

ISOLATION AMYLASE FROM SPROUTS SEED OF JACKFRUIT (*Artocarpus heterophyllus* Lam)

ISOLASI AMILASE DARI KECAMBAH BIJI NANGKA (*Artocarpus heterophyllus* Lam)

Ismi Fahmi^{1*}, Winni Astuti¹ dan Saibun Sitorus¹

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mulawarman, Samarinda

*Corresponding Author: ismifahmi6@gmail.com

ABSTRACT

This research aims to isolate the crude extract amylase of sprouted seeds jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) and determine the specific activity. Determination of total protein concentration and amylase activity of enzyme crude extract on seed germination jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam). Determination of total protein concentration using the method of Bradford, whereas the determination of amylase activity was performed using dinitrosalisilat acid method (DNS). The results showed a total protein concentration of the enzyme crude extract of sprout seeds jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) is 319,47 ug / mL, amylase activity of 13,96 U / mL and specific activity is 1748,05 U / mg.

Keywords : bean sprouts jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam), crude extract enzymes, total protein and amylase.

PENDAHULUAN

Amilase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis ikatan glikosidik dalam molekul pati. Amilase digunakan industri makanan dan minuman, tekstil, detergen, kertas, farmasi dan lain-lain . Kebutuhan amilase di dunia industri sangat tinggi, pada awal tahun 1993, kebutuhan amilase di Jawa Barat, mencapai 40 ton/bulan atau setara dengan US \$2.800.000 untuk keperluan tekstil. Kebutuhan amilase pada tahun 2004 mencapai penjualan sekitar US \$2 milyar, sedangkan amilase yang digunakan untuk industri makanan dan minuman pada tahun 2004 bernilai sekitar US \$11 juta ^[2]. Kebutuhan amilase di Indonesia masih bergantung pada impor.

Sumber enzim dapat diperoleh dari tanaman yaitu biji-bijian. Biji mengandung karbohidrat, protein dan lemak. Pertumbuhan tanaman yang berasal dari biji diawali oleh proses perkecambahan. Dalam pertumbuhan kecambah memerlukan energi dan energi tersebut dihasilkan dari perombakan bahan-bahan organik oleh enzim. Enzim-enzim tersebut antara lain protease, lipase dan amilase ^[3]. Berdasarkan hal tersebut diduga pada kecambah biji nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam) berpotensi sebagai penghasil amilase.

Saat ini penelitian tentang amilase mengarah pada penemuan-penemuan sumber-sumber enzim baru. Penelitian amilase yang telah dari kecambah kacang hijau menghasilkan amilase dengan aktivitas 4,09 U/mL dan aktivitas spesifik 1,73 U/mg ^[4]. Kecambah biji jagung ketan (*Zea mays ceratina* L.) memiliki amilase dengan kondisi optimum pH 9, konsentrasi substrat 12,5% dan temperatur 70 °C.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka pada penelitian ini dilakukan isolasi amilase dari kecambah biji nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam) dan penentuan aktivitasnya.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer *Visible*, kuvet, mikropipet (10-100 µL), mikropipet (100-1000 µL), tip 100 µL, tip 1000 µL, penjepit tabung, pH-meter, blender, sentrifugasi, neraca analitik, corong kaca, *beaker glass*, pipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung mikro, *stopwatch*, *waterbath*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, gelas ukur, spatula, botol semprot, sikat tabung, labu takar 10 mL, labu takar 25 mL, labu takar 100 mL, labu takar 250 mL dan batang pengaduk .

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kecambah biji nangka, akuades, aquabidest, amilum (*soluble starch*), pereaksi asam dinitrosalisilat (DNS), BSA (*Bovine Serum Albumin*), pereaksi Bradford (*Thermosentific*), NaCH₃COO (Merck), CH₃COOH_(p) (Merck), Na₂HPO₄.12H₂O, NaH₂PO₄.H₂O (Merck), C₄H₄KNaO₆. 4H₂O (Merck), C₆H₁₂O₆. H₂O (Merck) dan NaOH (Merck)

Prosedur penelitian

Isolasi Enzim dari Kecambah Biji Nangka

Kecambah biji nangka yang telah dibersihkan dipotong dan ditimbang sebanyak 50 g lalu ditambahkan 100 mL bufer fosfat 0,1 M pH 7

kemudian dihancurkan dengan menggunakan blender pada kondisi dingin, setelah hancur dibiarkan selama 30 menit, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Residu dibuang dan filtrat diambil kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13225 g selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar amilase.

