



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI ENZIM  $\alpha$ -GLUKOSIDASE  
DARI GABAH (*Oryza sativa* var. Ciherang)**

**SKRIPSI**

**Arief Budiman  
0606068890**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM S1 REGULER KIMIA  
DEPOK  
JULI 2011**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI ENZIM  $\alpha$ -GLUKOSIDASE  
DARI GABAH (*Oryza sativa* var. Ciherang)**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains**

**Arief Budiman  
0606068890**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI S1 REGULER KIMIA  
DEPOK  
JULI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Arief Budiman

NPM : 0606068890

Program Studi : Si Reguler Kimia

Judul Skripsi : ... dan Gabah

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Arief Budiman

NPM : 0606068890

Tanda Tangan : ... 

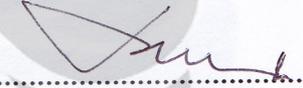
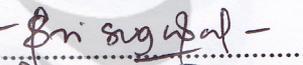
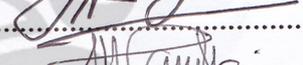
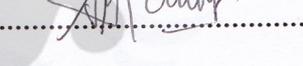
Tanggal : 20 Juni 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Arief Budiman  
NPM : 0606068890  
Program Studi : S1 Reguler Kimia  
Judul Skripsi : Isolasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Gabah  
(*Oryza sativa* var. Ciherang)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Siswati Setiasih Apt M.Si (.....)  
Pembimbing II: Dra. Sri Sugiwati M.Si (.....)  
Penguji : Dra. Susilowati Hadisusilo M.Sc (.....)  
Penguji : Drs. Sultan Badjri M.Si (.....)  
Penguji : Dra. Sri Handayani M.Biomed (.....)

Ditetapkan di: Depok  
Tanggal: 20 Juni 2011

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan, karena atas berkat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu penulis secara khusus mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dra. Siswati Setiasih, Apt, M.Si, selaku pembimbing I yang telah bersedia menerima serta membimbing penulis dalam melaksanakan penelitian. Banyak-banyak terima kasih penulis ucapkan atas bantuannya kepada penulis sehingga dapat menempuh tahap akhir dalam jenjang sarjana.
2. Dra. Sri Sugiwati, M.Si, selaku pembimbing II atas kesediannya memfasilitasi serta mengarahkan penulis dalam penelitian. Terima kasih juga penulis ucapkan atas segala bantuan dan waktu yang telah diberikan kepada penulis yang tanpanya hampir mustahil penulis menyelesaikan skripsi ini.
3. Pusat Penelitian Kimia LIPI yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian
4. Para laboran Laboratorium Biokimia Departemen FMIPA UI, khususnya Mbak Emma atas bantuan alat dan bahan yang diperlukan selama penelitian
5. Para laboran Laboratorium Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI: Mas Tri dan Mbak Catur atas bantuannya kepada penulis dalam melaksanakan penelitian
6. Dr. Ridla Bakri, selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA UI

7. Dr. Asep Saifumilah, selaku pembimbing akademis yang telah membimbing penulis selama menempuh pendidikan
8. Dra. Tresye Utari, M.Si, selaku koordinator penelitian yang telah membantu penulis dalam melancarkan penelitian
9. Seluruh staff pengajar, karyawan, dan laboran departemen kimia UI
10. Ibu atas kasih sayang dan perawatan, serta pada ayah atas kebanggaan dan jasa.
11. Kak Yudo atas doa dan bimbingan rohani yang diberikan kepada penulis
12. Bambang, Iwanda dan Vivi yang dalam banyak kesempatan membantu dan memberikan dukungan yang sangat diperlukan.
13. Seluruh teman-teman kimia angkatan 2006 dan 2007 atas dukungan dan persahabatan
14. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya skripsi ini

Akhir kata, penyusunan skripsi ini masihlah jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, Juli 2011

penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Arief Budiman  
NPM : 0606068890  
Program Studi : S1 Reguler  
Departemen : Kimia  
Fakultas : MIPA  
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

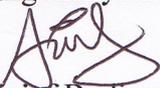
**Isolasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Gabah (*Oryza sativa* var *Ciherang*)**

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 20 Juni 2011.

Yang menyatakan

  
(Arief Budiman)

## ABSTRAK

**Nama** : **Arief Budiman**  
**Program Studi** : **Kimia**  
**Judul** : **Isolasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Gabah (*Oryza sativa* var Ciherang)**

Enzim  $\alpha$ -glukosidase (EC. 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glukosida glukohidrolase) adalah enzim terikat membran yang terdapat pada epitel usus halus dan berperan pada pencernaan karbohidrat makanan. Pada penderita Diabetes Mellitus (DM) tipe 2, inhibisi terhadap enzim ini menyebabkan penghambatan absorpsi glukosa sehingga dapat mengurangi keadaan hiperglikemia setelah makan. Enzim ini diperlukan pada penemuan senyawa analog sebagai inhibitor enzim tersebut dalam rangka penemuan obat Diabetes Mellitus tipe dua. Distribusi enzim ini tersebar luas pada mamalia, tanaman, serangga dan mikroorganisme. Tanaman merupakan sumber  $\alpha$ -glukosidase yang telah banyak diisolasi dan diteliti, terutama dari golongan serealisa seperti padi. Pada penelitian ini, sebagai sumber enzim digunakan beras dan gabah varietas Ciherang. Beras dan gabah selanjutnya dibuat menjadi ekstrak kasar enzim tepung beras, tepung gabah dan tepung aseton gabah dengan menggunakan buffer fosfat dan kemudian diuji aktivitasnya. Ekstrak dengan aktivitas tertinggi dilakukan fraksinasi menggunakan amonium sulfat (*salting out*) dengan kenaikan tingkat kejenuhan. Fraksi dengan aktivitas tertinggi kemudian dilakukan dialisis. Enzim hasil dialisis kemudian ditentukan pH optimumnya dan uji inhibisinya dengan senyawa quersetin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari ketiga ekstrak kasar enzim, tepung gabah menunjukkan aktivitas tertinggi yaitu 23,75 mU/mL. Tingkat kejenuhan 20-50% merupakan fraksi dengan aktivitas tertinggi sebesar 19,05 mU/mg. Enzim hasil dialisis memiliki aktivitas spesifik 41,16 mU/mg dan pH optimum 6. Pada uji inhibisi, quersetin dengan kadar 0,1% memiliki persen inhibisi tertinggi sebesar 13,07%.

Kata Kunci: isolasi, *Oryza sativa*,  $\alpha$ -Glukosidase, Diabetes Mellitus tipe 2

## ABSTRACT

**Name** : **Arief Budiman**  
**Study Program** : **Chemistry**  
**Title** : **Isolation of  $\alpha$ -Glucosidase from Gabah (*Oryza sativa* var. Ciherang)**

$\alpha$ -Glucosidase (EC. 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glucoside glucohydrolase) is a membrane-bound enzyme located in intestinal epithelium, play role in carbohydrate digestion of food. In people having Diabetes Mellitus type 2, inhibition of the enzyme inhibits absorption of glucose reducing hyperglycemia postprandial. The enzyme is essential in the research to find the active compound that able to inhibit the enzyme in order to find Diabetes Mellitus type 2 drugs. The enzyme found widespread in mammal, plants, insects and microorganism. Plants are the enzyme source that isolated and studied most, particularly the cereals: rice. In this study, rice and gabah (var. Ciherang) are used as the enzyme source. From these, the crude extract of rice flour, gabah flour and gabah acetone powder were made by using phosphate buffer and the activity assayed. The extract showing highest activity was subjected to salting out using ammonium sulfate by increasing level of saturation. Furthermore, fraction containing highest specific activity was subjected to dialysis. The retentate was determined its optimal pH and inhibition against quercetin. The results showed that of the three extracts, gabah flour showing the highest activity at 23.75 mU/mL. The saturation level of 20-50% showing the fraction of highest specific activity at 19.05 mU/mg. The retentate specific activity was found to be 45.16 mU / mg and the optimum pH was 6. The inhibition against 0.1% quercetin showed the highest at 13.07%

Keyword: Isolation, *Oryza sativa*,  $\alpha$ -Glucosidase, Diabetes Mellitus type 2

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR GRAFIK.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Enzim.....	4
2.1.1 Protein.....	4
2.1.2 Definisi Enzim.....	6
2.1.3 Penggolongan Enzim.....	7
2.1.4 Inhibisi Enzim.....	8
2.1.5 Enzim $\alpha$ -Glukosida.....	9
2.2 Isolasi Enzim.....	10
2.2.1 Ekstraksi.....	10
2.2.2 Fraksionasi dengan <i>Salting Out</i> .....	11
2.2.3 Dialisis.....	11

<b>3. METODOLOGI</b>	
3.1 Waktu dan Tempat.....	13
3.2 Alat.....	13
3.3 Bahan.....	13
3.3.1 Sumber Enzim.....	13
3.3.2 Bahan Kimia.....	13
3.4 Prosedur Kerja.....	14
3.4.1 Preparasi Sumber Enzim.....	14
3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kasar.....	14
3.4.3 Variasi pH Buffer pada Pembuatan Ekstrak Kasar.....	14
3.4.4 Uji Aktivitas.....	15
3.4.5 Uji Kadar Protein.....	15
3.4.6 Isolasi dengan <i>Salting Out</i> .....	16
3.4.7 Uji Kestabilan.....	17
3.4.8 Dialisis dan Penentuan pH Optimum.....	17
3.4.9 Uji Aktivitas Inhibisi dengan Quersetin.....	18
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Preparasi Sampel dan Pemilihan Sumber Enzim.....	19
4.2 Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase.....	20
4.3 Variasi pH Buffer pada Ekstraksi Enzim Kasar dari TG.....	21
4.4 Isolasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Metode <i>Salting Out</i> .....	22
4.5 Uji Stabilitas Enzim terhadap Pengaruh Penyimpanan.....	23
4.6 Dialisis dan Penentuan pH Optimum.....	24
4.7 Uji Aktivitas Inhibisi dengan Quersetin.....	26
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>28</b>
<b>DAFTAR REFERENSI.....</b>	<b>29</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>32</b>

