983).

Enzim  $\alpha$ -glukosidase tanpa adanya penambahan ion logam merupakan kontrol dengan aktivitas relatif 100%. Berdasarkan Gambar 13 dapat dilihat bahwa  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$  meningkatkan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan bertambahnya konsentrasi. Kenaikan aktivitas tertinggi didapatkan pada konsentrasi 250 mM untuk  $Mn^{2+}$  aktivitas relatifnya naik menjadi 112,40% disusul dengan  $Mg^{2+}$  sebesar 111,35%. Sedangkan pada  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  terjadi

penurunan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan bertambahnya konsentrasi. Penurunan terkecil terjadi pada  $Zn^{2+}$  pada konsentrasi 250 mM dengan aktivitas relatif turun menjadi 50,66% diikuti dengan  $Co^{2+}$  dengan aktivitas relatif turun menjadi 84,70%. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$  berperan sebagai aktivator  $\alpha$ -glukosidase sedangkan  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  berperan sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase.



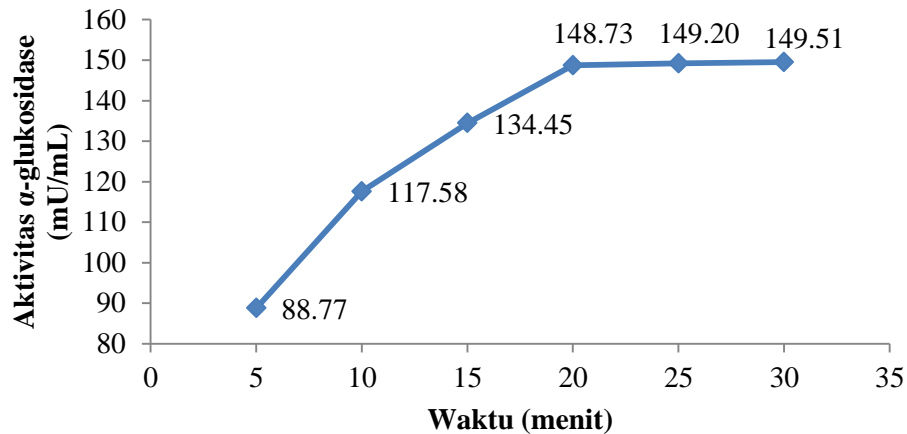
Gambar 13. Grafik variasi konsentrasi ion logam terhadap aktivitas relatif  $\alpha$ -glukosidase hasil dialisis (pH 7, suhu 37 °C, waktu 20 menit, dan konsentrasi substrat 8 mM)

#### 4.5 Karakterisasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase Amobil

##### 4.5.1 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum $\alpha$ -Glukosidase Amobil

Enzim  $\alpha$ -glukosidase hasil pemurnian awal yakni enzim hasil dialisis diamobilisasi dengan menggunakan matriks karagenan, kemudian dikarakterisasi cara yang sama dengan enzim  $\alpha$ -glukosidase bebas, meliputi penentuan waktu inkubasi optimum, pH optimum, pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim, dan pengaruh ion-ion logam terhadap aktivitas enzim, serta penentuan pemakaian perulangan optimum enzim.

Waktu optimum enzim adalah waktu pada saat enzim memiliki aktivitas optimum. Untuk menentukan waktu optimum enzim, maka enzim amobil diinkubasi dengan waktu yang bervariasi. Pada Gambar 14 dapat dilihat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase pada berbagai variasi waktu.



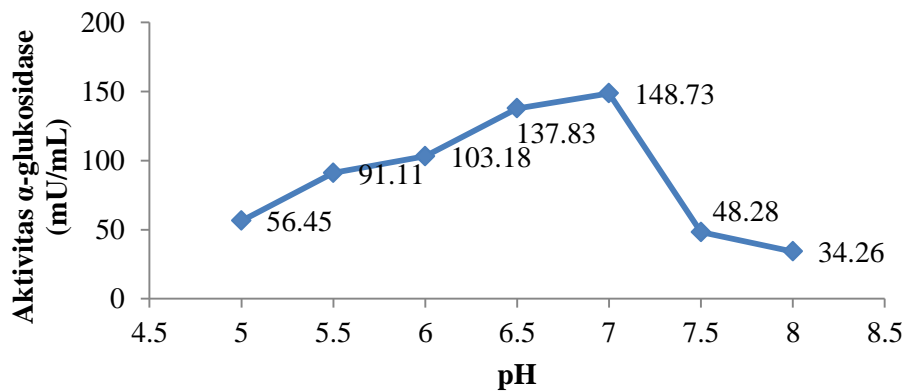
Gambar 14. Grafik pengaruh waktu terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase amobil (pH 7, suhu 37 °C dan konsentrasi substrat 8 mM)

Hasil penentuan waktu inkubasi optimum  $\alpha$ -glukosidase amobil sama dengan enzim bebas bahwa  $\alpha$ -glukosidase memiliki aktivitas optimum pada waktu inkubasi 20 menit (Sigma Quality Control Test Procedure, 1996).

#### 4.5.2 Penentuan pH Optimum $\alpha$ -Glukosidase Amobil

pH optimum enzim adalah suatu nilai pH pada saat enzim memiliki aktivitas optimum. Untuk menentukan pH optimum enzim, maka enzim amobil ditambahkan ke dalam larutan buffer dengan pH yang bervariasi. Pada Gambar 15 dapat dilihat aktivitas  $\alpha$ -glukosidase amobil pada berbagai nilai pH buffer.

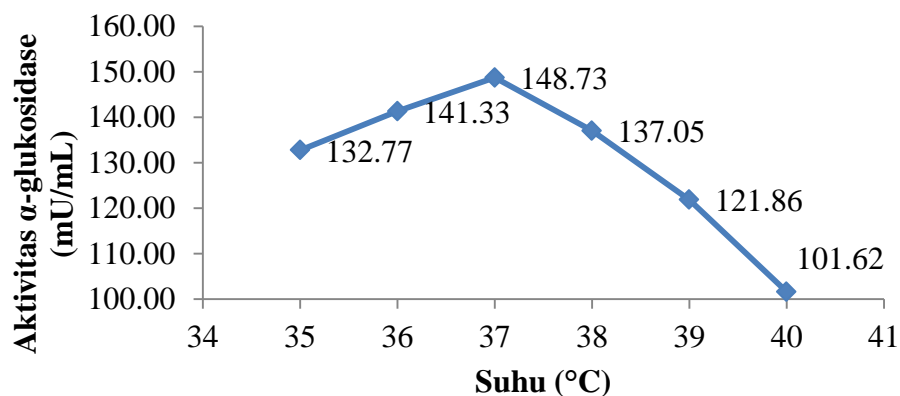
Hasil penentuan pH optimum  $\alpha$ -glukosidase amobil sama dengan hasil karakterisasi enzim bebas bahwa  $\alpha$ -glukosidase amobil memiliki aktivitas optimum pada pH 7.



Gambar 15. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase amobil (suhu 37 °C, waktu 20 menit dan konsentrasi substrat 8 mM)

#### 4.5.3 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase Amobil

Suhu optimum enzim adalah suatu nilai suhu pada saat enzim memiliki aktivitas optimum. Untuk menentukan suhu optimum enzim, maka enzim amobil diinkubasi dengan suhu yang bervariasi. Pada Gambar 16 dapat dilihat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase amobil pada berbagai nilai suhu.



