



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM  $\alpha$ -GLUKOSIDASE  
DARI BERAS LAPUK (*Oryza sativa*)**

**SKRIPSI**

**Destrimita Risma  
0706263050**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM S1 REGULER KIMIA  
DEPOK  
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM  $\alpha$ -GLUKOSIDASE  
DARI BERAS LAPUK (*Oryza sativa*)**

**SKRIPSI**

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

**Destrimita Risma  
0706263050**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM S1 REGULER KIMIA  
DEPOK  
JANUARI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Destrimita Risma

NPM : 0706263050

Tanda Tangan : 

Tanggal : Januari 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Destrimita Risma  
NPM : 0706263050  
Program Studi : S1 Reguler Kimia  
Judul Skripsi : Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Lapuk (*Oryza sativa*)

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 : Sri Sugiwati, S. Si, M.Si (.....)

Penguji : Dr. Jarnuzi Gunlazuardi (.....)

Penguji : Dr. Endang Saepudin, M. Si. (.....)

Penguji : Drs. Riswiyanto Siswoyo, M. Si. (.....)

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Yang Maha Mendengar lagi Maha Melihat dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Lapuk (*Oryza sativa*)** ini tepat pada waktunya. Penyusunan tugas akhir ini merupakan 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 izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian
4. Dr. Ridla Bakri, selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA UI
5. Ir. Widyastuti Samadi M.Si, selaku pembimbing akademis yang telah membimbing penulis selama menempuh pendidikan
6. Dra. Tresye Utari, M.Si, selaku koordinator penelitian yang telah membantu penulis dalam melancarkan penelitian
7. Ibu Ai, Ibu Hani, Lisna, Ibu Lala, Ibu Irni, dan Bapak Hendris atas bantuan dan masukannya selama bekerja di LIPI PUSPIPTEK, Serpong.
8. Ibunda, kakak-kakakku tercinta atas motivasi, perhatian, kasih sayang, doa yang tak pernah putus, dan dukungan baik moril dan materil yang menjadi

semangat bagi penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini dan Ayahanda tercinta atas do'a dan semangat.

9. Indra Ahmad Wijaya, atas perhatian, motivasi, dan waktu luangnya sehingga penulis bisa menghadapi berbagai rintangan dalam menyelesaikan penelitian dan tugas akhir ini.
10. Kak Arif Budiman atas bantuan informasi penelitian, buku, jurnal, dll sehingga target penelitian penulis tercapai.
11. Tante Oom, Chiko, Bu Yati, Bu Pipih, atas bantuan dan kesediaan meluangkan waktunya untuk mencari beras lapuk
12. Nenci Hutapea sebagai sahabat yang selalu menemani dalam suka dan duka selama penelitian dan penyelesaian tugas akhir
13. Fitriana Sari sebagai teman cerita dan berbagi selama penelitian di LIPI Serpong
14. Sahabat-sahabat dekat di kampus, Reka, Ikor, Savitri, Silvy, Rohman, Rifan, Rosa, Rafi, Tegar, Johannes, Santy, Hesty, sebagai motivator yang telah membuat hidup penulis menjadi lebih berwarna atas persahabatan.
15. Miftahurrahmi dan Bestari sebagai sahabat terbaik yang telah mengajari penulis banyak hal, tempat curhat, dan selalu memberi semangat dan dukungannya
16. Ayu, Vania, dan Nurul sebagai teman-teman yang sering berbagi cerita yang bermanfaat di kost-an.
17. Seluruh teman-teman kimia angkatan 2007 dan angkatan 2006, Kak Sonia dan Kak Narita, atas dukungan, kekompakan, dan persahabatan
18. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya skripsi ini

Akhir kata, penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih 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

Universitas Indonesia

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

---

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

Nama : Destrimita Risma  
NPM : 0706263050  
Program Studi : S1 Reguler  
Departemen : Kimia  
Fakultas : MIPA  
Jenis karya : Skripsi

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 :

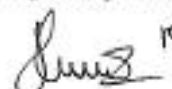
**Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Lapuk (*Oryza sativa*)**

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 : Januari 2012

Yang menyatakan,



(Destrimita Risma)

## ABSTRAK

**Nama** : Destrimita Risma  
**Program Studi** : Kimia  
**Judul** : Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Lapuk