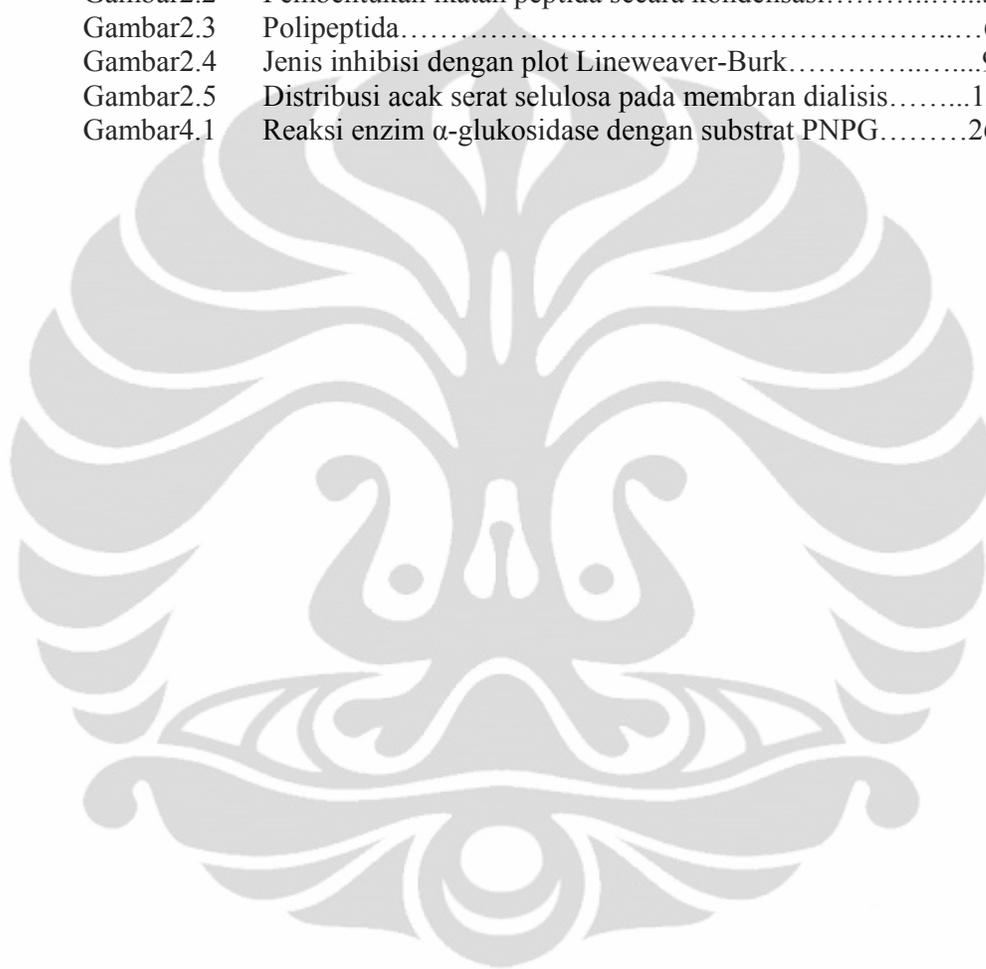
## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Golongan enzim dan reaksi yang dikatalisisnya.....	7
Tabel 2.2	Tiga jenis inhibisi.....	8
Tabel 3	Sistem reaksi enzim untuk satu sampel.....	18
Tabel 4.1	Aktivitas enzim dari ketiga ekstrak pada pH 7.....	20
Tabel 4.2	Aktivitas enzim $\alpha$ -glukosidase pada beberapa nilai pH.....	21
Tabel 4.3	Data Pemurnian Enzim.....	23
Tabel 4.4	Aktivitas enzim fraksi II pada waktu penyimpanan .....	24
Tabel 4.5	Aktivitas enzim sebelum dan sesudah dialisis.....	25
Tabel 4.6	Aktivitas enzim hasil dialisis pada berbagai pH.....	25
Tabel 4.7	Data serapan dan persen inhibisi $\alpha$ -glukosidase.....	27



## DAFTAR GAMBAR

Gambar2.1	Struktur umum asam amino.....	4
Gambar2.2	Pembentukan ikatan peptida secara kondensasi.....	5
Gambar2.3	Polipeptida.....	6
Gambar2.4	Jenis inhibisi dengan plot Lineweaver-Burk.....	9
Gambar2.5	Distribusi acak serat selulosa pada membran dialisis.....	12
Gambar4.1	Reaksi enzim $\alpha$ -glukosidase dengan substrat PNPB.....	26



## DAFTAR GRAFIK

Grafik 4.1 Aktivitas Enzim terhadap nilai pH.....	21
Grafik 4.2 Pengaruh waktu penyimpanan terhadap kestabilan enzim.....	24
Grafik 4.3 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim hasil dialisis.....	26



## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1 Skema prosedur kerja.....	32
LAMPIRAN 2 Gambar gabah.....	37
LAMPIRAN 3 Gambar endapan enzim dengan <i>salting out</i> .....	38
LAMPIRAN 4 Pengukuran kadar protein dengan metode Lowry.....	39
LAMPIRAN 5 Data serapan uji inhibisi dan contoh perhitungan.....	40



# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Enzim adalah protein yang berperan meningkatkan laju reaksi kimia di dalam organisme hidup. Laju reaksi kimia di dalam organisme hidup dapat meningkat  $10^9$  sampai  $10^{20}$  kali lebih cepat dengan adanya enzim. Enzim memiliki spesifisitas yang tinggi terhadap substratnya serta memiliki aktifitas tertinggi pada temperatur dan pH optimumnya<sup>1</sup>.

Setiap organisme hidup memiliki berbagai jenis enzim yang mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia yang berbeda. Diperkirakan dalam satu sel bakteri terdapat 3000 jenis protein yang sebagian besar merupakan enzim, sedangkan di dalam satu sel eukariot terdapat 50000 jenis protein. Di dalam tubuh manusia, enzim terdistribusi berdasarkan kebutuhan tubuh untuk mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia spesifik serta dapat digolongkan menjadi enzim-enzim pencernaan dan enzim-enzim metabolis. Enzim-enzim pencernaan terdapat pada beberapa bagian tubuh seperti lambung dan pankreas. Enzim-enzim metabolis berperan dalam menjalankan fungsi fisiologis yang tersebar pada seluruh bagian tubuh yaitu dalam organ-organ, tulang, darah yakni dalam setiap sel itu sendiri<sup>2</sup>.

Enzim  $\alpha$ -Glukosidase (EC. 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glukosida glukohidrolase) adalah enzim terikat membran yang terdapat pada epitel usus halus dan berperan pada pencernaan karbohidrat makanan. Enzim ini merupakan karbohidrase tipe-ekso yang mengkatalisis penglepasan  $\alpha$ -glukosa dari ujung *non*-pereduksi karbohidrat makanan (amilopektin dan glikogen). Enzim ini dapat memutus ikatan glikosida  $\alpha(1\rightarrow6)$  pada titik percabangan amilopektin dan glikogen. Pada penderita Diabetes Mellitus (DM) tipe 2, inhibisi terhadap enzim ini dapat menyebabkan penghambatan absorpsi glukosa, sehingga dapat mengurangi keadaan hiperglikemia setelah makan. Beberapa senyawa inhibitor  $\alpha$ -glukosidase seperti acarbose, miglitol dan voglibose telah digunakan dalam pengobatan DM tipe 2 untuk mengatur kadar glukosa darah, tetapi senyawa tersebut memiliki beberapa efek

samping seperti perut kembung, sering buang angin, dan kemungkinan diare.

Saat ini sedang banyak dilakukan penelitian dalam rangka mencari senyawa aktif analog sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dengan efek samping rendah dari berbagai jenis bahan alam dalam rangka penemuan obat untuk pengobatan DM tipe 2<sup>3</sup>. Kebutuhan enzim  $\alpha$ -glukosidase dalam mendukung terlaksananya penelitian tersebut menjadi meningkat, sedangkan enzim  $\alpha$ -glukosidase yang dipasarkan memiliki harga yang relatif mahal. Oleh karena itu, perlu dilakukan isolasi enzim  $\alpha$ -glukosidase dari berbagai sumber.

Enzim  $\alpha$ -glukosidase tersebar luas pada mamalia, tanaman, serangga dan mikroorganisme<sup>4</sup>. Tanaman merupakan sumber  $\alpha$ -glukosidase yang telah banyak diisolasi dan diteliti, terutama dari golongan serealia (Poaceae atau Gramineae) seperti *barley* dan padi.

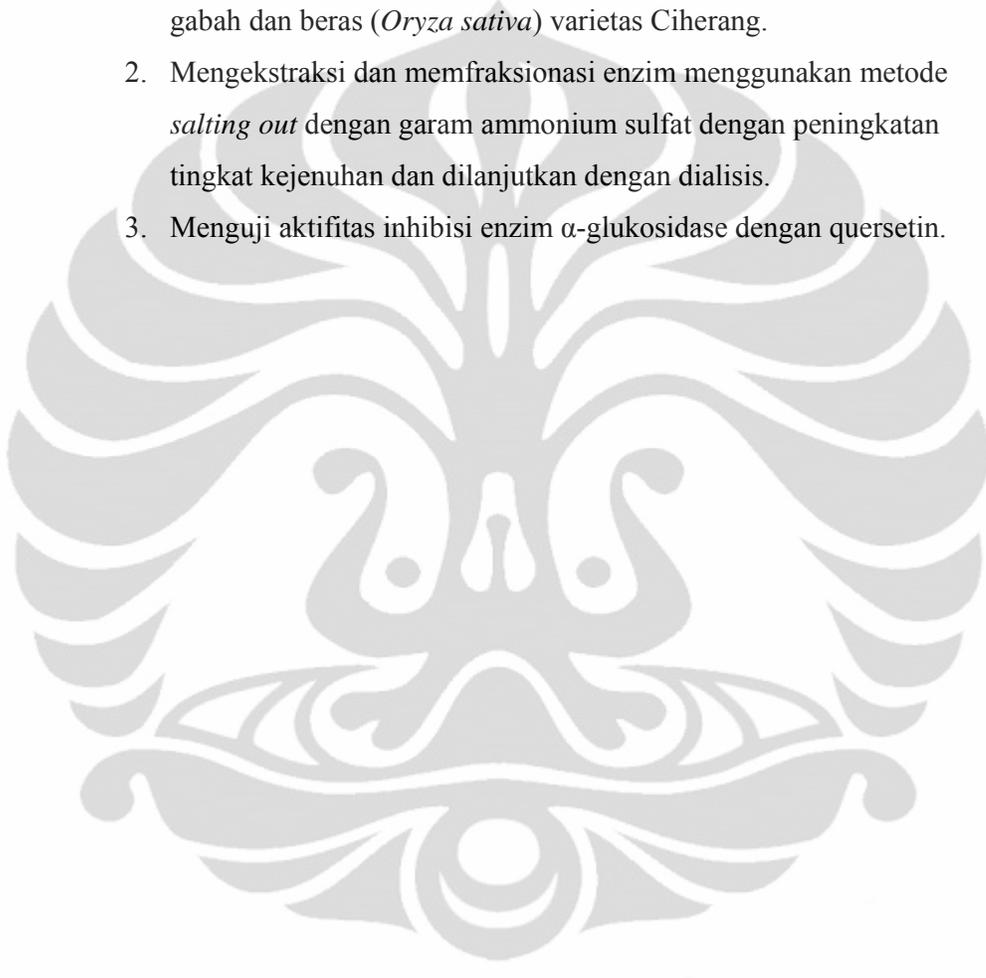
Berdasarkan spesifisitas terhadap substratnya, enzim  $\alpha$ -glukosidase dibedakan menjadi  $\alpha$ -glukosidase I dan II. Perbedaan spesifisitas ini disebabkan oleh perbedaan sumber isolasi enzim.  $\alpha$ -Glukosidase I berasal dari bakteri, yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) dan serangga, sedangkan  $\alpha$ -glukosidase II berasal dari *mold*, tumbuhan dan mamalia.  $\alpha$ -Glukosidase I memiliki aktivitas yang lebih tinggi terhadap substrat heterogen seperti *p*-nitrofenil  $\alpha$ -glukosida (PNPG) daripada terhadap substrat homogen seperti maltooligosakarida, sedangkan  $\alpha$ -glukosidase II memiliki aktivitas lebih tinggi terhadap substrat homogen daripada substrat heterogen<sup>5</sup>.

Pada penelitian ini sebagai sumber enzim dipakai gabah dan beras (*Oryza sativa*) varietas Ciherang. Gabah dan beras dipilih karena ketersediaannya di pasaran sehingga memberikan kemudahan untuk mendapatkannya, di samping juga telah banyak dipilih sebagai sumber penelitian-penelitian isolasi enzim  $\alpha$ -glukosidase. Tahapan isolasi diawali dengan pembuatan ekstrak kasar enzim, dilanjutkan dengan fraksionasi dengan metode *salting out*, dan dialisis. Enzim hasil pemurnian kemudian diuji kestabilannya, ditentukan pH optimum, serta dilakukan uji inhibisi menggunakan quersetin.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Membandingkan aktifitas enzim  $\alpha$ -glukosidase yang terdapat dalam gabah dan beras (*Oryza sativa*) varietas Ciherang.
2. Mengekstraksi dan memfraksinasi enzim menggunakan metode *salting out* dengan garam ammonium sulfat dengan peningkatan tingkat kejenuhan dan dilanjutkan dengan dialisis.
3. Menguji aktifitas inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan quersetin.