Gambar 16. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase (pH 7, waktu 20 menit, konsentrasi substrat 8 mM)

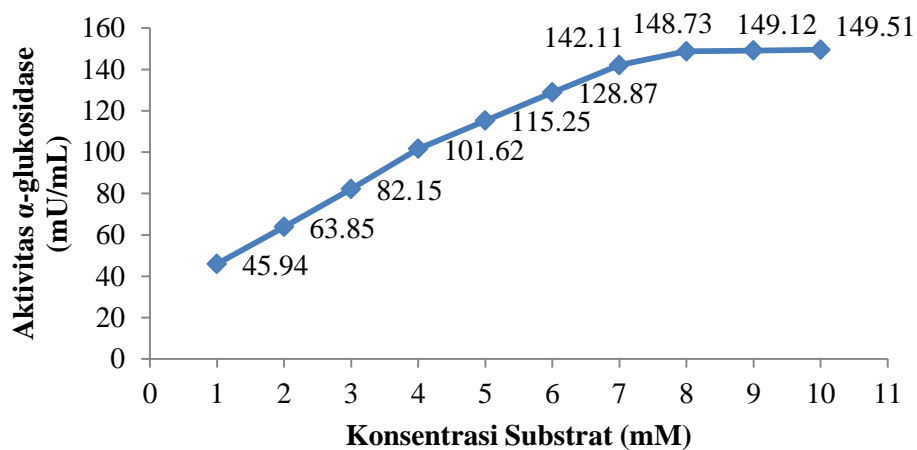
Hasil penentuan suhu optimum  $\alpha$ -glukosidase amobil sama dengan hasil karakterisasi enzim bebas bahwa  $\alpha$ -glukosidase amobil memiliki aktivitas optimum pada suhu 37 °C. Hasil penelitian tersebut menunjukkan persamaan



dengan *sigma quality control test procedure*, yaitu enzim  $\alpha$ -glukosidase memiliki aktivitas optimum pada suhu 37 °C (Sigma Quality Control Test Procedure, 1996).

#### 4.5.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase Amobil

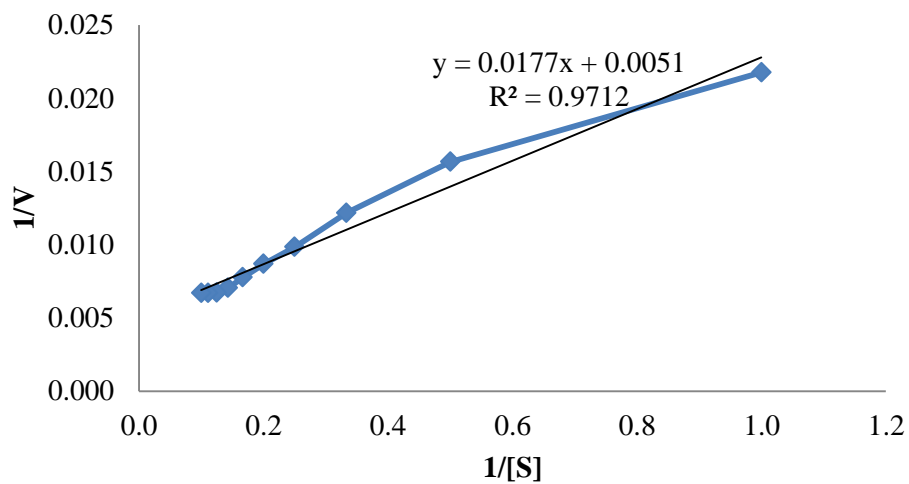
PNPG divariasikan dengan konsentrasi antara 1-10 mM, kemudian dilakukan uji aktivitas seperti prosedur sebelumnya. Data yang diperoleh dari prosedur ini kemudian digunakan untuk menentukan parameter kinetika enzim yaitu  $K_m$  dan  $V_{max}$ .



Gambar 17. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase amobil (pH 7, suhu 37 °C dan waktu 20 menit)

Karakteristik utama yang ditentukan dalam mempelajari sifat kinetika enzim adalah kecepatan katalitik maksimum ( $V_{max}$ ) dan konsentrasi substrat pada saat kecepatan katalitik mencapai setengah maksimum ( $K_m$ ). Penentuan  $V_{max}$  dan  $K_m$  didasarkan atas hubungan antara konsentrasi substrat ( $[S]$ ) dan aktivitas enzim. Aktivitas enzim sebanding dengan *velocity* ( $V$ ) yang menjelaskan kecepatan  $\alpha$ -glukosidase untuk menghidrolisis substrat PNPG untuk melepaskan 1  $\mu$ mol D-glukosa per menit pada 37 °C.

Hubungan antara [S] dan V dapat dilihat pada Gambar 17. Nilai V meningkat sejalan dengan besarnya [S], tetapi pada konsentrasi 8 mM dan seterusnya, nilai V menjadi konstan. Dengan demikian pada konsentrasi substrat PNPG 8 mM merupakan konsentrasi optimum terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari beras ketan putih. Aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada percobaan terus meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, tetapi menjadi konstan ketika substrat terus menerus ditingkatkan. Hal ini terjadi karena suatu reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat [S], akan tetapi setelah [S] meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Kondisi dimana kecepatan enzimatik tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya [S] disebut kecepatan maksimum ( $V_{max}$ ) (Putra, 2009). Untuk menentukan nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$ , digunakan persamaan kurva *Lineweaver-Burk*.



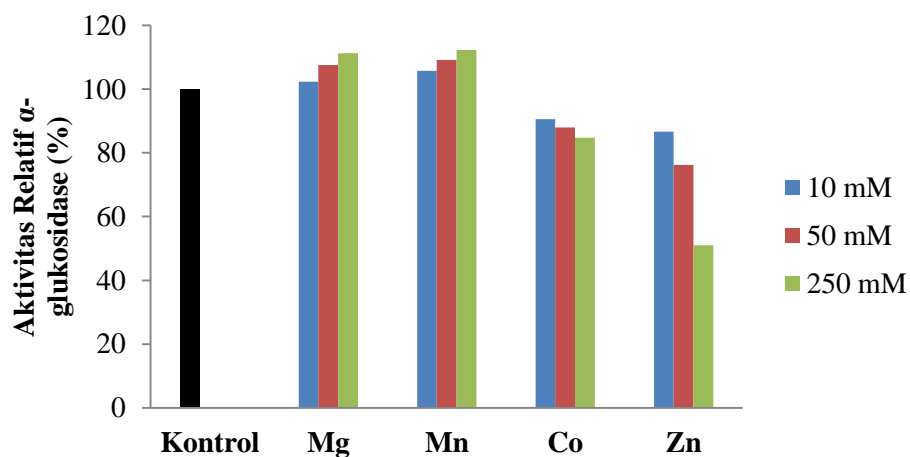
Gambar 18. Grafik hubungan antara  $1/[S]$  terhadap  $1/V$   $\alpha$ -glukosidase amobil

Persamaan garis regresi grafik hubungan antara  $1/[S]$  dan  $1/V$  dapat dilihat pada Gambar 18. Dari persamaan regresi  $y = 0,017x + 0,005$ , maka diperoleh  $0,005 = 1/V_{max}$  sehingga  $V_{max} = 196,08$  mM/menit dan  $0,017 =$

$K_m/V_{max}$  sehingga  $K_m = 3,47 \text{ mM}$ . Nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  digunakan untuk mengetahui afinitas enzim terhadap substrat yaitu dengan mengetahui nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  suatu katalisator dalam reaksi hidrolis substrat menjadi produk. Apabila nilai  $K_m$  tinggi, menunjukkan afinitas terhadap substrat yang rendah. Semakin kecil nilai  $K_m$  semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang dibutuhkan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimumnya ( $V_{maks}$ ).

#### 4.5.5 Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase Amobil

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah inhibitor dan aktivator dari ion logam.  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , dan  $Zn^{2+}$  diduga dapat mempengaruhi aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase (Li dan Chan, 1983). Berikut ini merupakan hasil uji pengaruh ion logam terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase.



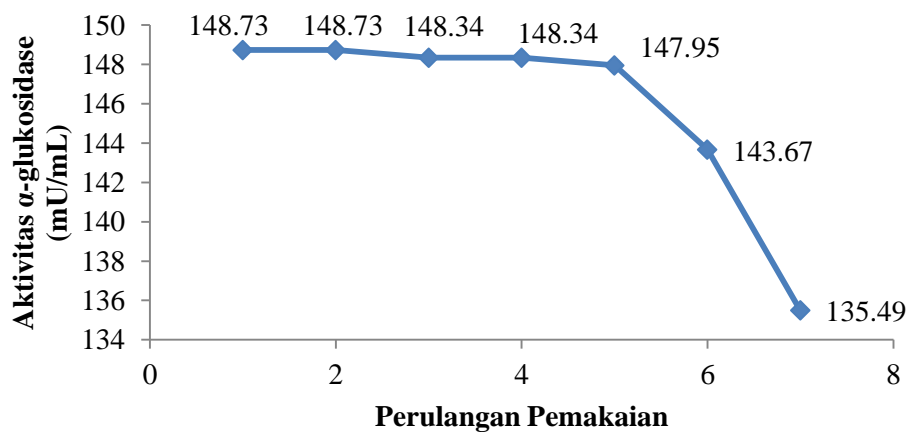
Gambar 19. Grafik variasi konsentrasi ion logam terhadap aktivitas relatif  $\alpha$ -glukosidase amobil (pH 7, suhu  $37^\circ\text{C}$ , waktu 20 menit, konsentrasi substrat 8 mM)