Penentuan Konsentrasi Protein Total (Ekstrak Kasar Amilase)

Konsentrasi protein ditentukan dengan metode Bradford dan digunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai protein standar. Penentuan konsentrasi protein terdiri dua bagian, pertama pembuatan kurva standar protein dan kedua penentuan konsentrasi protein.

a. Persiapan Kurva Standar

Kurva standar BSA dibuat dari larutan stok BSA 100 µg/mL. Konsentrasi standar BSA yang digunakan untuk variasi penentuan konsentrasi protein adalah 0, 4, 8, 10, 12, 16, 20 µg/mL. Larutan BSA dengan masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 500 µL direaksikan dengan 500 µL reagen Bradford dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Setelah itu, sampel diukur absorbansinya pada λ 595 nm. Nilai absorbansinya diplotkan dengan kurva standar protein yang dibuat antara konsentrasi larutan BSA (C) terhadap absorbansi (A). Persamaan garis yang diperoleh dapat digunakan pada perhitungan kandungan protein enzim. Sebagai blanko digunakan akuades.

b. Penentuan Konsentrasi Protein

Ekstrak kasar enzim diambil sebanyak 100 µL kemudian diencerkan dengan akuades 900 µL. Enzim hasil pengenceran diambil sebanyak 500 µL dan ditambahkan 500 µL reagen Bradford lalu divortex, diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 595 nm. Data absorbansi yang diperoleh dikonversikan pada persamaan garis dari kurva standar BSA yang telah dibuat sehingga diperoleh konsentrasi kandungan protein.

Uji Aktivitas Amilase Secara Kuantitatif dengan Metode Asam Dinitrosalisilat (DNS)

a. Penentuan Kurva Standar Glukosa

Pengujian aktivitas amilase menggunakan metode DNS. Kedalam tabung mikro, masukkan masing-masing 50 µL larutan glukosa berbagai konsentrasi 2,0; 3; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 mM.

Ditambahkan reagen DNS 50 µL ke dalam masing-masing tabung mikro. Kemudian masukkan tabung mikro ke dalam air mendidih selama 10 menit. Setelah 10 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Kedalam masing-masing tabung mikro ditambahkan 900 µL akuades. Setelah itu diukur absorbansi larutan dengan menggunakan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar glukosa dibuat dengan menggunakan data konsentrasi larutan glukosa pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y. Untuk blanko dimasukkan 50 µL akuades dan 50 µL reagen DNS ke dalam tabung mikro.

b. Uji Aktivitas Amilase

Uji aktivitas amilase ditentukan dengan mengukur jumlah gula pereduksi yang terbentuk menggunakan metode asam dinitrosalisilat (DNS) [5] dengan glukosa sebagai standar kalibrasi. Uji aktivitas amilase dilakukan dengan mencampurkan 50 µL campuran reaksi yang terdiri dari 25 µL amilum 1% (amilum 0,1 gram dilarutkan kedalam 10 mL akuades) dan 25 µL enzim kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 µL pereaksi DNS. Campuran reaksi tersebut selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya campuran reaksi didinginkan sampai suhu kamar dan ditambahkan akuades 900 µL. Absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang 540 nm. Semua uji dilakukan tiga kali pengulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Ekstrak Kasar Enzim dari Kecambah Biji Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam)

Sampel pada penelitian ini adalah biji nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam) yang berasal dari kota Samarinda. Biji nangka ditumbuhkan kecambahnya pada media tanah selama \pm 12 hari. Isolasi ekstrak kasar enzim dilakukan 2 tahap yaitu tahap homogenisasi dan tahap sentrifugasi. Kecambah biji nangka sebanyak 50 g dihomogenisasi dengan blender larutan buffer fosfat pH 7 0,1 M pada kondisi dingin. Homogenisasi berfungsi untuk memecah dinding sel tumbuhan tanpa merusak organel yang ada didalam sel dan enzim yang terdapat dalam sel larut dalam pelarut buffer. Homogenisasi dalam keadaan dingin untuk menjaga struktur tersier enzim agar tidak terdenaturasi pada saat diblender [6]. Larutan buffer digunakan agar dapat menjaga pH larutan tetap stabil sehingga tidak terpengaruh oleh sedikit penambahan asam atau penambahan basa dari lingkungan. Hasil homogenisasi berupa filtrat dan ampas. Filtrat

selanjutnya disaring dengan kertas saring diambil filtrat dan ampasnya dibuang. Hasil filtrat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13225 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Fungsi sentrifugasi adalah untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim yang lebih jernih lagi dan untuk memisahkan material yang tidak larut. Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C untuk meminimalkan terdenaturasinya enzim selama proses isolasi sehingga aktivitas enzim yang ada didalamnya tidak mengalami penurunan. Hasil sentrifugasi yaitu supernatan atau biasa disebut ekstrak kasar enzim, diambil ekstrak kasar enzimnya kemudian debris sel dibuang. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya akan ditentukan konsentrasi protein dan kondisi kerja optimumnya.