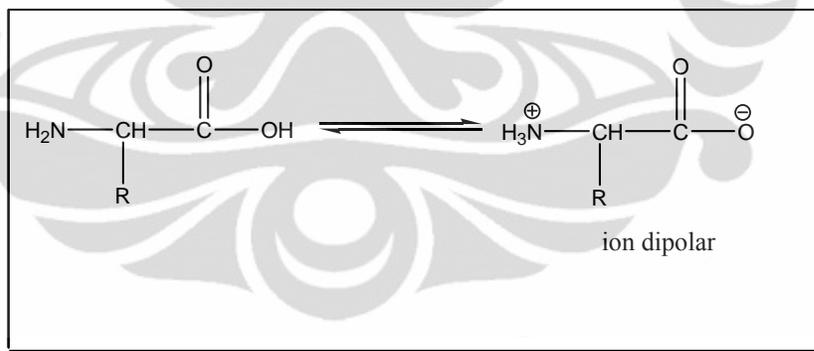
## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Enzim<sup>6,7</sup>

Protein yang khusus memiliki kemampuan untuk mengkatalisis hampir semua reaksi kimia pada sistem biologis disebut sebagai enzim. Kemampuan aktivitas katalisis enzim bergantung pada konformasi proteinnya, yakni struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener.

#### 2.1.1 Protein

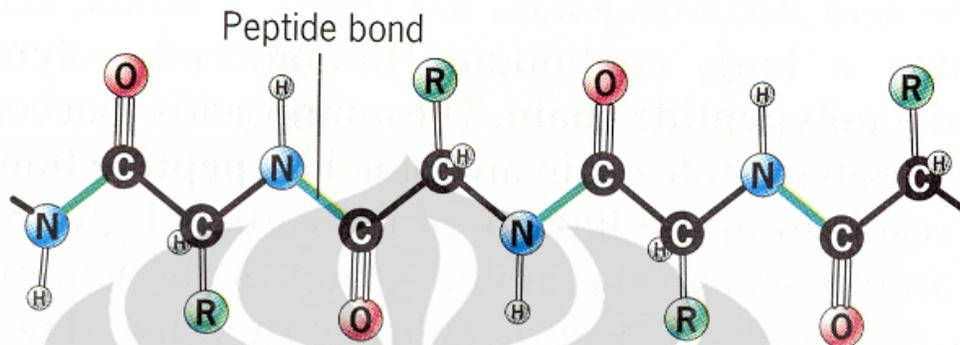
Protein adalah suatu polipeptida dengan berat molekul di atas 10.000 sedangkan polipeptida sendiri adalah suatu biopolimer yang tersusun dari unit berulang asam-asam amino yang tergabung melalui suatu ikatan amida yang disebut ikatan peptida. Struktur primer protein adalah semua ikatan kovalen yang menyusun protein yaitu deretan asam-asam amino yang bergabung melalui ikatan peptida termasuk ikatan disulfida dalam suatu rantai polipeptida.



Gambar 2.1 Struktur umum asam amino



mengumpul di bagian interior protein untuk menjauhi air. Sebaliknya gugus polar umumnya membentuk ikatan hidrogen dengan air sehingga dapat larut.



**Gambar 2.3 Polipeptida**

sumber:notesforpakistan.blogspot.com

### 2.1.2 Definisi Enzim

Pada tahun 1897 Eduard Buchner menemukan bahwa ekstrak khamir dapat memfermentasi gula menjadi alkohol, menunjukkan bahwa fermentasi berlangsung oleh molekul yang masih berfungsi walaupun telah dipisahkan dari sel hidup. Kemudian Frederick W. Kühne menamai molekul tersebut sebagai enzim, yang berasal dari bahasa Yunani *ενζυμη* (baca:enzim).

Enzim adalah katalis biologis, yaitu mempercepat reaksi kimia di dalam sel hidup tanpa dirinya sendiri mengalami perubahan pada akhirnya. Reaktan dari suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim disebut substrat dan tiap enzim memiliki sifat yang cukup spesifik, dimana bereaksi dengan substrat tertentu atau menghasilkan produk tertentu dari suatu substrat.

Beberapa enzim tidak memerlukan gugus kimia lain selain residu asam amino untuk aktivitasnya. Sedangkan beberapa yang lain membutuhkan tambahan komponen kimia yang disebut kofaktor. Kofaktor dapat berupa ion logam, atau suatu molekul organik kompleks yang disebut koenzim. Kofaktor yang terikat sangat kuat bahkan secara kovalen dengan protein suatu enzim disebut gugus prostetik. Suatu enzim yang lengkap dan aktif secara katalitik

beserta dengan kofaktor yang terikat disebut holoenzim. Sedangkan bagian proteinnya disebut apoenzim atau apoprotein.

### 2.1.3 Pengolongan Enzim

Banyak enzim telah dinamai dengan akhiran –ase kepada nama substrat yang dikatalisis atau pada kata yang menunjukkan aktivitasnya. Selain itu ada pula yang dinamai oleh penemunya. Hal tersebut berakibat enzim yang sama memiliki dua nama atau lebih, atau dua enzim yang berbeda memiliki nama yang sama. Untuk menghindari hal tersebut, sejalan dengan semakin bertambahnya enzim yang ditemukan, diperlukan suatu tata nama untuk menggolongkan enzim.

*Enzyme Commission* menggolongkan enzim ke dalam enam golongan, dengan masing-masing memiliki subgolongan, sesuai dengan jenis reaksi yang dikatalisis. Setiap enzim diberikan 4 bagian nomor golongan dan nama sistematik yang menunjukkan reaksi yang dikatalisisnya.

**Tabel 2.1 Golongan enzim dan reaksi yang dikatalisisnya**

Golongan	Jenis Enzim	Tipe Reaksi
1	Oksidoreduktase	Reduksi-oksidasi
2	Transferase	Transfer atom atau gugus
3	Hidrolase	Hidrolisis
4	Liase	Adisi atau pembentukan rangkap
5	Isomerase	Isomerasi
6	Ligase	Kondensasi

### 2.1.4 Inhibisi Enzim

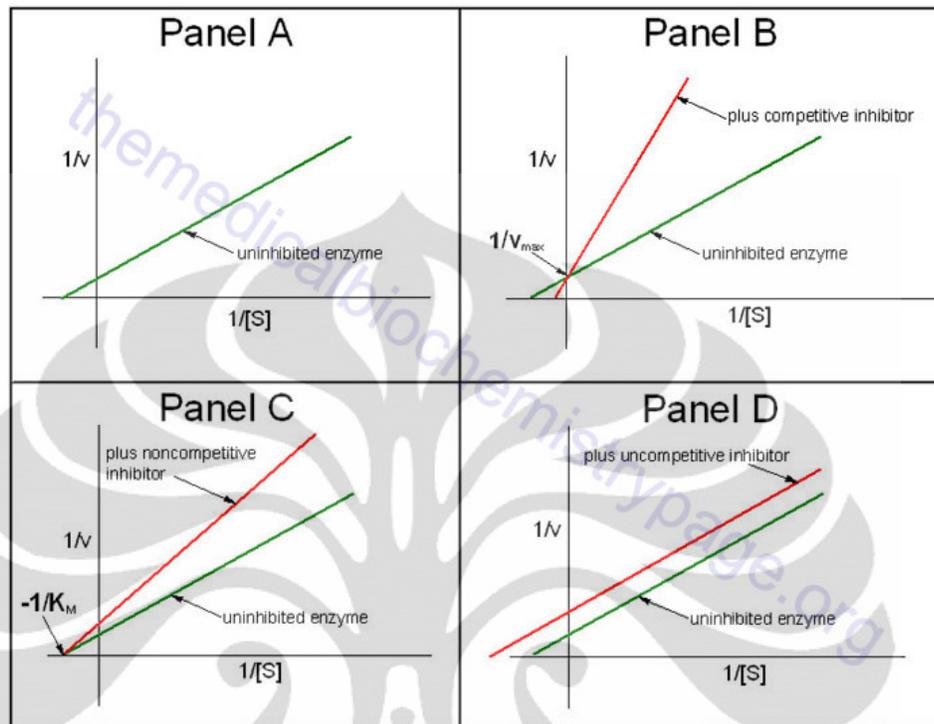
Inhibitor adalah zat yang memiliki kecenderungan mengurangi laju dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Inhibitor enzim tergolong ke dalam dua kelas yaitu yang secara tak dapat balik menghalangi aktivasi enzim dan yang dapat dibalik.

Inhibitor yang dapat balik dapat dibagi lagi menjadi tiga kategori yaitu inhibitor kompetitif, nonkompetitif, dan inhibitor ketiga unkompetitif yang jarang ditemui<sup>8</sup>. Tabel dibawah meringkaskan ciri dari ketiga inhibitor

**Tabel 2.2 Tiga jenis inhibisi**

Tipe Inhibitor	Situs ikatan pada enzim	Efek kinetik
Kompetitif	Secara khusus pada situs katalitik enzim, berkompetisi dengan substrat.	V <sub>max</sub> tidak berubah, K <sub>m</sub> meningkat
Nonkompetitif	Mengikat enzim atau kompleks enzim substrat tidak pada sisi katalitik enzim. Ikatan substrat tidak berubah namun tidak dapat membentuk produk.	K <sub>m</sub> tidak berubah, V <sub>max</sub> menurun sesuai dengan konsentrasi inhibitor
Unkompetitif	Hanya berikatan pada kompleks enzim substrat. Ikatan enzim dengan substrat merubah enzim sehingga memunculkan situs inhibitor.	V <sub>max</sub> dan K <sub>m</sub> menurun

Berikut adalah penggambaran ketiga jenis inhibisi oleh plot Lineweaver-Burk



**Gambar 2.4 Jenis inhibisi dengan plot Lineweaver-Burk**

Sumber: [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org)

### 2.1.5 Enzim $\alpha$ -Glukosidase<sup>9</sup>

Enzim  $\alpha$ -Glukosidase (EC 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glukosida glukohidrolase) adalah enzim yang mengkatalisa penganalisaan  $\alpha$ -D-glukosa dari ujung nonpereduksi oligo- dan polisakarida. Enzim ini tersebar pada mamalia, tanaman, dan mikroorganisme. Sebagai sumber enzim yang berasal dari sereal seperti padi, jelai (*barley*), millet, jagung, *buckwheat* juga sumber lain seperti bit dan bayam telah berhasil didapat dan dimurnikan. Tanaman mengandung enzim  $\alpha$ -glukosidase yang dapat menghidrolisis substrat polisakarida (yaitu pati larut).

Enzim  $\alpha$ -Glukosidase yang berasal dari tanaman adalah enzim hidrolitik yang terlibat dalam degradasi pati simpanan pada biji yang berkecambah, dan secara umum dianggap sebagai enzim yang merubah oligosakarida yang terlebih dahulu dihasilkan oleh  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, dan *debranching enzyme* menjadi

glukosa. Namun, enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari tanaman dilaporkan dapat menghidrolisis pati terlarut secara efektif serta dapat mendegradasi butiran pati dalam bentuk polisakarida tak larut pada biji tanaman. Selain itu enzim ini beraksi secara sinergis dengan  $\alpha$ -amilase tanaman dalam mendegradasi butiran pati.

### 2.2.1 Isolasi Enzim<sup>10,11</sup>

Isolasi enzim sangat erat berhubungan dengan isolasi protein. Dasar dari pemisahan ini adalah memisahkan protein dari semua protein lain yang tidak diperlukan yang semuanya berada pada material yang sama.