Enzim  $\alpha$ -glukosidase amobil tanpa adanya penambahan ion logam merupakan kontrol dengan aktivitas relatif 100%. Berdasarkan Gambar 19 dapat

dilihat bahwa  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$  meningkatkan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan bertambahnya konsentrasi. Kenaikan aktivitas tertinggi didapatkan pada konsentrasi 250 mM untuk  $Mn^{2+}$  aktivitas relatifnya naik menjadi 112,30% disusul dengan  $Mg^{2+}$  sebesar 111,26%. Sedangkan pada  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  terjadi penurunan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan bertambahnya konsentrasi. Penurunan terkecil terjadi pada  $Zn^{2+}$  konsentrasi 250 mM dengan aktivitas relatif turun menjadi 51,05% diikuti dengan  $Co^{2+}$  dengan aktivitas relatif turun menjadi 84,82%. Hasil penelitian tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan hasil penelitian untuk enzim bebas. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa  $Mg^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  berperan sebagai aktivator  $\alpha$ -glukosidase amobil sedangkan  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  berperan sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase amobil.

#### 4.6 Uji Perulangan Pemakaian Optimum Enzim $\alpha$ -Glukosidase Amobil

Uji perulangan pemakaian optimum  $\alpha$ -glukosidase amobil dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim pada setiap perulangan pemakaian. Hasil penelitian uji perulangan enzim dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Grafik hubungan antara perulangan pemakaian terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase amobil (pH 7, suhu 37 °C, waktu 20 menit, konsentrasi substrat 8 mM)

Pada pemakaian I-IV perubahan konformasi enzim masih kecil, namun setelah pemakaian VI-VII perubahan konformasi enzim diperkirakan cukup besar. Hal ini terlihat dari penurunan aktivitas tersebut berhubungan dengan kestabilan dari daya katalis pada molekul enzim. Penurunan aktivitas ini juga dapat disebabkan karena karagenan yang digunakan sebagai penjebak enzim telah mengalami porous sehingga diperkirakan enzim keluar dari gel pada saat pemakaian atau pada saat pencucian. Penggunaan karagenan sebagai bahan pendukung amobilisasi enzim menunjukkan bahwa stabilitas gel dapat dipertahankan dalam waktu yang cukup lama.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh aktivitas spesifik ekstrak kasar  $\alpha$ -glukosidase yang diisolasi dari beras ketan putih menggunakan pH buffer optimumnya yaitu 7 sebesar 45,16 mU/mL dapat ditingkatkan melalui fraksinasi dengan amonium sulfat sebesar 11,31 kali enzim kasar. Aktivitas spesifik tertinggi terdapat pada fraksi IV (60-80%) yaitu sebesar 129,14 mU/mg. Aktivitas spesifik dapat ditingkatkan lagi melalui dialisis menjadi 3874,55 mU/mg. Enzim  $\alpha$ -glukosidase yang diisolasi dari beras ketan putih baik yang tidak diamobilisasi maupun yang telah diamobilisasi memiliki karakteristik yang relatif sama seperti waktu inkubasi optimum 20 menit, pH optimum 7, suhu optimum 37 °C, konsentrasi substrat optimum 8 mM, aktivator  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$ , serta inhibitor  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$ . Enzim  $\alpha$ -glukosidase amobil menggunakan matriks karagenan mempunyai kemampuan untuk digunakan secara berulang dan jumlah pemakaian optimumnya adalah sebanyak 5 kali.

#### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dan dalam rangka pengembangan hasil penelitian, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan, antara lain:

1. Perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut dengan metode lain seperti kromatografi kolom penukar ion dan kromatografi kolom gel filtrasi untuk

mendapatkan enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras ketan putih dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi.

2. Perlu dilakukan uji inhibitor-inhibitor alami terhadap  $\alpha$ -glukosidase, guna memperoleh bahan alami untuk obat diabetes mellitus tipe 2.
3. Perlu dicari sumber  $\alpha$ -glukosidase tipe II lainnya yang berasal dari limbah-limbah lainnya guna pemanfaatan limbah dan untuk mendapatkan aktivitas enzim yang lebih tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anggadiredja, T., Zatnika, A., Purwoto, H., dan Istini, S., 2010, *Rumput Laut*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Anonim, 2016, *Tips Mengolah Beras Ketan*, (Online), <http://www.royco.id/artikel/detail/1108401/tips-mengolah-beras-ketan>, diakses 12 Nopember 2016.
- Arfah, R.A., 2016, *Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase dari Bakteri Termofil Sumber Air Panas Lejja Sulawesi Selatan dan Aplikasi dalam Hidrolisis Pati Sagu menjadi Maltodekstrin*, Disertai tidak diterbitkan, Ilmu Kimia, Sekolah Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Bailey, J.E., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals 2<sup>nd</sup> Edition*, McGraw-Hill Inc, USA.
- Bollag, D.M., and Edelstein, S.J., 1991, *Protein Methods*, Weley-Less, New York.
- Bösenberg, L.H., dan Zyl D.G.V., 2008, The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: A review of recent literature. *Journal of Endocrinology Metabolism and Diabetes of South Africa (JEMDSA)*, **13**(3): 80-88.
- BPS dan Rice Report, 2003, *Produksi Beras Indonesia*, Badan Pusat Statistika, Jakarta.
- Budiman, A., 2011, *Isolasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Gabah (*Oryza sativa*)*, Skripsi tak diterbitkan, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok.
- Compo V.L., Kawano D.F., da Silva Jr, D.B., dan Carvaospho, I., 2009, Carrageenans: Biological Properties, Chemical Modifications and Structural Analysis, *J. Carbohydrate Polymers*, **77**(2): 167-180.
- Dennison, C., 2002, *A Guide to Protein Isolation*, Kluwer Academic Publisher, New York.
- Deutscher, M. P., 1990, *Methods in Enzymology vol 182: Guide to Protein Purification*, Academic Press, California.
- Direktorat Gizi, 1981, *Daftar Komposisi Bahan Makanan*, Bhratara Karya Aksara, Jakarta.