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 yang memecah karbohidrat menjadi glukosa. Enzim ini diperlukan pada pencarian senyawa analog sebagai inhibitor enzim tersebut dalam rangka penemuan obat Diabetes Melitus tipe dua. Pada penelitian ini, sebagai sumber enzim digunakan beras baru, beras lapuk, dan dedak dari tiga varietas, yaitu Sarinah, IR 64, dan IR 46. Beras baru, beras lapuk, dan dedak selanjutnya dibuat menjadi ekstrak kasar enzim tepung beras baru, tepung beras lapuk, dan tepung dedak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari sembilan ekstrak kasar enzim, tepung beras lapuk IR 46 menunjukkan aktivitas tertinggi yaitu 90,3 mU/mL. Aktivitas tertinggi ditemukan pada tingkat kejenuhan 20-50% pada fraksinasi dengan ammonium sulfat sebesar 228,2 mU/mg. Enzim hasil dialisis memiliki aktivitas spesifik 238,9 mU/mg dan pH optimum 5,00. Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari beras lapuk IR 46 memiliki nilai  $K_m = 5,17$  mM dan  $V_{max} = 0,55$  mM/menit. Hasil uji logam menunjukkan bahwa  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$  merupakan aktivator enzim  $\alpha$ -glukosidase sedangkan  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  berperan sebagai inhibitorynya. Pada uji inhibisi, quersetin dan ekstrak buah mahkota dewa dengan kadar 1% menyebabkan persen inhibisi tertinggi masing-masing sebesar 19,84% dan 28,20%.

Kata kunci:

Beras lapuk, isolasi, *Oryza sativa*,  $\alpha$ -glukosidase, Diabetes Melitus tipe 2



## ABSTRACT

**Name** : Destrimita Risma  
**Study Program** : Chemistry  
**Title** : Isolation and Characterization of  $\alpha$ -Glucosidase from Moldy Rice (*Oryza sativa*)

The enzyme  $\alpha$ -glucosidase (EC.3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glukohidrolase) is a membrane bound enzyme found in intestinal epithelium and plays role in carbohydrate digestion cleavaging carbohydrate into glucose. This enzyme is needed to find analogous compound as inhibitor of this enzyme in the context of drug exploration for Diabetes Mellitus type two. In this study, the sources of the enzyme used are new rice, moldy rice, and rice bran that for each from three varieties of rice: Sarinah, IR 64, and IR 46. Those nine sources of the enzyme was made into crude enzyme of new rice flour, moldy rice flour, and rice bran flour. The result showed that moldy rice flour IR 46 had the highest activity to be 90,3 mU/mL. The highest activity in fractionation with ammonium sulphate was founded in saturation level of 20-50% to be 228,2 mU/mg. In dialysis, the enzyme had the specific activity to be 238,9 mU/mg and pH optimum was 5,00.  $\alpha$ -glucosidase from moldy rice IR 46 had Km value = 5,17 mM and Vmax value = 0,55 mM/minute. The result in metal assay showed that  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  were activator of  $\alpha$ -Glucosidase whereas  $Co^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  acted as inhibitor. Mahkota Dewa fruit extract and Quersetin caused the highest percent of inhibition in 1% for each 19,84% and 28,20%.

Keywords:

Moldy rice, isolation, *Oryza sativa*,  $\alpha$ -Glucosidase, Diabetes Mellitus type 2

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Padi sawah.....	5
Gambar 2.2	Grafik hubungan antara [S] terhadap [V].....	9
Gambar 2.3	Grafik hubungan antara 1/[S] terhadap 1/[V] .....	10
Gambar 2.4	Grafik jenis-jenis inhibisi .....	11
Gambar 2.5	Dialisis .....	14
Gambar 4.1	Reaksi enzim $\alpha$ -glukosidase dengan substrat PNPG .....	24
Gambar 4.2	Aktivitas enzim kasar dari sembilan jenis sampel tepung dalam buffer fosfat pada pH 7 .....	25
Gambar 4.3	Grafik variasi pH terhadap aktivitas enzim $\alpha$ -glukosidase .....	27
Gambar 4.4	Grafik tahapan fraksinasi ammonium sulfat terhadap aktivitas dan aktivitas spesifik enzim $\alpha$ -glukosidase .....	29
Gambar 4.5	Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas enzim hasil dialisis .....	30
Gambar 4.6	Grafik hubungan antara [S] terhadap [V] .....	31
Gambar 4.7	Grafik hubungan antara 1/[S] terhadap 1/[V] .....	32
Gambar 4.8	Grafik hubungan antara variasi konsentrasi logam terhadap %inhibisi aktivitas enzim $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk IR 46 ..	33
Gambar 4.9	Data serapan dan persen inhibisi $\alpha$ -glukosidase mahkota dewa dan quersetin dengan enzim $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk.....	35