### 2.2.2 Ekstraksi

Bahan baku yang memiliki aktivitas enzim diperlakukan untuk memindahkan protein ke dalam bentuk terlarut sehingga dapat dimanipulasi. Bila material awal merupakan sel hewan atau tanaman maka perlu dilakukan homogenisasi melalui penghancuran sel dan melepaskan enzim ke dalam larutan dengan kuat ion yang mirip secara fisiologis dan tekanan osmotik yang lebih rendah. Kemudian untuk mendapatkan ekstrak yang jernih kepada homogenat yang didapat dilakukan filtrasi atau sentrifugasi.

Enzim-enzim yang terdapat dalam sitoplasma dapat diekstrak dengan penghancuran membran plasma sel sehingga enzim dapat keluar ke dalam medium ekstraksi. Namun enzim terlarut dalam organel atau sel eukariotik membutuhkan penghancuran membran sel yang lebih keras. Dari tepung sereal enzim dapat diekstrak dengan hanya menempatkan dalam medium cair dan pengadukan.

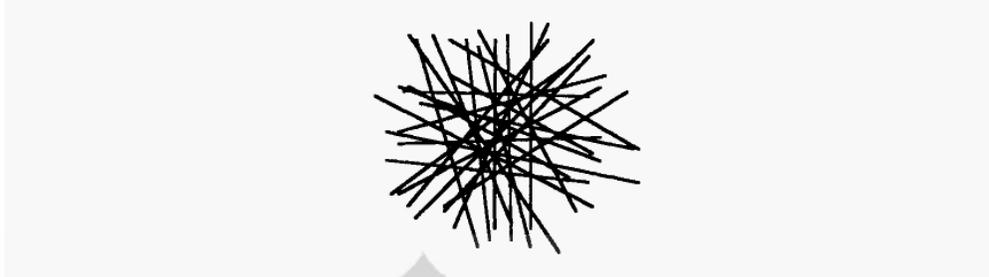
### 2.2.3 Fraksinasi dengan *Salting Out*

Metode yang paling banyak dipakai adalah dengan menggunakan konsentrasi garam yang tinggi, biasa disebut *salting-out*. Garam yang paling optimum adalah garam yang meningkatkan hidrasi daerah polar dan dehidrasi daerah non-polar pada protein tanpa adanya interaksi langsung. Anion yang masuk ke dalam kategori ini adalah anion polivalen seperti sulfat yang bersifat *kosmotropes*, cenderung menstabilkan struktur protein. Untuk kation dipilih yang tidak memiliki kemungkinan untuk mengadakan kompleks dengan protein, maka semua ion metal polivalen tidak dapat digunakan. Garam yang memenuhi semua persyaratan ini dan paling sering digunakan adalah amonium sulfat (kecuali pada pH tinggi). Paling baik digunakan pada daerah pH 6-7,5 dan memiliki sedikit kemampuan mengasamkan sehingga diperlukan buffer.

Kelebihan penggunaan garam konsentrasi tinggi ini dibandingkan metode lain adalah kestabilan protein yang terjadi serta mencegah proteolisis dan aksi bakteri. Konsentrasi garam yang ditambahkan ditingkatkan secara bertahap dengan tujuan mendapatkan endapan protein yang diinginkan dan membuang endapan protein yang tidak diinginkan. Kemudian endapan tersebut dilarutkan kembali.

### 2.2.3 Dialisis

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. Pori berasal dari distribusi acak serat pembentuk membran. Molekul dengan jari-jari molekul yang lebih besar dari ukuran pori akan tertahan seluruhnya sedangkan yang berjari-jari lebih kecil akan lolos. Teknik ini biasa dipakai untuk menghilangkan kadar garam larutan protein atau mengganti buffer.



**Gambar 2.5 Distribusi acak serat selulosa pada membran dialisis**  
(Dennison, 2002)



## BAB 3

### BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini berlangsung selama 6 bulan, mulai dari bulan Januari sampai Juni 2011, bertempat di Laboratorium Biokimia Departemen Kimia FMIPA UI, Depok dan Laboratorium Bahan Alam Pusat Penelitian Kimia-LIPI, Kawasan PUSPIPTEK Serpong.

#### 3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis, neraca analitik, mikropipet, pipet volumetri, penangas air, termometer, mesin blender, *magnetic stirrer*, sentrifuge Kubota 6800, kantong selofan untuk dialisis, pHmeter, kertas pH indikator dan alat-alat gelas seperti tabung reaksi, erlenmeyer, batang pengaduk, *beaker glass*, gelas ukur.

#### 3.3 Bahan

##### 3.3.1 Sumber Enzim

Sumber enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah gabah dan beras (*Oryza sativa*) varietas Ciherang yang didapat dari persawahan Desa Kuwayuhan, Kabupaten Kebumen Jawa Tengah. Gabah dan beras yang didapat, disimpan di lemari pendingin.

##### 3.3.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , air bebas mineral,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNa-Tartrat}$ , pereaksi Folin-Ciocalteu, Bovin Serum Albumin, *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG), dimetilsulfoksida (DMSO), quersetin dan  $\text{NaCl}$ .

### **3.4 Prosedur Kerja**

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

Gabah dan beras dihancurkan dengan alat blender hingga menjadi tepung gabah dan tepung beras. Pada penelitian ini, selain menggunakan tepung gabah dan tepung beras sebagai sumber enzim, juga digunakan tepung gabah aseton. Tepung gabah aseton diperoleh dengan cara menghancurkan gabah dengan penambahan aseton dingin (1:1) dengan alat blender. Residu yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan sampai menjadi tepung aseton gabah. Tepung gabah (TG), tepung beras (TB) dan tepung aseton gabah (TAG) yang telah didapat selanjutnya digunakan sebagai sumber enzim.

#### **3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase**

Tepung gabah, tepung beras dan tepung gabah aseton, masing-masing sebanyak 20 gram, secara terpisah dimasukkan ke dalam 50 mL larutan buffer fosfat dingin 67 mM pada pH 7. Selanjutnya, campuran tersebut diaduk selama satu jam menggunakan *magnetic stirrer* yang dilengkapi dengan *ice salt batch*, kemudian direndam semalaman dalam lemari pendingin. Homogenat yang didapat, disaring dengan kain kasa kemudian filtratnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Selanjutnya, terhadap supernatan yang diperoleh yang merupakan ekstrak kasar enzim dilakukan uji aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase.

#### **3.4.3 Variasi pH Buffer pada Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase dari Tepung Gabah**

Untuk melihat pengaruh pH pada buffer yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kasar enzim dari tepung gabah dilakukan variasi pH, yaitu: pH 6,0; 7,0; 7,5; 8,0 dan 8,5. Tepung gabah sebanyak 20 gram dicampurkan ke dalam 50 mL buffer fosfat dingin 67 mM pada masing-masing pH. Campuran kemudian diberi perlakuan yang sama seperti cara kerja pada butir 3.4.2.

### 3.4.4 Metode Uji Aktivitas Enzim $\alpha$ -Glukosidase<sup>12</sup>

Aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase diukur dengan menggunakan prosedur *Sigma's quality control* yang dimodifikasi dengan menggunakan *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) sebagai substrat.

Uji aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan cara memasukkan 5 mL buffer fosfat 67 mM pH 6,8 dan 0,2 mL larutan enzim ke dalam tabung reaksi, kemudian dicampur dan disetimbangkan hingga suhu 37°C. Selanjutnya, ke dalam campuran ditambahkan 0,5 mL PNPG 10 mM dan diinkubasi pada 37°C selama 20 menit. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM. Larutan kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 400 nm. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama, dengan mengganti larutan enzim dengan air bebas mineral. Aktivitas enzim didapat dengan rumus berikut:

$$\text{Unit/ml} = \frac{(A_{400} \text{ Uji} - A_{400} \text{ Blanko}) (10) (5,7)}{(18,3) (20) (2) (0,2)}$$

5,7= volume campuran reaksi

18,3=koefisien ekstingsi milimolar

20=waktu assay

10=volume penentuan kolorimetrik

2=volume campuran reaksi yang dipakai dalam penentuan kolorimetrik

0,2=volume larutan enzim yang digunakan

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 6,8 pada 37°C.

### 3.4.5 Metode Penentuan Kadar Protein

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

Larutan A: 2 gram Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dan 0,4 gram NaOH dalam 100 mL air

Larutan B: 0,25 gram CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dan 0,5 g NaK-Tartrat atau Na-Sitrat dalam 50 ml air

Larutan C: Ke dalam 50 mL Larutan A tambahkan 1 mL larutan B

Larutan D: Ke dalam 10 mL Folin 2 N tambahkan 10 mL air

Sebanyak 0,5 mL larutan enzim dicampur dengan 5 mL pereaksi C, lalu diaduk hingga merata dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam campuran tersebut ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, lalu diaduk kembali hingga merata dan dibiarkan selama 30 menit.

Serapan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm. Sebagai larutan standar digunakan BSA dengan variasi konsentrasi 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 dan 1,00 mg/mL. Pada pengukuran blanko, larutan enzim diganti dengan air bebas mineral.

#### **3.4.6 Isolasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Metode *Salting Out***

Dari hasil uji aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase terhadap ekstrak kasar enzim dari sumber enzim TB, TG dan TAG, yang memiliki aktivitas tertinggi adalah TG. Selanjutnya, terhadap ekstrak kasar enzim dari TG, dilakukan tahapan isolasi lebih lanjut dengan menggunakan NaCl dan pemurnian dengan ammonium sulfat.

Sebanyak 80 gram tepung gabah dicampurkan ke dalam 200 mL larutan buffer fosfat 67 mM pH 8 yang mengandung 0,5 M NaCl. Selanjutnya, untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim, campuran diberi perlakuan yang sama dengan prosedur kerja pada butir 3.4.2. Ekstrak kasar enzim yang diperoleh, kemudian difraksinasi dengan penambahan garam ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang ditingkatkan secara bertahap.

Ekstrak kasar enzim ditempatkan pada wadah yang dilengkapi dengan pengocok *magnetic stirrer* dalam keadaan dingin menggunakan *ice salt batch*. Garam ammonium sulfat untuk tingkat kejenuhan 0-20% disiapkan dan 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 selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Endapan yang didapat dipisahkan dari supernatan dan dilarutkan dalam buffer fosfat dingin pH 7 secukupnya. Endapan ini untuk selanjutnya disebut fraksi I. Supernatan difraksinasi lebih jauh dengan ditambahkan garam ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-50% dan 50-70% untuk

mendapatkan endapan fraksi 20-50% yang selanjutnya disebut fraksi II dan endapan fraksi 50-70% disebut fraksi III. Ekstrak kasar, fraksi I,II, III dan supernatan selanjutnya diuji aktivitas dan kadar proteinnya sesuai dengan prosedur kerja 3.4.4 dan 3.4.5.

### **3.4.7 Uji Kestabilan Enzim Terhadap Pengaruh Penyimpanan**

Enzim hasil fraksinasi dengan dengan aktivitas tertinggi disimpan dalam lemari pendingin (4°C). Selanjutnya, untuk mengetahui tingkat kestabilan enzim, maka terhadap fraksi enzim yang memiliki aktivitas tertinggi, diuji aktivitasnya setiap 1 minggu selama 2 minggu. Uji aktivitas enzim dilakukan menurut prosedur kerja pada butir 3.4.4.

### **3.4.8 Dialisis dan Penentuan pH Optimum Enzim**

Fraksi dengan aktivitas spesifik paling tinggi selanjutnya didialisis. Larutan enzim dimasukkan ke dalam membran selofan diikat pada kedua ujung kantung. Kemudian membran berisi enzim direndam dalam larutan buffer dengan konsentrasi lebih encer disertai pengadukan. Proses ini dilakukan selama 9 jam dan suhu sistem dijaga 4°C. Selama dialisis dilakukan pergantian buffer selama 3 jam sekali.