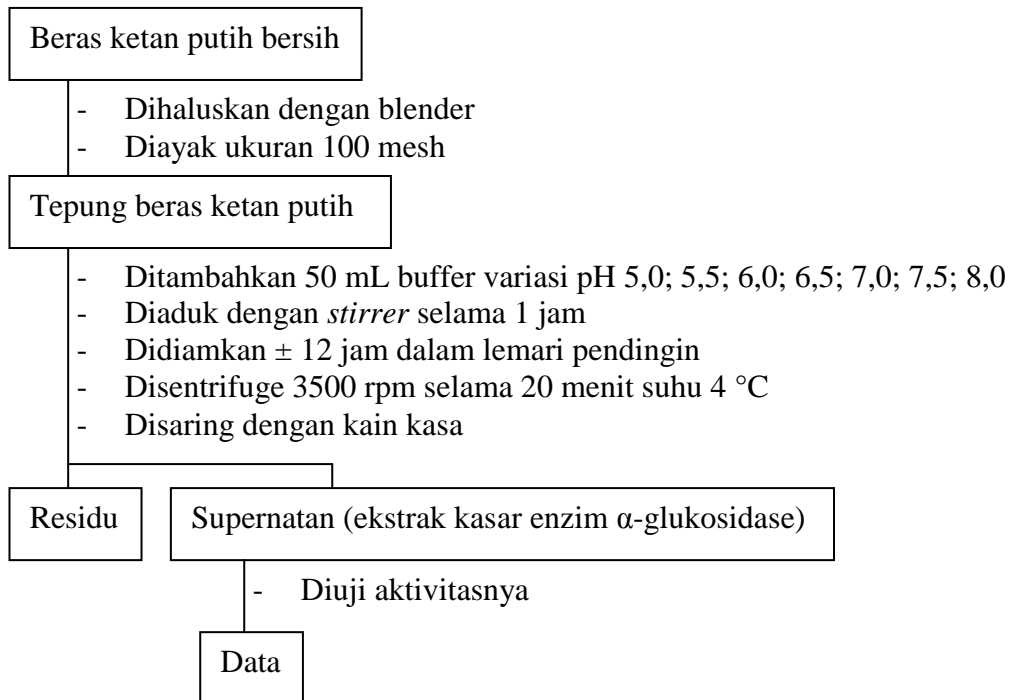


- Febrinda A.E., Astawan, M., Wresdiyanti, T., dan Yuliana, N.D., 2013, Kapasitas Antioksidan dan Inhibitor Alfa Glukosidase Ekstrak Umbi Bawang Dayak, *J. Teknol. dan Industri Pangan*, **24**(2): 161-167.
- Haryadi, H., 2013, Analisa Kadar Alkohol Hasil Fermentasi Ketan dengan Metode Kromatografi Gas dan Uji Aktivitas *Saccharomyces Cereviceae* Secara Mikroskopis, Skripsi tak diterbitkan, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Imeson A.P., 2010, *Food Stabilisers, Tickeners and Gelling Agents*, Blackwell Publishing, Inggris.
- James, E., Bailey, D.F. dan Ollis, 1997, *Biochemical Engineering Fundamental 2nd ed.*, Mc Graw Hill, New York.
- Kadan, R.S., Champagne, E.T., Ziegler, G.M., dan Richard. A.O., 1997, Amylose and protein contents of rice cultivars as related to texture of rice-based fries. *Journal o Food Science* **62**(4): 701-703.
- Kampf, N., 2002, The Use of Polymers for Coating of Cells, *Polymers for Advanced Technologies*, **13**: 895-904.
- Kimura, A., Jin-Ha, L., In-Su, L., Hee-Seob, L., Kwan-Hwa, P., Seiya, C., dan Doman, K., 2004, Two Potent Competitive Inhibitors Discriminating  $\alpha$ -Glukosidase Family I from Family II. *Carbohydrate Research*, (339): 1035-1040.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., dan Koutinas, A.A., 2004, Immobilization Technologies and Support Material Suitable in Alcohol Beverages Production: a Review, *Food Microbiology*, **21**: 377-397.
- Lasabada, R., 2013, Pembangunan Wilayah Pesisir dan Lautan dalam Perspektif Negara Kepulauan Republik Indonesia, *Jurnal Ilmiah Platax*, **1**(2): 92-101.
- Lee, B., 1996, *Fundamental of Food Biotechnologies*, VCH Publisher Inc, New York.
- Li, B.K. dan Chan, K.Y., 1983, Production and Properties of  $\alpha$ -Glucosidase from *Lactobacillus acidophilus*, *J. Env Microbiology*, **46**(6): 1380-1387.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lukman, A., Deni A., Noveri, R., dan Nani S., 2013, Pembuatan Uji Sifat Fisikokimia Pati Beras Ketan Kampar yang Dipragelatinasi, *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, **1**(2): 67-71.

- Marhawati, M. dan Lappo, A., 2001, Usaha Tani Lahan Kering pada Desa Terpencil di Kecamatan Kulawi, Kabupaten Donggala, *Jurnal Agroland (Indonesia)*, **8**(2): 150-157.
- Nakai, 2007, Multiple Forms of  $\alpha$ -Glukosidasein Rice Seeds (*Oryza sativa* L. var Nipponbare), *Biochimie*, (89): 49-62.
- Norman, B.B., 1981, New Development In Starch Syrup Technologies, Di dalam G.G. Birch dan K.J Parker. *Enzyme and food processing*, applied science publisher Ltd., London.
- Palmer, T., 1991, *Understanding Enzymes 3rd ed*, Ellis Horwood Limited, West Sussex.
- Park, J.K. dan Chang, H.N., 2000, Microencapsulation of microbial cells: Review, *Biotechnologies Advances*, **18**: 303-319.
- Parker, R., and Ring, S.G., 2001, Aspects of The Physical Chemistry of Starch, *Journal of Cereal Science*, **34**(1): 1-17.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., dan Russell, I., 1998, Fundamentals of Immobilised Yeast Cells for Ontinuous Beer Fermentation: a review, *Journal on the Institute of Brewing*, **104**: 19-31.
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.
- Pujiyanto, S. dan Rejeki, S.F., 2010, Aktivitas Inhibitor Alpha-Glukosidase Bakteri Endofit PR-3 yang Diisolasi dari Tanaman Pare (*Momordica charantina*), *Bioma*, **12**(1): 1-5.
- Putra, G.P.G., 2009, Penentuan Kinetika Enzim Poligalakturonase (PG) Endogenous dari Pulp Biji Kakao, *Jurnal Biologi*, (1): 21-24.
- Risma, D., 2012, Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Lapuk (*Oryza Sativa*), Skripsi tak diterbitkan, Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok.
- Scopes, R.K., 1994, *Protein Purification: Principles and Practice 3rd ed*, Springer-Verlag, New York.
- Sebayang, F., 2006, Pengujian Stabilitas Enzim Bromelin yang Diisolasi dari Bonggol Nanas serta Imobilisasi Menggunakan Kappa Karagenan, *Jurnal Sains Kimia*, **10**(1): 20-26.
- Sigma Quality Control Test Procedure, *Enzymatic Assay of  $\alpha$ -Glukosidase*, (Online), ([https://www.sigmaaldrich.com/content/.../sigma.../Sigma/.../alpha\\_glucosidase\\_sed.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/.../sigma.../Sigma/.../alpha_glucosidase_sed.pdf), diakses 18 November 2016).

- Steenis, V.C.G.G.J., 2003, *Flora*, Pradaya Paramita, Jakarta.
- Stryer, L., 1995, *Biochemistry* 4<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Company, New York.
- Talebnia, F., Taherzadeh dan Mohammad, J., 2006, In situ Detoxification and Continuous Cultivation of Dilute-acid Hydrolyzate to Ethanol by Encapsulated *S. cerevisiae*, *Journal of Biotechnology*, 377-384.
- Tanjung, E., Anna, R. dan Diah, M., 2013, Amobilisasi Pektinase Hasil Isolasi dari *Aspergillus niger* Menggunakan Matriks Karagenan, *KIMIA. STUDENT JOURNAL.*, 2(1): 449-455.
- Wuryanti, 2006, Amobilisasi Enzim Bromelin dari Bonggol Nanas dengan Bahan Pendukung (Support) Karagenan dari Rumput Laut (*Euchema cottoni*), *JSKA*, 9(3): 1-5.
- Yeshajahu, P., dan Clifton, E.M., 1987, *Food Analysis: Theory and Practice 2nd ed*, Van Nostran Reinhold Company, New York.

**Lampiran 1. Preparasi sampel, isolasi dan penentuan pH buffer optimum ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -glukosidase (Risma, 2012)**



**Catatan:** setelah memperoleh pH buffer optimum yang baik digunakan, isolasi diulangi dengan skala yang lebih besar, 400 g tepung beras dalam 1000 mL buffer

**Lampiran 2. Tabel aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada berbagai nilai pH**

pH	Absorban	Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase (mU/mL)
5	0,037	14,41
5,5	0,045	17,52
6	0,054	21,02
6,5	0,066	25,70
7	0,116	<b>45,16</b>
7,5	0,066	25,70
8	0,042	16,35

**Contoh perhitungan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase**

$$AE = \frac{(A \text{ Sampel}) \cdot V_k \cdot V_c}{k \cdot t \cdot V_{ck} \cdot V_e}$$

Keterangan:

- AE = aktivitas enzim
- $V_c$  = volume campuran reaksi
- $V_k$  = volume total penentuan kolorimetrik
- $V_{ck}$  = volume campuran reaksi dalam penentuan kolorimetrik
- $V_e$  = volume larutan enzim
- k = koefisien ekstingsi milimolar
- t = waktu pengujian