Penentuan Konsentrasi Protein dengan Metode Bradford

Metode Bradford merupakan suatu metode untuk mengukur konsentrasi atau kadar protein total dengan metode kolorimetri dalam suatu larutan. Prinsip pengukuran konsentrasi protein menggunakan metode Bradford adalah pengikatan pewarna *Commassie Brilliant Blue G-250* (CBB) yang terdapat dalam pereaksi Bradford dengan protein yang mengandung residu asam amino dengan rantai sampai aromatik (Tirosin, Triptofan dan Fenilalanin) atau bersifat basa (Arginin, Histidin dan Leusin) membentuk kompleks berwarna biru yang dapat diukur absorbansinya. Dengan demikian, absorbansinya protein dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar protein yang diperoleh yaitu $y = 0,0145x + 0,0311$ dan $R^2 = 0,9649$.

Perhitungan konsentrasi protein dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan kadar protein total ke dalam persamaan regresi kurva standar protein BSA. Absorbansi ekstrak kasar enzim dari kecambah biji nangka adalah 0,494. Konsentrasi protein total pada ekstrak kasar enzim dari kecambah biji nangka adalah 319,47 µg/mL.

Penentuan Aktivitas Amilase dengan Metode Asam dinitrosalisilat (DNS)

Penentuan kondisi optimum amilase dilakukan secara kuantitatif dengan metode asam dinitrosalisilat (DNS) dengan menggunakan glukosa sebagai standar. Kadar glukosa pada setiap sampel

dihitung dengan mensubstitusikan hasil absorbansi pada masing-masing sampel ke dalam persamaan regresi kurva standar glukosa. Konsentrasi glukosa yang digunakan yaitu 0 mM; 2,0 mM; 3,0 mM; 3,5 mM; 4,0 mM dan 5,0 mM. Persamaan regresi linier yang diperoleh yaitu $y = 0,0152x + 0,0076$ dan $R^2 = 0,9887$.

Aktivitas amilase unit adalah jumlah glukosa yang dihasilkan enzim dan pati dalam 1 mikromol per menit per mL enzim. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan aktivitas amilase pada ekstrak kasar enzim yaitu 13,96 U/mL.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian isolasi amilase dari kecambah biji nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam) dapat disimpulkan: Konsentrasi protein total (ekstrak kasar enzim) dari kecambah biji nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam) yaitu 319,469 µg/mL. Aktivitas amilase (ekstrak kasar enzim) dari kecambah biji nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam) yaitu 13,96 U/mL. Aktivitas spesifik amilase (ekstrak kasar enzim) dari kecambah biji nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam) yaitu 1748,05 U/mg.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sriwahyuni, L, Rosahdi, D. T dan Supriadin, A. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Amilase dari Biji Durian (*Durio Sp.*). *al Kimiya*, Vol 2. No.1; 18-23. Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Gunung Djati: Bandung.
- [2] Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C.R., A. 2006. α -amylases from Microbial Sources. *Food Technol Biotechnol*, 44 (2); 173-184.
- [3] Bahri, S. Mirzan, M dan Hasan, M. 2012. Karakterisasi Enzim Amilase Dari Biji Jagung Ketan (*Zea Mays Ceratina* L.) *Jurnal Natural Science*, Vol. 1 (1), 132-143. Universitas Tadulako: Palu.
- [4] Suarni dan Patong, R. 2007. Potensi kecambah Kacang Hijau Sebagai Sumber Enzim α -amilase. *Indo. J. Chem.* 7(3); 332-336. Universitas Hasanuddin: Makassar.
- [5] Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, Vol. 31, 426-428.
- [6] Mutia, M. Dali, S. Arfah, R. Zenta, F. 2013. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Akar Rimpang Alang- Alang (Imperata cylindrical)*. UNHAS: Makassar.