Sebelum digunakan kantung dialisis terlebih dahulu disiapkan membran selofan dengan ukuran yang sesuai, lalu direndam dalam air bebas mineral selama 2 jam. Kemudian membran selofan direbus dengan air bebas mineral pada suhu 70°C dan direndam dalam larutan EDTA 0,001 M yang mengandung 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> selama 1 jam. Terakhir kantung dibilas dengan air bebas mineral sampai bersih dan dipanaskan kembali hingga 70°C.

Enzim yang telah melalui tahap dialisis kemudian ditentukan pH optimumnya. Ke dalam 6 tabung reaksi yang masing-masing berisi 5 mL larutan buffer dengan pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 dan 10,0 dilakukan uji sesuai cara kerja butir 3.4.4.

### 3.4.9 Uji Aktivitas Inhibisi Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Quersetin<sup>13,14</sup>

Larutan enzim, sebelum digunakan diencerkan 25 kali dengan buffer fosfat 67 mM pH 6,8. Campuran reaksi terdiri dari 10  $\mu$ L larutan standar quersetin dalam DMSO. 490  $\mu$ L buffer fosfat 67 mM pH 6 dan 250 $\mu$ L PNPG 10 mM sebagai substrat. Setelah campuran reaksi dinkubasi pada 37°C selama 5 menit, 250  $\mu$ L larutan enzim ditambahkan dan diinkubasi hingga 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM. Kemudian serapan campuran dibaca pada panjang gelombang 400 nm. Sistem reaksi lengkap untuk satu sampel dengan volume total 2 mL dapat dilihat pada tabel 3.1

**Tabel Sistem reaksi enzim untuk satu sampel**

	Blanko( $\mu$ L)	Kontrol( $\mu$ L)	S <sub>0</sub> ( $\mu$ L)	S <sub>1</sub> ( $\mu$ L)
Quersetin	-	-	10	10
DMSO	10	10	-	-
Buffer	490	490	490	490
Substrat	250	250	250	250
Inkubasi 37°C 5 menit				
Buffer	250	-	250	-
Enzim	-	250	-	250
Inkubasi 37°C 15 menit				
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1000	1000	1000	1000

Larutan standar quersetin dibuat dengan variasi konsentrasi 0,1%; 0,05% dan 0,025%. Persen inhibisi didapat dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}}) - (A_{s1} - A_{s0})}{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

dimana:

As1= serapan dari sistem yang mengandung quersetin dan enzim

As0= serapan dari sistem yang mengandung quersetin tanpa enzim

Akontrol= serapan dari sistem yang mengandung enzim tanpa quersetin

Ablanko= serapan dari sistem tanpa enzim dan tanpa quersetin

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi Sampel dan Pemilihan Sumber Enzim

Pemilihan sumber enzim merupakan tahap awal yang dilakukan pada isolasi enzim. Pada penelitian ini digunakan gabah dan beras (*oryza sativa*) varietas Ciherang sebagai sumber enzim. Pemilihan sumber ini didasarkan pada ketersediaannya di pasaran sehingga memberikan kemudahan untuk mendapatkannya dan telah banyak penelitian isolasi enzim  $\alpha$ -glukosidase yang menggunakan beras sebagai sumber enzim.

Enzim  $\alpha$ -glukosidase (EC 3.2.1.20) berperan pada degradasi pati dan berfungsi pada perkecambahan biji dengan cara menghidrolisis oligosakarida yang dihasilkan oleh  $\alpha$ - and  $\beta$ -amilase. Pada beras enzim  $\alpha$ -glukosidase terdapat pada dinding sel, terikat pada membran bersama-sama dengan substrat karbohidratnya, dan enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat tersebut<sup>15</sup>. Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari tanaman juga dilaporkan dapat menghidrolisis pati terlarut secara efektif serta dapat mendegradasi butiran pati dalam bentuk polisakarida tak larut pada biji tanaman. Enzim  $\alpha$ -glukosidase bekerja secara sinergis dengan  $\alpha$ -amilase tanaman dalam mendegradasi butiran pati<sup>9</sup>.

Gabah dan beras terlebih dahulu dihaluskan dengan mesin blender untuk mendapatkan tepung yang kering. Proses penghalusan ini bertujuan untuk memecah sel sehingga nantinya enzim yang tersimpan dapat keluar ke dalam medium cair. Pada gabah, selain dipreparasi sebagai tepung kering juga dipreparasi sebagai tepung aseton. Tujuan pembuatan tepung aseton ini adalah untuk memutuskan enzim yang terikat dengan membran karena pada saat pembentukan tepung aseton beberapa interaksi lipid dengan protein terputus sehingga enzim dapat terekstrak<sup>7</sup>.

#### 4.2 Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase

Pada pembuatan ekstrak kasar enzim digunakan tepung gabah (TG), tepung beras (TB) dan tepung aseton gabah (TAG) sebagai sumber enzim. TG, TB dan TAG masing-masing sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam 50 mL buffer fosfat 67 mM pada pH 7. Jumlah volume buffer yang dipakai untuk mengekstrak sedikitnya adalah dua kali bahan awal. Semakin banyak volume buffer yang digunakan maka semakin banyak juga enzim yang akan terekstrak, tetapi ekstrak kasar yang diperoleh menjadi lebih encer<sup>10</sup>. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan perbandingan 1 : 2,5, agar enzim dapat terekstrak dan larutan ekstraknya tidak terlalu encer sehingga tidak sulit untuk isolasinya.

Buffer yang digunakan adalah buffer fosfat, 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 perubahan pH secara drastis, serta stabil selama beberapa minggu pada suhu 4°C<sup>16</sup>. Penggunaan konsentrasi buffer yang rendah bertujuan untuk menghasilkan larutan dengan tekanan osmotik rendah dan untuk mencegah penurunan aktivitas katalitik<sup>17</sup>. Penggunaan larutan dengan tekanan osmotik rendah dapat membantu peristiwa lisisnya sel dan organel, sehingga dapat meningkatkan terekstraknya enzim dari sumber enzim ke dalam larutan buffer<sup>11</sup>. Selain itu, penggunaan buffer dengan kuat ion yang tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga dipilih konsentrasi yang rendah.

**Tabel 4.1 Aktivitas enzim dari ketiga ekstrak pada pH 7**

Bahan Baku	mU/mL
Tepung Beras	1,55
Tepung Gabah	23,75
Tepung Aseton Gabah	18,68

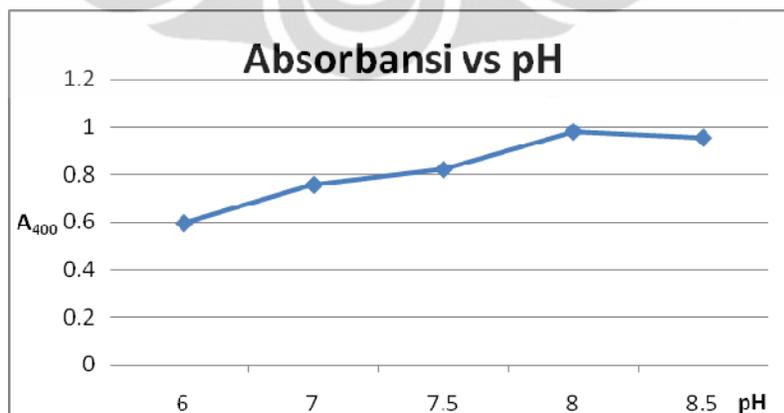
Pada Tabel 4.1 dapat dilihat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase dari ekstrak kasar TG (23,75 mU/mL) lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar TAG (18,68 mU/mL) dan TB (1,55 mU/mL). Lebih tingginya aktivitas ekstrak kasar TG kemungkinan disebabkan karena enzim  $\alpha$ -glukosidase berperan dalam penyediaan makanan pada tahap perkecambahan sehingga enzim ini juga terdapat dalam kulit ari dari biji padi tersebut<sup>9</sup>. Ekstrak kasar TAG juga memiliki nilai aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan TG. Pada penelitian selanjutnya, sebagai sumber enzim digunakan TG.

#### 4.3 Variasi pH Buffer pada Ekstraksi Enzim Kasar dari TG

Setelah bahan baku untuk sumber enzim ditetapkan maka selanjutnya dicari kondisi pH dimana enzim menghasilkan aktivitas yang tinggi. Nilai pH yang digunakan untuk perendaman sampel adalah 6; 7; 7,5; 8 dan 8,5. kedelapan nilai tersebut dipilih karena nilai tersebut berada pada sekitar rentang  $\pm 1$  dari pKa<sub>2</sub> dari buffer fosfat yang digunakan yaitu 7,2.

**Tabel 4.2 Data aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase pada beberapa nilai pH**

pH	A <sub>400</sub>	U/mL
6	0,596	0,232
7	0,757	0,295
7,5	0,821	0,319
8	0,980	0,381
8,5	0,954	0,371



**Grafik 4.1** Aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase terhadap nilai pH

Pada gambar 4.1 dapat dilihat bahwa pH optimal untuk mengekstraksi enzim adalah pada pH 8 yaitu 0,381 U/mL . Hal ini mungkin dikarenakan dibutuhkan situasi yang sedikit basa untuk memecah kulit ari gabah sehingga enzim dapat terekstrak dalam larutan. Pada pH 8,5 nilai serapan tetap tinggi yaitu sebesar 0,371 U/mL, namun mengalami sedikit penurunan. Hal ini dikarenakan pada pH yang lebih basa tidak cocok dengan situasi fisiologis enzim.

#### **4.4 Isolasi Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Metode *Salting Out***

Pada penelitian tahap berikutnya, dilakukan isolasi enzim kasar dari TG pada pH buffer 8. Ekstrak kasar enzim yang diperoleh, selanjutnya dimurnikan dengan fraksionasi bertingkat menggunakan garam amonium sulfat. Garam amonium sulfat digunakan untuk memurnikan enzim karena konsentrasi garam yang tinggi terjadi interaksi yang kuat antara garam amonium sulfat yang higroskopis dengan air. Hal ini menyebabkan berkurangnya interaksi antara protein dengan air sehingga protein mengalami presipitasi dari larutan dan protein menjadi terpisah dari mono dan oligosakarida, nukleotida, asam amino bebas, sedangkan protein lainnya tetap berada dalam larutan<sup>7</sup>.

Pada percobaan ini dilakukan fraksionasi bertingkat dengan garam amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20% (fraksi I), 20-50% (fraksi II) dan 50-70% (fraksi III). Selanjutnya, terhadap endapan dan supernatan dari setiap fraksi tingkat kejenuhan, dilakukan uji aktivitas enzim dan ditentukan kadar proteinnya untuk menentukan aktivitas dan aktivitas spesifik enzim.