**Diketahui:**

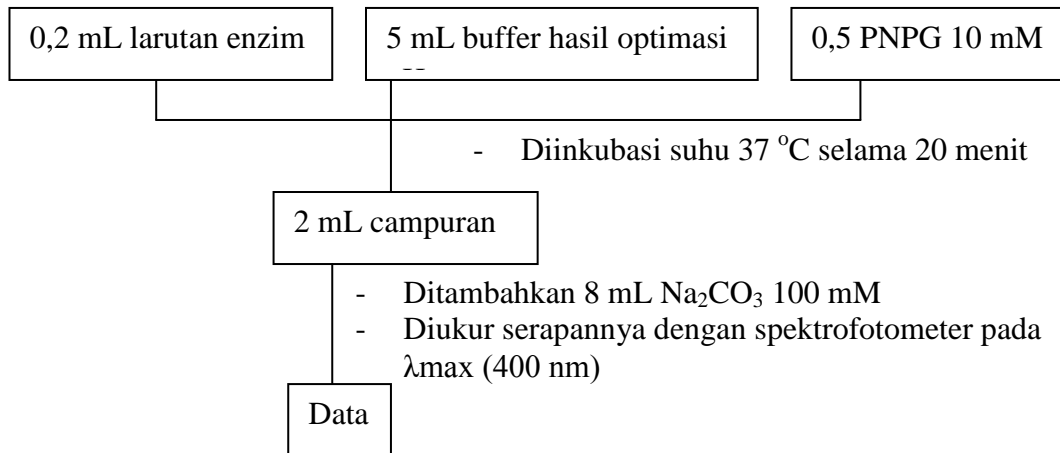
- $V_c$  = 5,7 mL
- $V_k$  = 10 mL
- $V_{ck}$  = 2 mL
- $V_e$  = 0,2 mL
- k = 18,3
- t = 20 menit

**Penyelesaian:**

$$\begin{aligned}
 AE &= \frac{0,037 \times 10 \times 5,7}{18,3 \times 20 \times 2 \times 0,2} \\
 &= \frac{2,109}{146,4} \\
 &= 0,01441 \text{ U/mL} \times 1000 \\
 &= 14,41 \text{ mU/mL}
 \end{aligned}$$

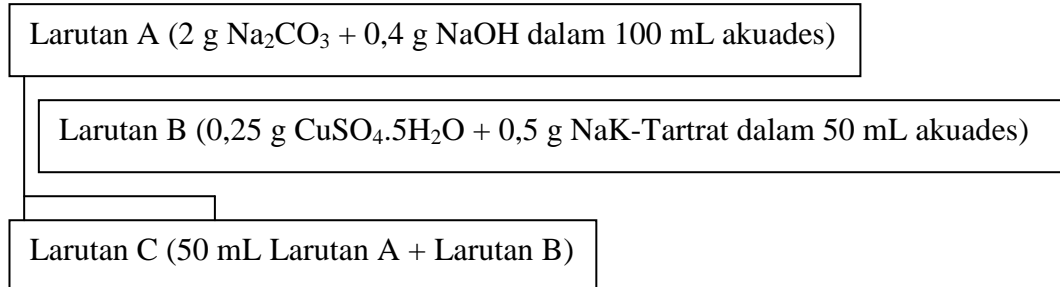
### Lampiran 3. Uji aktivitas dan kadar protein $\alpha$ -Glukosidase

#### 1. Uji aktivitas $\alpha$ -Glukosidase (Sigma Aldrich, 1996)

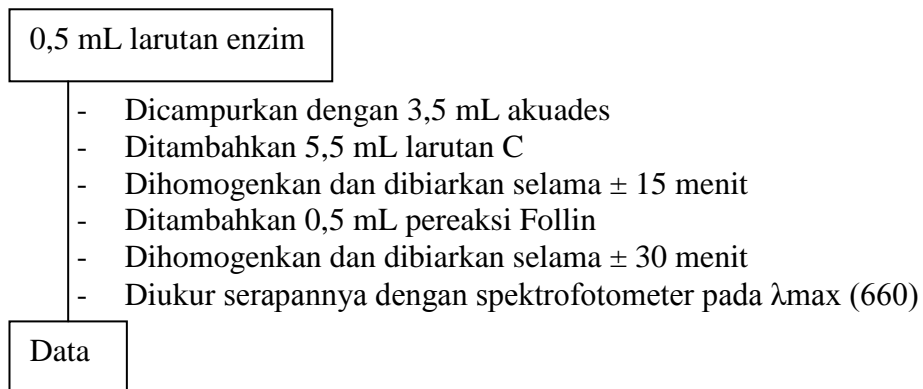


#### 2. Uji kadar protein (Lowry dkk., 1951)

##### a. Pembuatan pereaksi

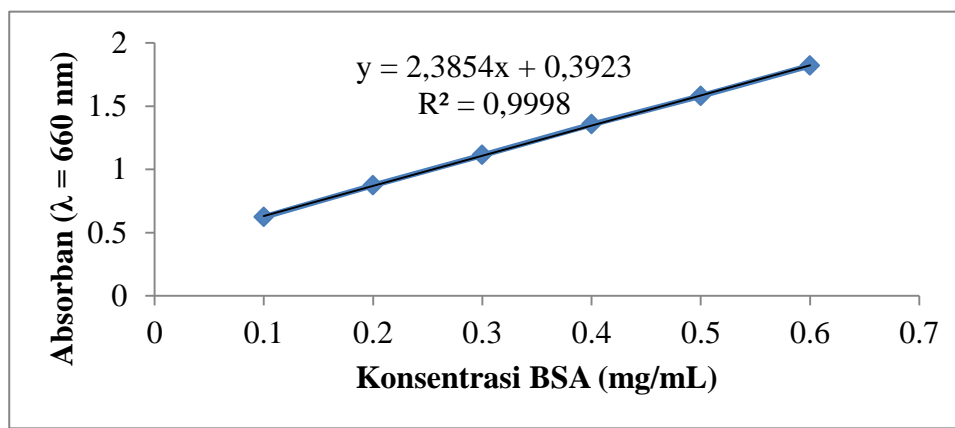


##### b. Penentuan kadar protein



**Lampiran 4. Kurva standar BSA untuk pengukuran kadar protein dengan metode Lowry**

BSA (mg/mL)	Absorban ( $\lambda = 660$ nm)
0,1	0,623
0,2	0,873
0,3	1,112
0,4	1,355
0,5	1,58
0,6	1,82



**Contoh perhitungan kadar protein**

$$y = 2,3854x + 0,3923$$

$$\text{Kadar protein} = x \cdot \text{FP}$$

Keterangan:

y = absorban  
 x = konsentrasi protein (mg/mL)  
 FP = faktor pengenceran

**Diketahui:**

y = 0,5  
 FP = 100 kali

**Penyelesaian:**

$$y = 2,3854x + 0,3923$$

$$x = \frac{y - 0,3923}{2,3854}$$

$$x = \frac{0,5 - 0,3923}{2,3854}$$

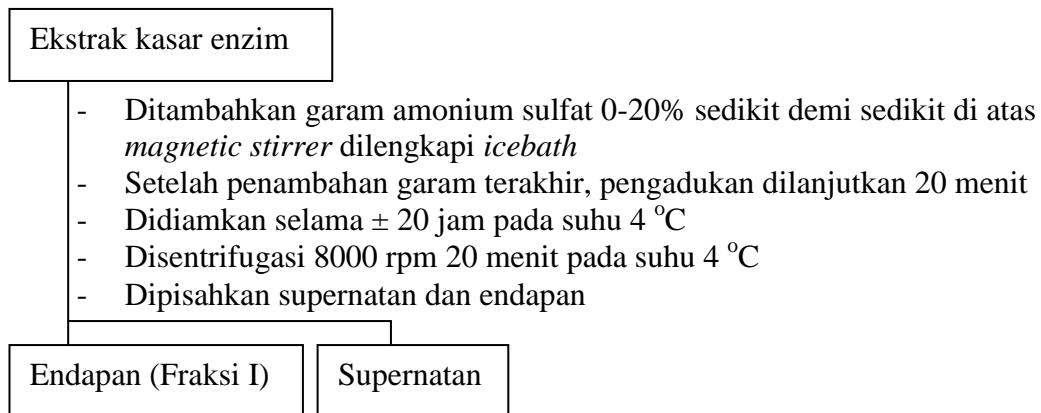
$$x = 0,045$$

$$\text{Kadar protein} = 0,045 \times 100$$

$$= 4,5 \text{ mg/mL}$$

## Lampiran 5. Pemurnian enzim $\alpha$ -glukosidase (Bollag dan Edelstein, 1991)

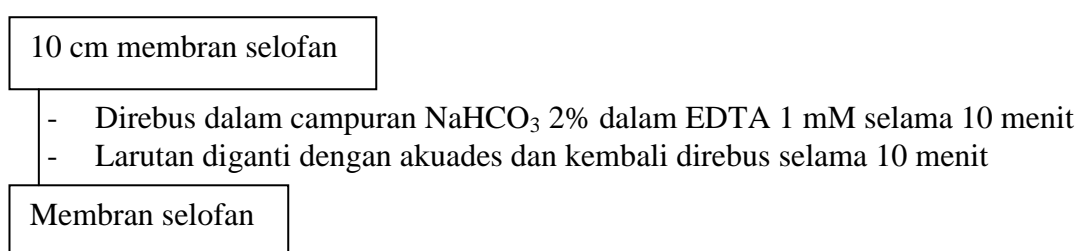
### 1. Fraksinasi dengan amonium sulfat



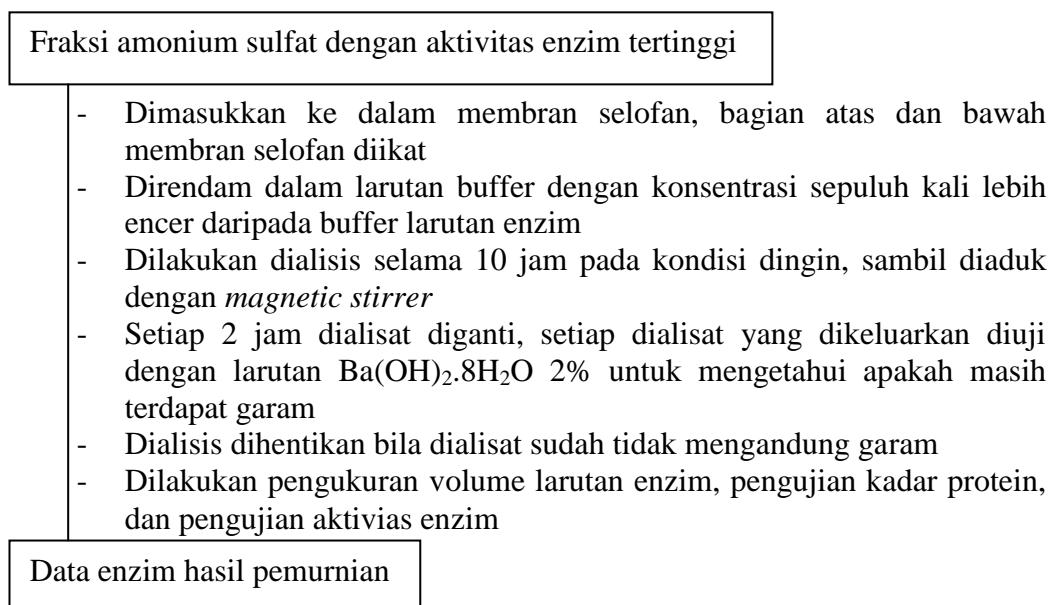
**Catatan:** diulangi prosedur di atas dengan mengukur volume supernatan yang dihasilkan kemudian diteruskan dengan penambahan garam amonium sulfat 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100%. Endapan yang dihasilkan pada masing-masing tingkat kejenuhan secara berturut-turut disebut sebagai fraksi II, fraksi III, fraksi IV, dan fraksi V.

### 2. Dialisis dengan membran selofan

#### a. Preparasi membran selofan



#### b. Dialisis enzim





Lampiran 6. Tabel aktivitas  $\alpha$ -glukosidase hasil pemurnian

Tingkat Kejenuhan	Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase (mU/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik $\alpha$ -Glukosidase (mU/mg)	Tingkat Kemurnian
Ekstrak Kasar	45,16	3,95	11,43	1
Fraksi 0-20%	39,71	1,71	23,22	2,03
Fraksi 20-40%	43,61	1,74	25,06	2,19
Fraksi 40-60%	117,19	1,78	65,84	5,76
<b>Fraksi 60-80%</b>	<b>262,42</b>	<b>2,03</b>	<b>129,27</b>	<b>11,31</b>
Fraksi 80-100%	107,07	1,47	72,84	6,37
Filtrat sisa	0,39	0,20	1,95	0,17
<b>Fraksi 60-80% setelah dialisis</b>	<b>148,34</b>	<b>0,04</b>	<b>3708,50</b>	<b>324,45</b>

**Contoh perhitungan aktivitas spesifik  $\alpha$ -glukosidase**

$$\text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase} = \frac{\text{aktivitas } \alpha\text{-glukosidase}}{\text{kadar protein}}$$

**Diketahui:**

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas } \alpha\text{-glukosidase} &= 45,16 \text{ mU/mL} \\ \text{Kadar protein} &= 3,95 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

**Penyelesaian:**

$$\begin{aligned} \text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase} &= \frac{45,16 \text{ mU/mL}}{3,95 \text{ mg/mL}} \\ &= 11,43 \text{ mU/mg} \end{aligned}$$

**Contoh perhitungan tingkat kemurnian**

$$\text{Tingkat kemurnian} = \frac{\text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase setelah pemurnian}}{\text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase enzim kasar}}$$

**Diketahui:**

$$\begin{aligned} \text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase enzim kasar} &= 11,43 \text{ mU/mg} \\ \text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase setelah pemurnian} &= 23,22 \text{ mU/mg} \end{aligned}$$

**Penyelesaian**

$$\begin{aligned} \text{Tingkat kemurnian} &= \frac{23,22 \text{ mU/mg}}{11,43 \text{ mU/mg}} \\ &= 2,03 \text{ kali} \end{aligned}$$

**Lampiran 7. Tabel kejenuhan amonium sulfat dan perhitungan massa amonium sulfat untuk fraksinasi**

		<b>S2</b>																
		<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>70</b>	<b>75</b>	<b>80</b>	<b>85</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>100</b>
<b>S1</b>	<b>Garam amonium sulfat yang ditambahkan (gram)</b>																	
<b>0</b>	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	
<b>5</b>	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	
<b>10</b>	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	
<b>15</b>	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	
<b>20</b>	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	
<b>25</b>		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	
<b>30</b>			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	
<b>35</b>				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	
<b>40</b>					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	
<b>45</b>						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	
<b>50</b>							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	
<b>55</b>								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	
<b>60</b>									0	31	62	95	129	164	210	239	279	
<b>65</b>										0	31	63	97	132	168	205	244	
<b>70</b>											0	32	65	99	134	171	209	
<b>75</b>												0	32	66	101	137	174	
<b>80</b>													0	33	67	103	139	
<b>85</b>														0	34	68	105	
<b>90</b>															0	34	70	
<b>95</b>																0	35	
<b>100</b>																	0	

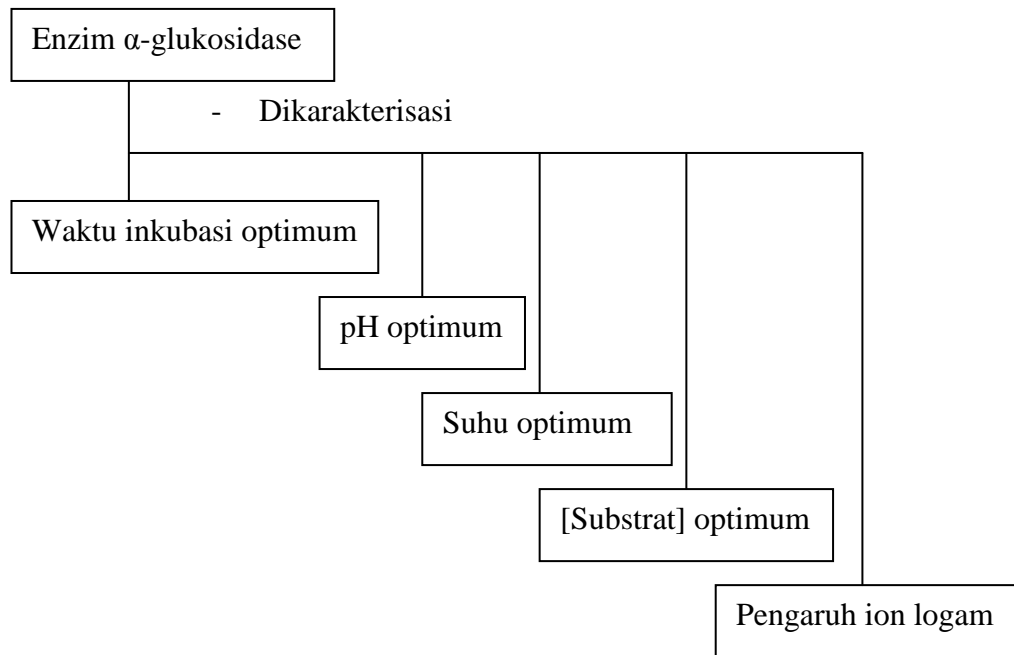
Rumus massa amonium sulfat pada masing-masing tingkat kejenuhan:

$$533 (S2-S1)/100-(0,3 \times S1) \times \text{Volume filtrat (mL)}/1000 = \dots \text{ gram}$$