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Golongan enzim berdasarkan reaksi yang dikatalisis .....	8
Tabel 2.2	Jenis-jenis inhibitor .....	10
Tabel 3.1	Komposisi pereaksi dalam sistem reaksi.....	21
Tabel 4.1	Aktivitas enzim dari sembilan ekstrak pada pH 7 .....	25
Tabel 4.2	Data aktivitas enzim $\alpha$ -glukosidase pada beberapa nilai pH.....	27
Tabel 4.3	Data hasil fraksinasi enzim $\alpha$ -glukosidase dengan 4ammonium sulfat .....	28
Tabel 4.4	Data Aktivitas Enzim Sebelum dan Sesudah Dialisis.....	30
Tabel 4.5	Aktivitas enzim hasil dialisis pada berbagai nilai pH .....	30
Tabel 4.6	Aktivitas enzim $\alpha$ -glukosidase pada berbagai konsentrasi substrat.....	31
Tabel 4.7	Data pengaruh ion-ion logam pada berbagai konsentrasi .....	33
Tabel 4.8	Data serapan dan % inhibisi $\alpha$ -glukosidase mahkota dewa dan quersetin pada enzim $\alpha$ -glukosidase hasil pemurnian parsial dari beras lapuk.....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1	Skema Prosedur Kerja .....	42
LAMPIRAN 2	Beras Lapuk IR 46.....	46
LAMPIRAN 3	Homogenat tepung beras .....	47
LAMPIRAN 4	Supernatan pada optimasi pH buffer .....	48
LAMPIRAN 5	Uji aktivitas dengan substrat PNPG .....	49
LAMPIRAN 6	Supernatan pada <i>Salting out</i> .....	50
LAMPIRAN 7	Endapan pada <i>Salting out</i> .....	51
LAMPIRAN 8	Dialisis.....	52
LAMPIRAN 9	Gambar alat-alat yang digunakan.....	53
LAMPIRAN 10	Pengukuran Protein dengan Metode Lowry .....	54
LAMPIRAN 11	Data Serapan Uji Inhibisi dan Contoh Perhitungan .....	55



## DAFTAR ISI

### HALAMAN

LEMBAR JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vii
ABSTRAK .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Pembatasan Masalah .....	3
1.5 Sistematika Penulisan.....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Perkembangan Varietas Padi.....	5
2.2 Enzim.....	7
2.2.1 Definisi Enzim .....	7
2.2.2 Golongan Enzim.....	7
2.2.3 Kinetika Enzim.....	8
2.2.4 Inhibisi Enzim .....	10
2.2.5 Enzim $\alpha$ -Glukosidase .....	11
2.3 Tahapan Isolasi Enzim .....	12
2.3.1 Ekstraksi.....	12
2.3.2 Fraksinasi dengan <i>Salting Out</i> .....	13
2.3.3 Dialisis .....	13
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>15</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	15
3.2 Alat .....	15
3.3 Bahan.....	15
3.3.1 Sumber Enzim.....	15
3.3.2 Bahan Kimia.....	15
3.4 Prosedur Kerja .....	16
3.4.1 Preparasi sampel sebagai Sumber Enzim $\alpha$ -Glukosidase .....	16
3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase.....	16