**Tabel 4.3 Data pemurnian enzim**

Tahapan	Aktivitas (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (mU/mg)	Faktor Kemurnian (Lipat)
Ekstrak Kasar	0,011	8,125	1,35	-
Fraksi I	0,015	3,439	4,36	3,2
Fraksi II	0,341	17,91	19,05	14,1
Fraksi III	0,182	15,84	11,49	8,5
70%-supernatan	---	7,01	---	-

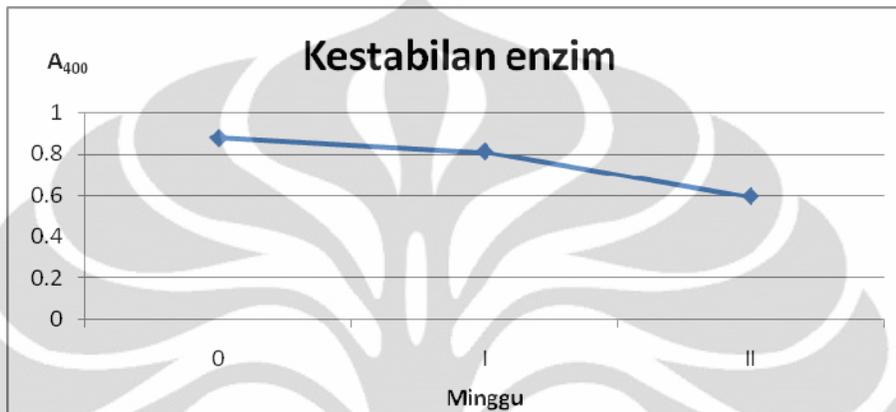
Pada tabel 4.3 dapat dilihat bahwa aktivitas spesifik terbesar adalah pada endapan fraksi II (20-50%) diikuti dengan endapan pada fraksi III(50-70%) yaitu 19,05 mU/mg dan 11,49 mU.mg dengan faktor kemurnian secara berurutan 14,1 kali lipat dan 8,5 kali lipat. Pada endapan fraksi I (0-20%) aktivitas spesifik hanya meningkat sedikit. Hal ini karena endapan fraksi dengan tingkat kejenuhan sampai dengan 25% biasanya adalah materi partikulat berupa ribosoma, fragmen membran, agregat protein besar, dan bahkan protein yang terdenaturasi<sup>17</sup>. Pada supernatan aktivitas enzim sudah tidak terdeteksi lagi mengindikasikan bahwa semua enzim  $\alpha$ -glukosidase telah berhasil diendapkan dan dipisahkan dari larutan.

#### 4.5 Uji Stabilitas Enzim terhadap Pengaruh Penyimpanan

Uji stabilitas enzim dilakukan terhadap fraksi II yang disimpan dalam lemari pendingin (4°C).Pengujian dilakukan setiap satu minggu sekali selama 2 minggu. Data hasil pengukuran aktivitas pada uji stabilitas enzim dapat dilihat pada tabel 4.4.

**Tabel 4.4 Data aktivitas enzim fraksi II pada waktu penyimpanan**

waktu	A <sub>400</sub>	U/mL
Minggu kenol	0,87636	0,341
Minggu pertama	0,80987	0,315
Minggu kedua	0,59381	0,231

**Grafik 4.2** Pengaruh waktu penyimpanan terhadap kestabilan enzim fraksi II

Pada gambar 4.2 terlihat adanya penurunan aktivitas enzim selama penyimpanan dari minggu kenol sampai minggu kedua. Aktivitas enzim pada penyimpanan minggu kenol 0,341 U/mL dan minggu pertama 0,315 U/mL hanya mengalami sedikit penurunan, sedangkan pada minggu kedua 0,231 U/mL terjadi penurunan aktivitas yang lebih tinggi.

#### 4.6 Dialisis dan Penentuan pH Optimum Enzim

Pada percobaan selanjutnya, terhadap endapan fraksi II dan III yang merupakan hasil fraksinasi dengan garam amonium sulfat yang memiliki aktivitas tertinggi, dilakukan dialisis dengan menggunakan kantung selofan dan ditentukan nilai pH optimumnya. Tujuan dari dialisis adalah untuk menghilangkan kelebihan garam ammonium sulfat yang ditambahkan pada proses fraksinasi. Pada tabel 4.5 dapat dilihat aktivitas enzim pada saat sebelum dan setelah dialisis.

**Tabel 4.5 Data Aktivitas Enzim Sebelum dan Sesudah Dialisis**

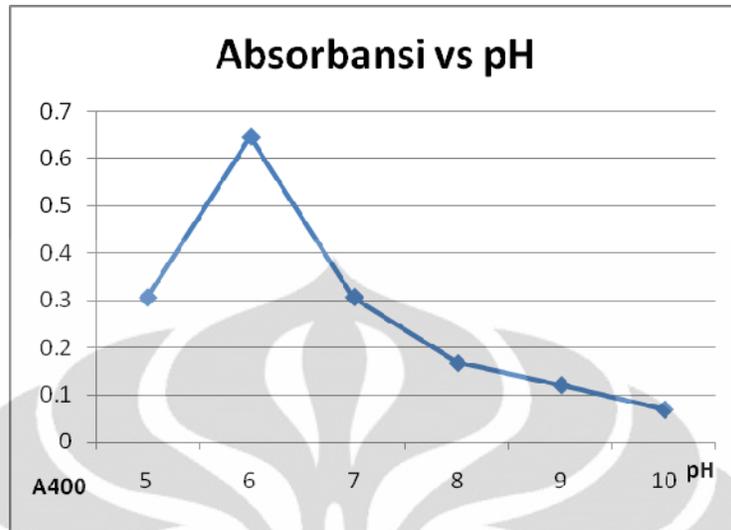
	Aktivitas (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (mU/mL)
Fraksi 20-70% sebelum dialisis	0,468	21,543	21,75
Fraksi 20-70% setelah dialisis	0,296	6,55	45,16

Dari data pada tabel 4.5 terlihat bahwa setelah dialisis aktivitas (U/mL) mengalami penurunan. Hal ini dikarenakan selama proses dialisis terjadi pengenceran, yang diakibatkan oleh tingginya konsentrasi dalam sampel enzim sehingga terjadi pembengkakan 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 (serta ion-ion) keluar dari sampel melalui membran<sup>10</sup>. Pada akhirnya aktivitas spesifik enzim setelah dialisis secara total mengalami kenaikan dari sebelum dilakukan dialisis.

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 variasi pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10. Pada tabel 4.6 dapat dilihat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase pada berbagai nilai pH buffer.

**Tabel 4.6 Aktivitas enzim hasil dialisis pada berbagai nilai pH**

pH	A400	Unit/mL
5	0,30597	0,119
6	0,64587	0,251
7	0,30669	0,119
8	0,16756	0,065
9	0,12103	0,047
10	0,06938	0,027

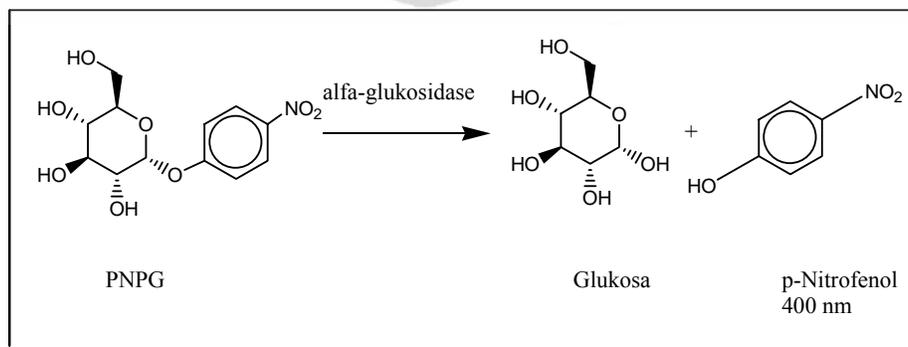


**Grafik 4.3** Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim hasil dialisis

Pada gambar 4.3 dapat dilihat aktivitas enzim pada pH 5 masih rendah, kemudian meningkat mencapai optimum pada pH 6. Aktivitas enzim terus menurun dari pH 7 sampai pH 10.

#### 4.7 Uji Aktivitas Inhibisi Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Quersetin

Uji aktivitas inhibisi  $\alpha$ -glukosidase dilakukan untuk mengetahui aktivitas antihiperlikemik dari sampel yang berfungsi sebagai inhibitor. Pada uji ini enzim  $\alpha$ -glukosidase akan menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) menjadi *p*-nitrofenol yang berwarna kuning dan glukosa dengan reaksi sebagai berikut:



**Gambar 4.1** Reaksi enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan substrat PNPG

Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil absorbansi p-nitrofenol yang berwarna kuning<sup>18</sup>. Dengan adanya inhibitor  $\alpha$ -glukosidase maka p-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang yang ditandai oleh berkurangnya intensitas warna kuning.

Pada penelitian ini sebagai inhibitor digunakan quersetin. Quersetin adalah bahan alam yang diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase lebih besar dari pada acarbose, dengan demikian dapat mengontrol kadar gula darah secara lebih efektif. Suhu paling cocok untuk molekul quersetin untuk berikatan dengan  $\alpha$ -glukosidase adalah pada 37°C. Interaksi antara enzim dengan quersetin yang utama adalah interaksi hidrofobik dimana quersetin menyebabkan perubahan polaritas residu asam amino triptofan enzim dari lingkungan yang hidrofilik menjadi hidrofobik. Interaksi secara ikatan hidrogen juga terjadi karena baik quersetin dan protein mengandung banyak gugus hidroksil<sup>19</sup>.

Data absorbansi dan persen inhibisi dari hasil uji inhibisi  $\alpha$ -glukosidase dengan quersetin dapat dilihat pada Tabel 4.7.

**Tabel 4.7** Data serapan dan persen inhibisi  $\alpha$ -glukosidase.

Kadar(%)	Serapan	% Inhibisi
0.025	0,325	1,21
0.05	0,314	4,56
0.1	0,286	13,07
Kontrol-Blanko	0,329	

Dari data pada Tabel 4.7 dapat dilihat bahwa quersetin dapat menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase yang ditandai dengan terjadinya penurunan serapan dibandingkan dengan kontrol (yang telah dikurangi blanko). Contoh perhitungan dapat dilihat pada lampiran 5. Pada kadar 0,1%, quersetin memiliki persen inhibisi tertinggi sebesar 13,07% diikuti kadar 0,05% sebesar 4,56% dan 0,025% sebesar 1,21%.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Dari ketiga sumber enzim yang digunakan yaitu tepung beras, tepung gabah, dan tepung aseton gabah, yang memiliki aktifitas enzim  $\alpha$ -glukosidase tertinggi adalah tepung gabah sebesar 23,75 mU/mL
2. Enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan aktifitas spesifik tertinggi berada pada fraksi ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-50% sebesar 19,05 mU/mg. Hasil dialisis pada fraksi 20-70% menunjukkan aktivitas spesifik 41,16 mU/mg dan pH optimum 6.
3. Quersetin dengan kadar 0,1% memiliki persen inhibisi tertinggi sebesar 13,07%

#### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut dengan metode lain seperti kromatografi kolom.
2. Perlu dilakukan uji karakterisasi lebih lanjut untuk dapat menentukan parameter kinetika enzim.