**Contoh perhitungan massa garam amonium sulfat yang ditambahkan**

- a. 0-20% = 106 x 653/1000 = 69,128 g
- b. 20-40% = 113 x 600/1000 = 67,8 g
- c. 40-60% = 120 x 560/1000 = 67,2 g
- d. 60-80% = 129 x 540/1000 = 69,66 g
- e. 80-100% = 139 x 530/1000 = 73,67 g

**Lampiran 8. Karakterisasi enzim  $\alpha$ -glukosidase bebas (Sigma Aldrich, 1996)**



**Lampiran 9. Tabel hasil karakterisasi  $\alpha$ -glukosidase bebas**

<b>Waktu (menit)</b>	<b>Absorban</b>	<b>Aktivitas <math>\alpha</math>-glukosidase (mU/mL)</b>
5	0,055	85,66
10	0,147	114,47
15	0,257	133,42
20	0,379	147,56
25	0,475	147,95
30	0,571	148,21

<b>pH</b>	<b>Absorban</b>	<b>Aktivitas <math>\alpha</math>-glukosidase (mU/mL)</b>
5	0,14	54,51
5,5	0,219	85,27
6	0,254	98,89
6,5	0,333	129,65
7	0,381	148,34
7,5	0,073	28,42
8	0,053	20,64

<b>Suhu (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Absorban</b>	<b>Aktivitas <math>\alpha</math>-glukosidase (mU/mL)</b>
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

Konsentrasi Substrat (mM) ([S])	Absorban	Aktivitas $\alpha$ -glukosidase (mU/mL) (V)	1/[S]	1/V
1	0,110	42,83	1,0000	0,0233
2	0,156	60,74	0,5000	0,0165
3	0,202	78,65	0,3333	0,0127
4	0,251	97,73	0,2500	0,0102
5	0,288	112,13	0,2000	0,0089
6	0,320	124,59	0,1667	0,0080
7	0,356	138,61	0,1429	0,0072
8	0,379	147,56	0,1250	0,0068
9	0,380	147,95	0,1111	0,0068
10	0,381	148,34	0,1000	0,0067

Logam	Aktivitas Spesifik $\alpha$ -glukosidase (U/mg)			Aktivitas Relatif $\alpha$ -glukosidase (%)		
	10 mM	50 mM	250 mM	10 mM	50 mM	250 mM
Mg	3,77	3,97	4,10	102,37	107,65	111,35
Mn	3,90	4,02	4,14	105,80	109,23	112,40
Co	3,33	3,24	3,12	90,50	87,86	84,70
Zn	3,19	2,80	1,86	86,54	75,99	50,66
Kontrol	3,68			100		

### Contoh perhitungan aktivitas relatif $\alpha$ -glukosidase

$$\text{aktivitas relatif } \alpha\text{-glukosidase} = \frac{\text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase dengan logam}}{\text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase kontrol}} \times 100\%$$

#### Diketahui:

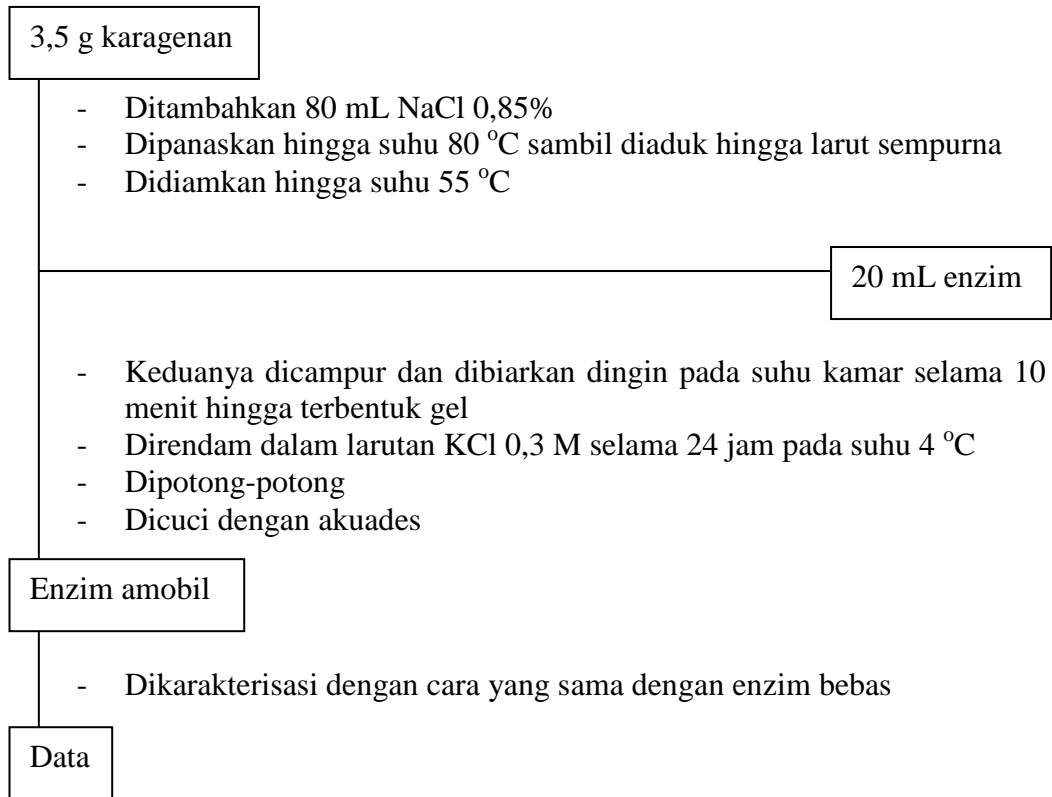
$$\begin{aligned} \text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase kontrol} &= 3,68 \text{ U/mg} \\ \text{aktivitas spesifik } \alpha\text{-glukosidase dengan logam} &= 3,77 \text{ U/mg} \end{aligned}$$

#### Penyelesaian

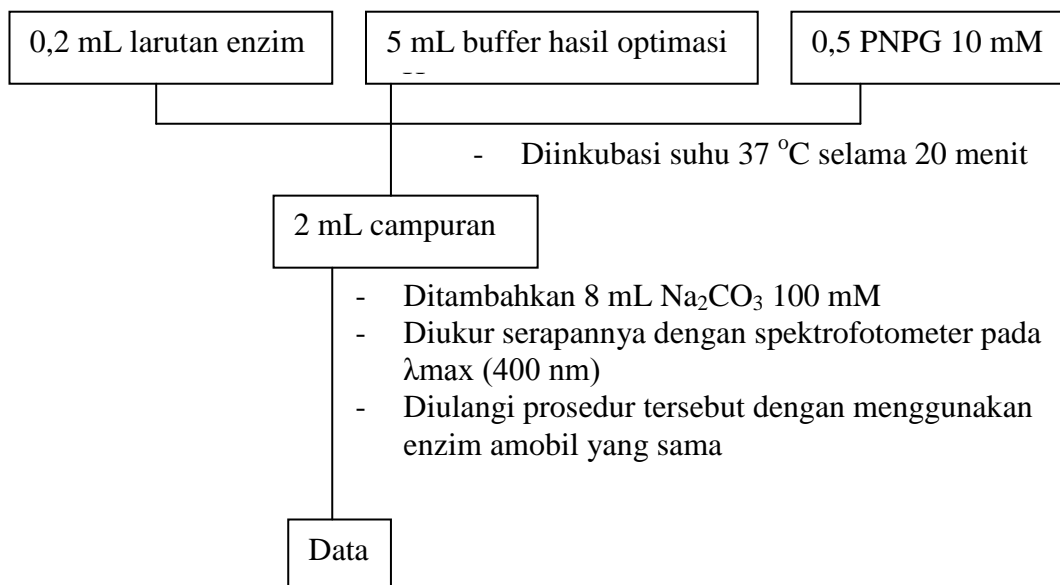
$$\begin{aligned} \text{aktivitas relatif } \alpha\text{-glukosidase} &= \frac{3,77}{3,68} \times 100\% \\ &= 102,37\% \end{aligned}$$