3.4.3	Penentuan pH buffer optimum pada Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase dari Sampel .....	17
3.4.4	Metode Uji Aktivitas Enzim $\alpha$ -Glukosidase .....	17
3.4.5	Metode Penentuan Kadar Protein.....	18
3.4.6	Pemurnian Enzim $\alpha$ -glukosidase dengan Metode Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat.....	18
3.4.7	Dialisis dan Penentuan pH optimum Enzim .....	19
3.4.8	Penentuan Nilai Km dan Vmax.....	20
3.4.9	Pengaruh Ion-ion Logam.....	21
3.4.10	Uji Inhibisi terhadap Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Ekstrak MahkotaDewa dan Quersetin.....	21
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>23</b>
4.1	Preparasi Sampel dan Pemilihan Sumber Enzim .....	23
4.2	Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase .....	24
4.3	Penentuan pH Buffer Optimum pada Ekstraksi Enzim Kasar dari TBL	26
4.4	Pemurnian Enzim $\alpha$ -glukosidase dengan Metode Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat.....	27
4.5	Dialisis dan Penentuan pH Optimum .....	29
4.6	Penentuan Parameter Kinetika Enzim .....	31
4.7	Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Aktivitas Enzim $\alpha$ -Glukosidase .....	33
4.8	Uji Aktivitas Inhibisi terhadap Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Ekstrak Mahkota Dewa dan Quersetin.....	34
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>37</b>
5.1	Kesimpulan.....	37
5.2	Saran .....	38
	<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>39</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>42</b>

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim  $\alpha$ -glukosidase (3.2.1.20,  $\alpha$ -glukosida glukohidrolase) adalah golongan karbohidrase eksotipe yang mengkatalisis suatu reaksi hidrolisis dari ikatan 1,4- $\alpha$ -glikosida pada sisi ujung non-pereduksi suatu substrat oligo- dan polisakarida dengan disertai pembebasan  $\alpha$ -glukosa. Enzim  $\alpha$ -glukosidase juga memiliki nama Trivial yaitu maltase. Nama maltase menggambarkan substrat (disakarida) yang dikatalisis oleh enzim tersebut, sedangkan nama  $\alpha$ -glukosidase menunjukkan jenis ikatan yang dihidrolisis.

Enzim  $\alpha$ -glukosidase tersebar luas pada mamalia, tanaman, serangga dan mikroorganisme. Tanaman merupakan sumber  $\alpha$ -glukosidase yang telah banyak diisolasi dan diteliti, terutama dari golongan serealia (Poaceae atau Gramineae) seperti *barley* dan padi. Pada beras, enzim  $\alpha$ -glukosidase terdapat pada dinding sel bersama-sama dengan substrat karbohidratnya dan enzim-enzim lain yang berperan pada metabolisme karbohidrat. Enzim ini berfungsi untuk menghidrolisis pati dan pada perkecambahan biji, berfungsi menghidrolisis oligosakarida.<sup>1</sup>

Berdasarkan spesifisitas terhadap substratnya, enzim  $\alpha$ -glukosidase dibedakan menjadi  $\alpha$ -glukosidase I dan II. Perbedaan spesifisitas ini disebabkan oleh perbedaan sumber enzimnya.  $\alpha$ -Glukosidase I berasal dari bakteri, yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) dan serangga, sedangkan  $\alpha$ -glukosidase II berasal dari jamur, tumbuhan dan mamalia termasuk manusia.<sup>2</sup>

Pada manusia, enzim  $\alpha$ -glukosidase terdapat pada membran lisosom sel epitel instine dan berperan pada pencernaan karbohidrat makanan.  $\alpha$ -Glukosidase dapat memutus ikatan glikosida  $\alpha(1\rightarrow6)$  pada titik percabangan amilopektin dan glikogen menghasilkan glukosa. Pada penderita Diabetes Mellitus (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 alfa-glukosidase yang digunakan pada pengobatan DM tipe 2, yaitu Acarbose (Glucobay), miglitol (Glyset) dan voglibose. Terdapat beberapa efek samping

dari penggunaan obat ini, yaitu berupa perut kembung, rasa tidak nyaman pada perut, diare dan hepatitis akut.

Saat ini sedang banyak dilakukan penelitian dalam rangka mencari senyawa analog obat sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase dari berbagai sumber bahan alam, seperti tanaman dan mikroorganisme.<sup>3</sup> Senyawa analog tersebut, diharapkan memiliki efek samping minimal sehingga aman digunakan pada penderita DM tipe 2.

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. Pada penelitian ini dilakukan isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan menggunakan beras (*Oryza sativa*) lapuk sebagai sumber enzim. Beras lapuk merupakan jenis limbah yang sudah tidak digunakan lagi oleh masyarakat. Penggunaan beras lapuk sebagai sumber enzim merupakan salah satu usaha untuk memberi kegunaan terhadap limbah tersebut.