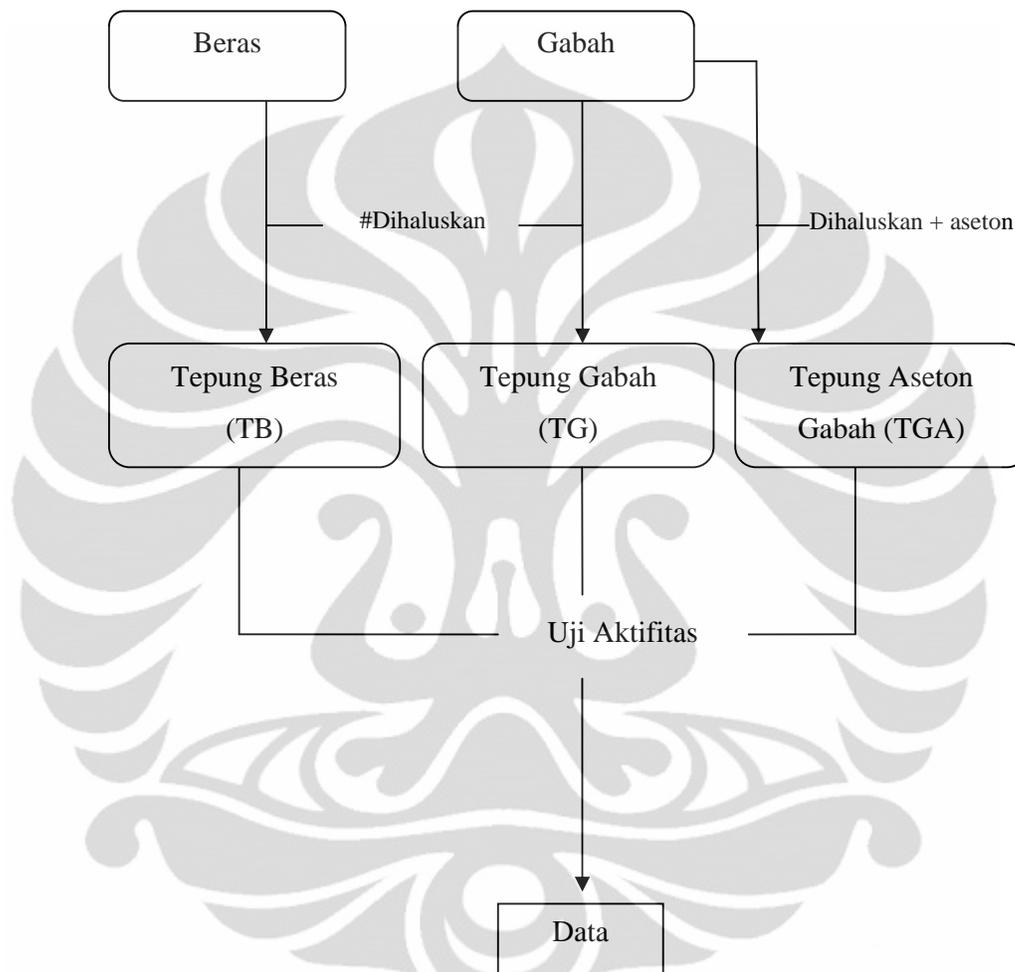
## DAFTAR REFERENSI

1. Bettelheim, F.A. and Jerry M. (1995). Introduction to Organic and Biochemistry. Ed ke-2. United States of America: Saunders College Publishing.
2. Enzymes. <http://www.karinya.com/enzymes.htm>. Tanggal 6 Juni 2011. Pukul 11.20 WIB.
3. Ren, S., Duoduo Xu, Zhi Pan, Yang Gao, Zhenguo Jiang, Qipin Gao. (2011). Two Flavanone Compounds From Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Seeds, One Previously Unreported, and Apparsial of Their  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities. *Food Chemistry* (127): 1760-1763.
4. Kita, A.; Matsui, H.; Somoto, A.; Kimura, A.; Takata, M.. Chiba, S. (1991) Substrate specificity and subsite affinities of crystalline alpha-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* 55 (9), 2327–2335.
5. Kimura, A., Jin-Ha Lee, In-Su Lee, Hee-Seob Lee, Kwan-Hwa Park, Seiya Chiba and Doman Kim. (2004). Two Potent Competitive Inhibitors Discriminating  $\alpha$ -Glucosidase Family I from Family II. *Carbohydrate Research* 339: 1035-1040.
6. Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* 5nd ed. New York : W.H. Freeman and Company.
7. Palmer, T. (1991). *Understanding Enzymes* 3rd ed. West Sussex: Ellis Horwood Limited.
8. Introduction to Enzymes. <http://themedicalbiochemistrypage.org/enzyme-kinetics.html>. Tanggal 12 Juni 2011. Pukul 15:44 WIB.
9. Nakai et al. (2007) Multiple Forms of  $\alpha$ -Glucosidase in Rice Seeds (*Oryza sativa* L., var *Nipponbare*). *Biochimie.*, 89, 49-62.

10. Scopes, R. K. (1994). Protein Purification: Principles and Practice 3rd ed. New York: Springer-Verlag.
11. Dennison, C. (2002). A Guide to Protein Isolation. New York: Kluwer Academic Publisger.
12. Sigma Quality Control Test Procedure: Enzymatic Assay of  $\alpha$ -Glucosidase.  
[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme\\_Assay/g6136enz.Par.0001.File.tmp/g6136enz.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/g6136enz.Par.0001.File.tmp/g6136enz.pdf). Tanggal 12 Juni 2011. Pukul 13:05 WIB.
13. Lee, D.S. and S.H. Lee. (2001). Geniesten, a story isoflavone, is a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. FEBS Lett 501:84-86.
14. Sugiwati, S., L.B.S. Kardono, M. Bintang. (2006).  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity and Hypoglycemic Effect of Phaleria macrocarpa Fruit Pericarp Extracts by Oral Administration to Rats. Journal of Applied Sciences 6(10):2312-2316
15. Yamasaki Y, Haruyoshi K. (1992). Wall-Bound  $\alpha$ -Glucosidase of Suspension-Cultured Sugar-Beet Cells. Phytochemistry. 31:2605-2607
16. Buffer:<http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/buffers.html>  
Tanggal 12 Juni. Pukul 16:16 WIB
17. Deutscher, M. P. (1990). Methods in Enzymology vol 182: Guide to Protein Purification. California: Academic Press.
18. Basuki, T., Indah D. D., Nina, A., LBS Kardono. (2002). Evaluasi Aktifitas Daya Hambat Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Ekstrak Kulit Batang, Daun, Bunga dan Buah Kemuning *Murraya Paniculata* (L.) Jack. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI; Surabaya, 27-28 Maret 2002. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Surabaya. Hlm 314-318.

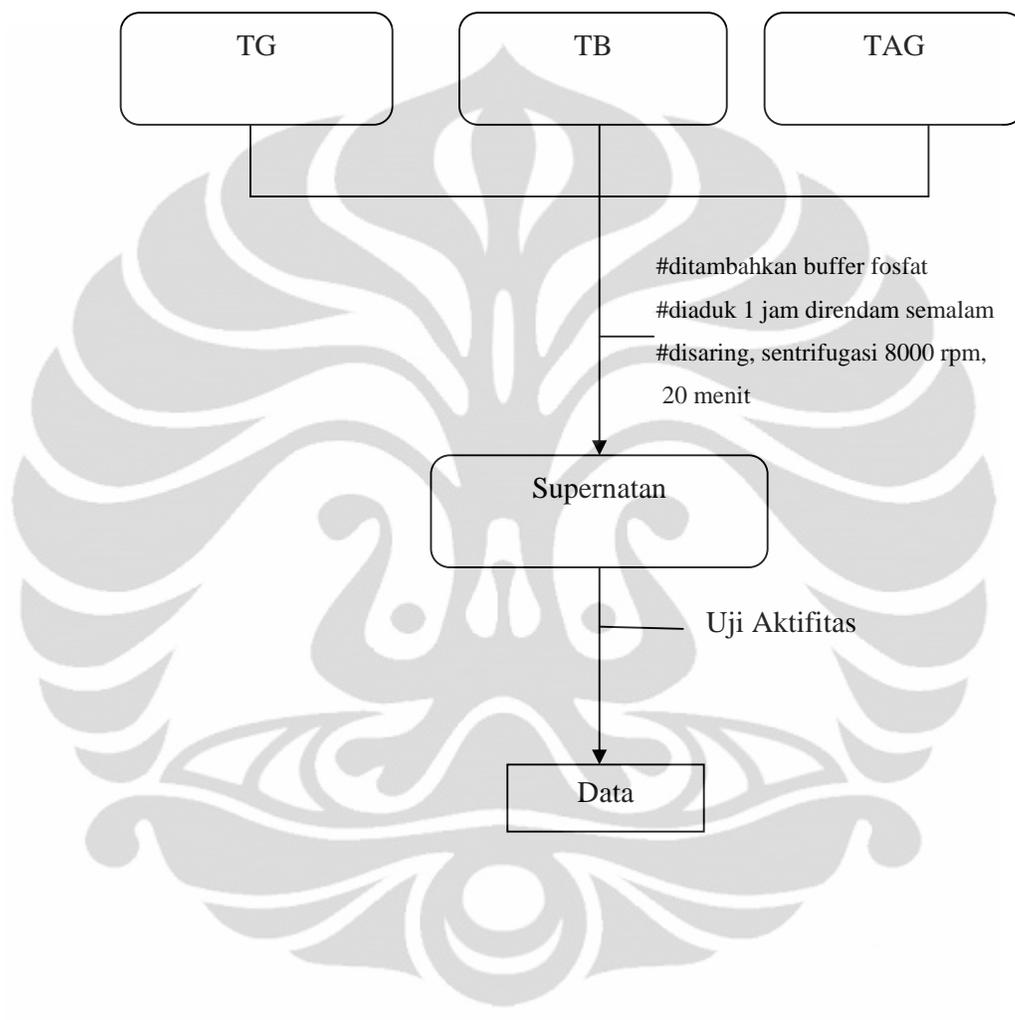
19. Li, Y. Q., Zhou, F. C., Gao, F., Bian, J. S., Shan F. (2009) Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin, and Rutin as Inhibitors of  $\alpha$ -Glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11463-11468.



**LAMPIRAN 1: Skema Prosedur Kerja****Preparasi Sampel sebagai Sumber Enzim**

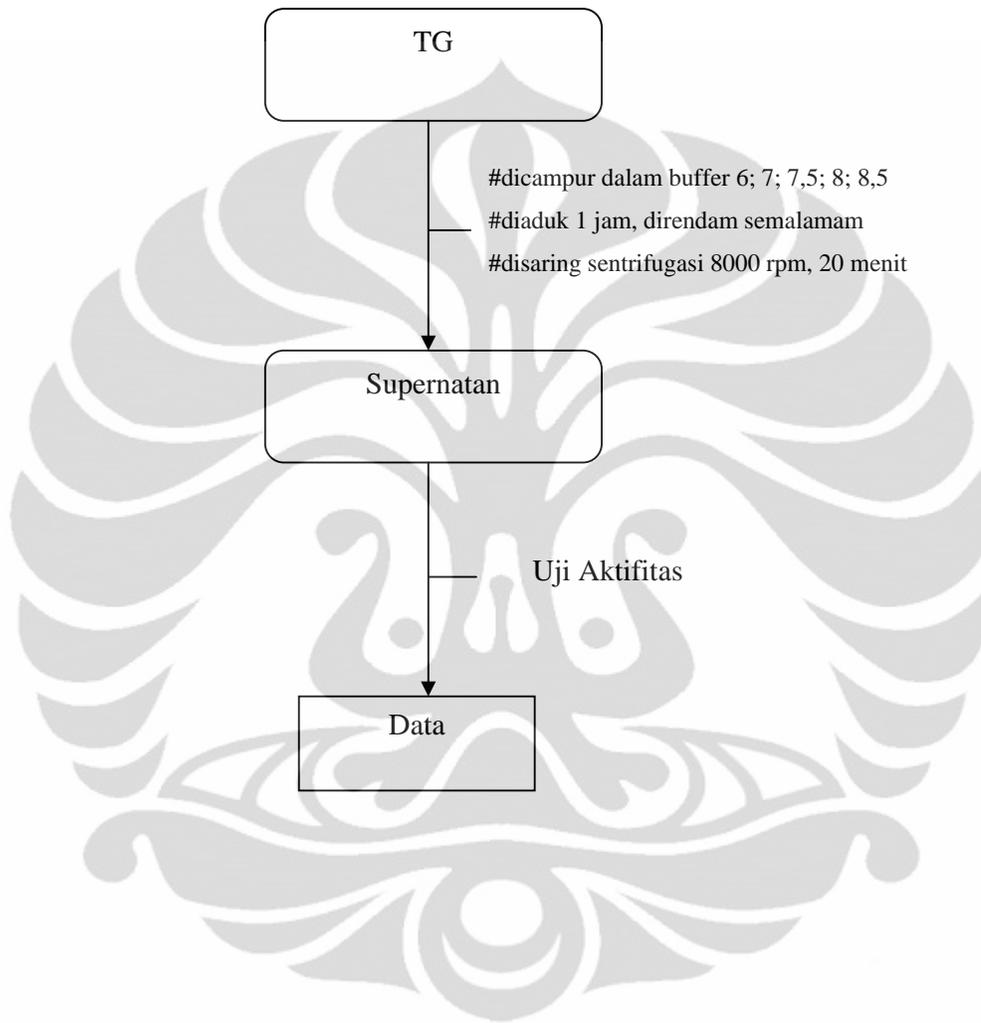
(Lanjutan)

### Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase



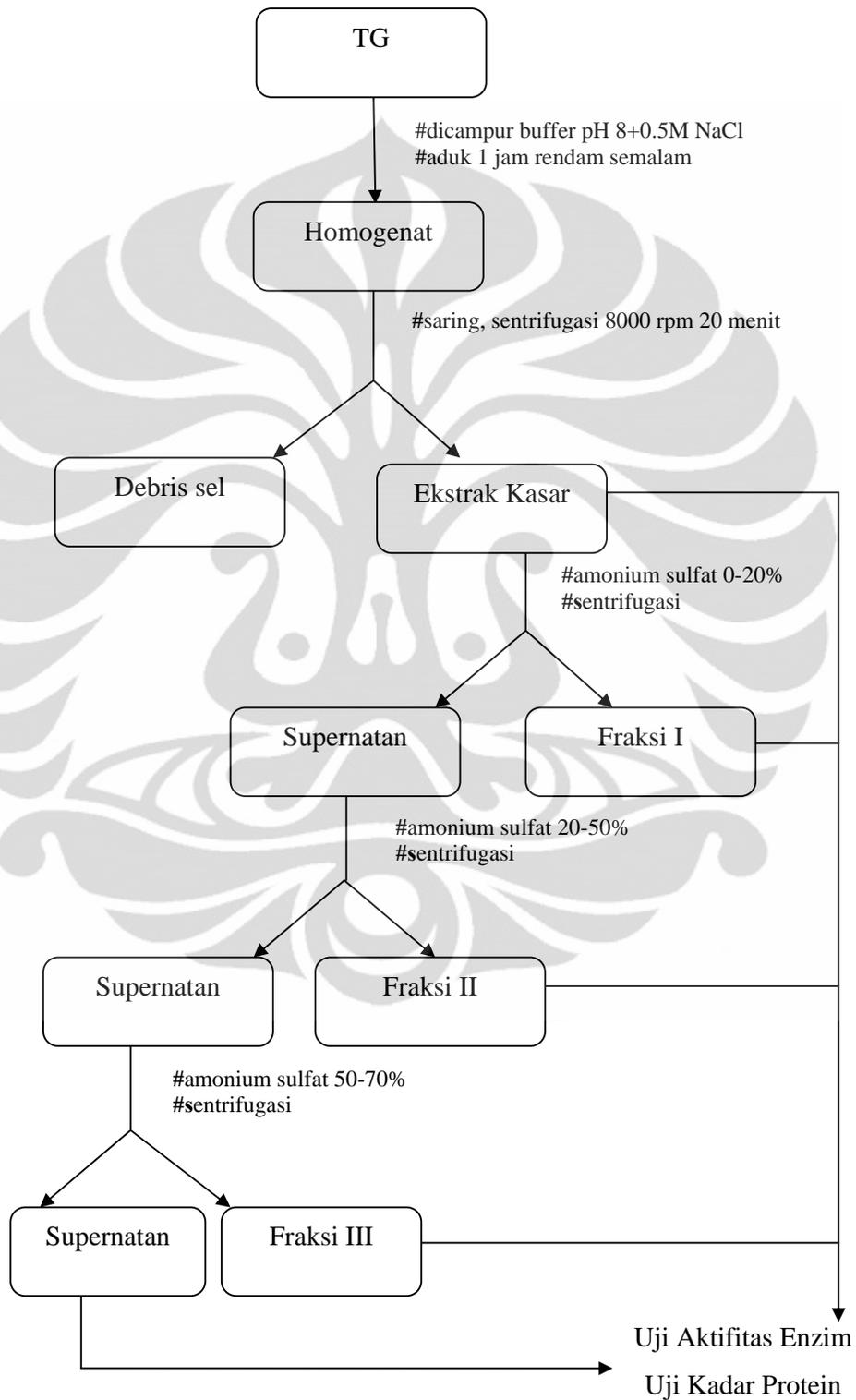
(Lanjutan)

### Variasi pH Buffer Ekstraksi



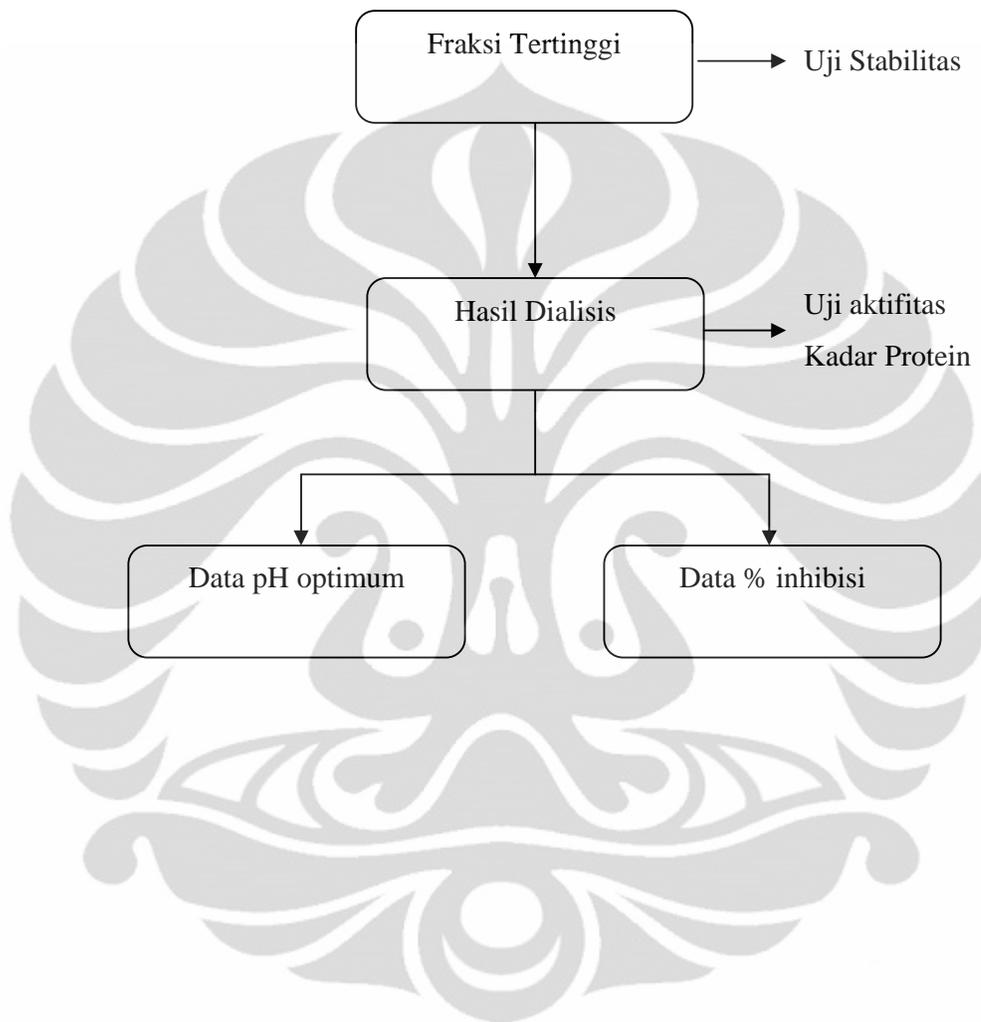
(Lanjutan)

**Isolasi dengan *Salting Out***



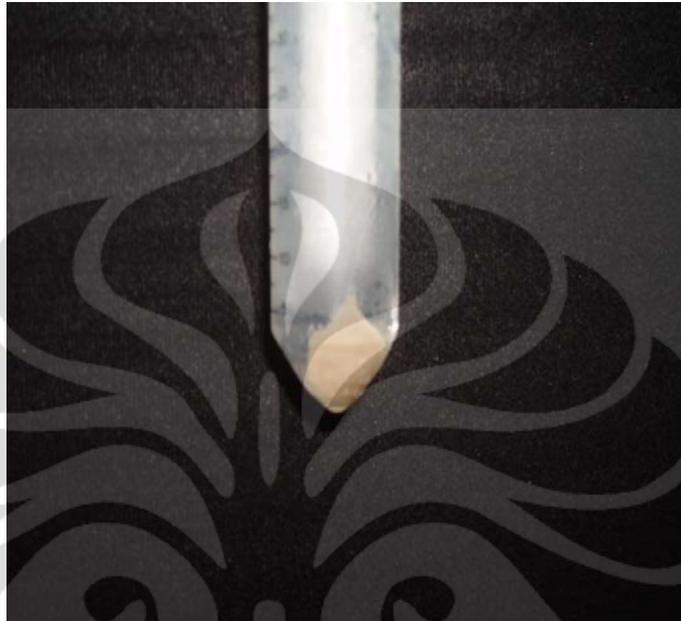
(Lanjutan)

**Dialisis, Penentuan pH optimum, Uji Inhibisi**



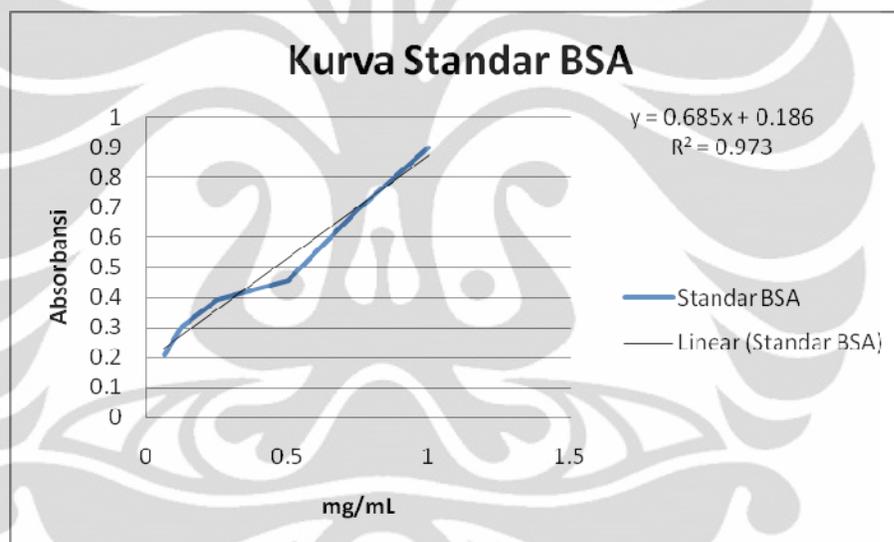
**LAMPIRAN 2: Gabah (*Oryza sativa* var. Ciherang)**



**LAMPIRAN 3: Endapan Enzim dengan *salting out***

**LAMPIRAN 4: Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Lowry**

Konsentrasi (mg/mL)	Serapan
0.0625	0.20912
0.125	0.30405
0.25	0.39459
0.5	0.45732
0.75	0.69196
1	0.90062



**LAMPIRAN 5: Data Serapan Uji Inhibisi dan Contoh Perhitungan**

Quersetin(%)	AS1	AS0	% Inhibisi
0.025	0,389	0,064	1,21
0.05	0,404	0,090	4,56
0,1	0,418	0,132	13,07
Kontrol = 0,382		Blanko = 0.053	

Pada quersetin dengan kadar 0,1% persen inhibisinya adalah:

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Inhibisi} &= \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}}) - (A_{s1} - A_{s0})}{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}}} \times 100\% \\
 &= \frac{(0,382 - 0,053) - (0,418 - 0,132)}{0,382 - 0,053} \times 100\% \\
 &= 13,07\%
 \end{aligned}$$