## Lampiran 10. Amobilisasi dan uji perulangan enzim $\alpha$ -glukosidase

### 1. Amobilisasi enzim $\alpha$ -glukosidase (Sebayang, 2006)



### 2. Penentuan perulangan pemakaian enzim $\alpha$ -glukosidase amobil



**Lampiran 11. Tabel hasil karakterisasi  $\alpha$ -glukosidase amobil**

---

<b>Waktu (menit)</b>	<b>Absorban</b>	<b>Aktivitas <math>\alpha</math>-glukosidase (mU/mL)</b>
5	0,057	88,77
10	0,151	117,58
15	0,259	134,45
20	0,382	148,73
25	0,479	149,20
30	0,576	149,51

---

---

<b>pH</b>	<b>Absorban</b>	<b>Aktivitas <math>\alpha</math>-glukosidase (mU/mL)</b>
5	0,145	56,45
5,5	0,234	91,11
6	0,265	103,18
6,5	0,354	137,83
7	0,382	148,73
7,5	0,124	48,28
8	0,088	34,26

---

---

<b>Suhu (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Absorban</b>	<b>Aktivitas <math>\alpha</math>-glukosidase (mU/mL)</b>
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

---

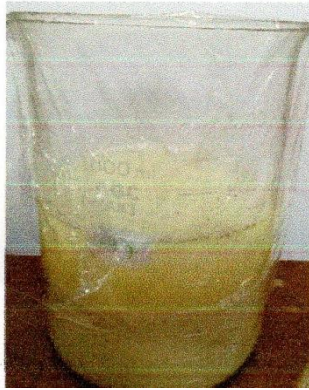
Konsentrasi Substrat (mM) ([S])	Absorban	Aktivitas $\alpha$ -glukosidase (mU/mL) (V)	1/[S]	1/V
1	0,118	45,94	1,0000	0,0218
2	0,164	63,85	0,5000	0,0157
3	0,211	82,15	0,3333	0,0122
4	0,261	101,62	0,2500	0,0098
5	0,296	115,25	0,2000	0,0087
6	0,331	128,87	0,1667	0,0078
7	0,365	142,11	0,1429	0,0070
8	0,382	148,73	0,1250	0,0067
9	0,383	149,12	0,1111	0,0067
10	0,384	149,51	0,1000	0,0067

Logam	Aktivitas Spesifik $\alpha$ -glukosidase (U/mg)			Aktivitas Relatif $\alpha$ -glukosidase (%)		
	10 mM	50 mM	250 mM	10 mM	50 mM	250 mM
Mg	3,80	4,00	4,13	102,36	107,59	111,26
Mn	3,93	4,05	4,17	105,76	109,16	112,30
Co	3,36	3,27	3,15	90,58	87,96	84,82
Zn	3,22	2,83	1,89	86,65	76,18	51,05
Kontrol		3,71			100	

Perulangan Pemakaian	Absorban	Aktivitas $\alpha$ -glukosidase (mU/mL)
I	0,382	148,73
II	0,382	148,73
III	0,381	148,34
IV	0,381	148,34
V	0,38	147,95
VI	0,369	143,67
VII	0,348	135,49



**Lampiran 12. Dokumentasi penelitian tahapan isolasi enzim  $\alpha$ -glukosidase**



Hasil ekstraksi beras ketan putih dengan buffer pH 7

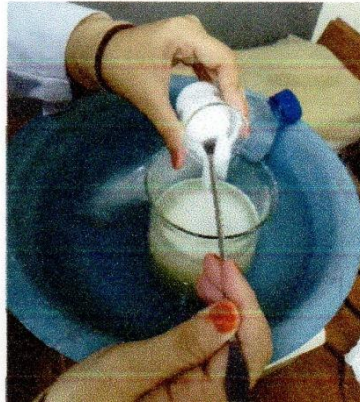


Proses sentrifugasi ekstrak kasar enzim;

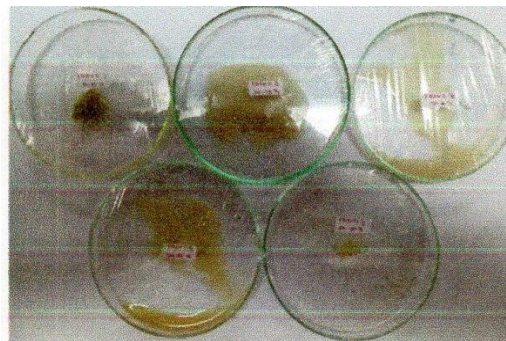


Uji kualitatif enzim  $\alpha$ -glukosidase.

**Lampiran 13. Dokumentasi penelitian tahap fraksinasi enzim  $\alpha$ -glukosidase**



Penambahan garam amonium sulfat

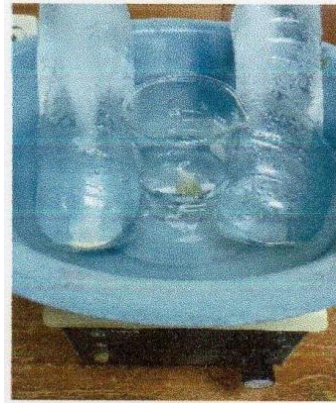


Fraksi I, II, III, IV, dan V



Supernatan hasil fraksinasi amonium sulfat dari kiri ke kanan adalah supernatant 0-20, 20-40%, 40-60, 60-80%, 80-100%, dan filtrat sisa.

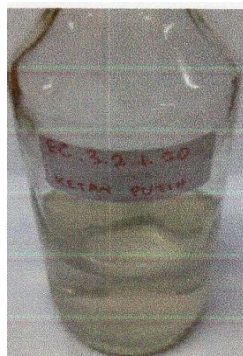
**Lampiran 14. Dokumentasi penelitian tahap dialisis enzim  $\alpha$ -glukosidase**



Proses dialisis enzim dalam membran selofan

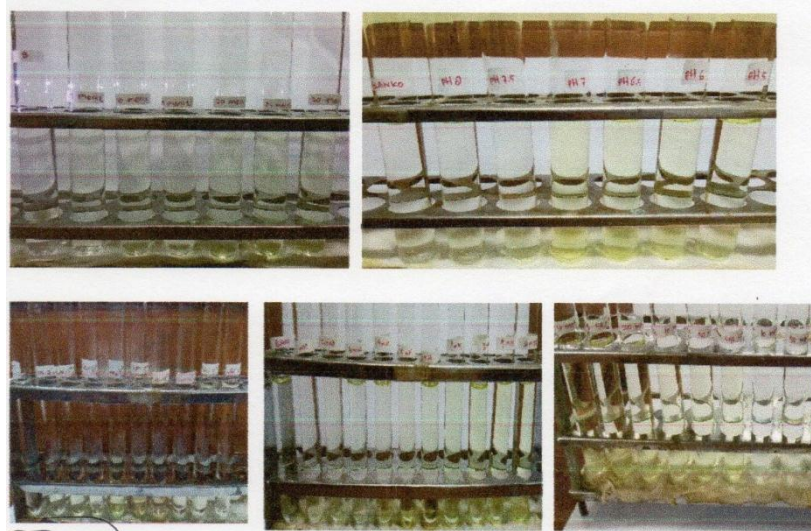


Dialisat dari kiri ke kanan adalah dialisat I, II, III, IV, dan V

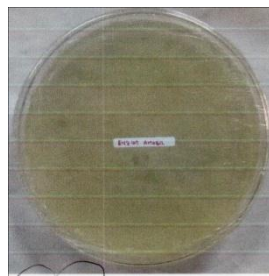


Enzim hasil dialisis

**Lampiran 15. Dokumentasi penelitian tahap karakterisasi enzim  $\alpha$ -glukosidase bebas dan yang telah diamobilisasi**



Tahapan karakterisasi enzim hasil dialisis (a) optimasi waktu; (b) optimasi pH; (c) optimasi suhu; (d) optimasi [substrat]; (e) pengaruh ion logam



Enzim  $\alpha$ -glukosidase amobil



Tahapan karakterisasi enzim amobil (a) optimasi waktu; (b) optimasi pH; (c) optimasi suhu; (d) optimasi [substrat]; (e) pengaruh ion logam