Tahapan isolasi diawali dengan pembuatan ekstrak kasar enzim, dilanjutkan dengan fraksinasi dengan metode *Salting out*, dan dialisis. Enzim hasil pemurnian kemudian ditentukan pH optimum, ditentukan nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$ , diuji aktivitasnya terhadap pengaruh logam serta dilakukan uji inhibisi menggunakan ekstrak buah mahkota dewa dan quersetin.

## 1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk lebih tinggi daripada beras baru dan dedak?
2. Berapa pH optimum buffer yang digunakan pada pembuatan ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk?
3. Pada tingkat kejenuhan ammonium sulfat berapa  $\alpha$ -glukosidase memiliki aktivitas tertinggi?



4. Berapa nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  enzim  $\alpha$ -glukosidase yang diisolasi dari beras lapuk?
5. Apakah logam  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , dan  $Zn^{2+}$  berperan sebagai aktivator atau inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase?
6. Apakah ekstrak buah mahkota dewa dan quersetin dapat menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Membandingkan aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase yang terdapat dalam beras baru, beras lapuk, dan dedak dari varietas Sarinah, IR 64, dan IR 46.
2. Mengekstraksi dan memfraksionasi enzim menggunakan metode *salting out* dengan garam ammonium sulfat dengan peningkatan tingkat kejenuhan dan dilanjutkan dengan dialisis.
3. Mengkarakterisasi enzim dengan penentuan pH optimum, penentuan nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$ , dan pengaruh ion-ion logam.
4. Mengetahui pengaruh senyawa inhibitor ekstrak buah mahkota dewa dan quersetin terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase.

### 1.4 Pembatasan Masalah

Pada penelitian ini, penulis membatasi masalah ke dalam ruang lingkup:

1. Penelitian ini hanya difokuskan terhadap sumber enzim yang memiliki aktivitas tertinggi setelah dibandingkan terhadap delapan sumber enzim lainnya.
2. Substrat yang digunakan pada uji aktivitas adalah *p-Nitrophenol  $\alpha$ -D Glucopyranoside* (PNPG).
3. Pada uji logam, penelitian dilakukan untuk mengetahui apakah logam tersebut berperan sebagai aktivator atau inhibitor dan mengetahui pengaruh konsentrasi logam terhadap aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase.
4. Pada uji aktivitas inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase, inhibitor yang digunakan adalah mahkota dewa dan quersetin, kemudian

dibandingkan % inhibisinya dengan variasi konsentrasi masing-masing inhibitor.

## **1.5 Sistematika Penulisan**

Makalah skripsi ini ditulis dengan sistematika sebagai berikut:

### **BAB 1 PENDAHULUAN**

Bab ini terdiri atas latar belakang, perumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

### **BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**

Bab ini menjelaskan berbagai informasi yang didapatkan dari berbagai pustaka mengenai perkembangan varietas padi, enzim, definisi enzim, golongan enzim, kinetika enzim, inhibisi enzim, enzim  $\alpha$ -glukosidase, tahapan pemurnian enzim yang meliputi ekstraksi, fraksinasi dengan *Salting out*, dan dialisis.

### **BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN**

Bab ini menjelaskan berbagai informasi tentang tahapan-tahapan pelaksanaan penelitian, alat dan bahan yang digunakan dan cara kerja.

### **BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN**

Bab ini menjelaskan berbagai informasi tentang penyajian data penelitian yang diperoleh, analisis kecenderungan pada berbagai variasi variabel bebas, dan pembahasan mengenai fenomena yang terjadi dalam proses isolasi enzim  $\alpha$ -glukosidase ekstrak kasar .

### **BAB 5 PENUTUP**

Bab ini menjelaskan tentang kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan percobaan yang dilakukan terkait dengan tujuan dari penelitian ini serta saran bagi penelitian selanjutnya.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Perkembangan Varietas Padi

Dalam kehidupan sehari-hari karbohidrat merupakan salah satu zat yang sangat penting bagi tubuh dan sangat mutlak diperlukan setiap hari. Karbohidrat merupakan senyawa organik karbon, hidrogen, dan oksigen, yang terdiri atas satu molekul gula sederhana atau lebih yang merupakan bahan makanan penting sebagai sumber energi atau tenaga. Karbohidrat diperoleh dari makanan pokok sehari-hari seperti padi, jagung, ketela pohon, kentang, sagu, gandum, ubi jalar dan lain-lain. Dari sekian banyak sumber karbohidrat, padi ternyata merupakan ideal bagi kita. Itulah sebabnya padi yang diolah menjadi beras sangat penting bagi bangsa Indonesia. Perbedaan jenis padi pada umumnya terletak pada usia tanaman, jumlah hasil, mutu beras, dan ketahanannya terhadap hama dan penyakit.



Gambar 2.1 Padi sawah  
(Sumber: garutkab.go.id)

Upaya peningkatan produksi pertanian padi terus dilakukan, antara lain dengan menyilangkan padi dan mendapatkan jenis bibit padi baru varietas unggul. Jenis varietas unggul seperti juga memiliki kelebihan-kelebihan antara lain umurnya pendek, hasilnya banyak, tahan terhadap hama, dan penyakit. Sifat-sifat itulah yang diharapkan dari padi jenis unggul. Selain sifat-sifat diatas padi varietas unggul diharapkan menghasilkan beras berkualitas tinggi, rasanya enak, serta tidak mudah roboh.

Dalam upaya meningkatkan produksi padi, Balai Penelitian Padi Bogor juga menyebarkan bibit-bibit baru yang lebih berkualitas yang kita kenal dengan istilah VUTW, singkatan dari Varietas Unggul Tahan Wereng. Kelebihan bibit padi baru itu selain umurnya pendek, tahan terhadap hama dan penyakit, juga rasanya lebih enak.

Penelitian padi juga dikembangkan di Filipina, yaitu *International Rice Research Institute* (IRRI). Balai penelitian tersebut berhasil mengembangkan bibit padi baru yang di beri nama IR 5 dan IR 8. Padi IR ini dikembangkan dari asal padi jenis Peta di Indonesia. Oleh karena itu padi IR 5 dan IR 8 di Indonesia diganti namanya menjadi PB 5 dan PB 4. PB singkatan dari Peta Baru. IRRI (*International Rice Research Institute*) di Filipina terus mengembangkan jenis unggul baru, antara lain dengan ditemukannya IR 64 yang lebih cocok untuk konsumsi Indonesia. Salah satu keunggulan IR 64 antara lain rasanya lebih enak selain umurnya hanya 120 hari dan tahan terhadap hama dan penyakit<sup>4</sup>.

Padi sawah yang diusahakan di Kabupaten Garut meliputi 41,4% dari seluruh komoditas tanaman pangan. Benih padi varietas unggul nasional yang dominan digunakan ialah IR 64, IR 46, dan Ciherang. Namun sejak tahun 1995, varietas local sarinah mulia dikenal luas di Garut. Hingga tahun 2003, luas areal tanam varietas Sarinah mencapai 45.365 Ha (38,53%) dari seluruh varietas yang ditanam di Garut. Secara umum, Padi Sarinah dikembangkan di Kecamatan Cilawu, Samarang, Tarogong Kaler, Karangpawitan, Wanaraja, Sukawening, Leuwigoong, Kadungora, dan Bayongbong. Bahkan pada tahun 2003, melalui proyek PMI, padi Sarinah mulai dikembangkan secara luas (350 Ha) di kecamatan Bayongbong<sup>4</sup>.

Daerah yang menjadi sentra pengembangan agribisnis komoditas padi adalah Kecamatan Bungbulang, Cikelet, Pameungpeuk, Cibalong, Bayongbong, Kadungora, dan Cibatui. Tahun 2004 Kabupaten Garut menghasilkan padi sawah 620.878 ton dengan produktivitas 55,64 ton/ha<sup>4</sup>. Dilihat dari produktivitas, padi sawah masih berpeluang untuk dikembangkan dengan penggunaan teknologi tepat guna.

## 2.2 Enzim

### 2.2.1 Definisi Enzim<sup>5,6,7</sup>

Enzim atau biokatalisator adalah katalisator organik yang dihasilkan oleh sel. Enzim sangat penting dalam kehidupan, karena semua reaksi metabolisme dikatalis oleh enzim. Jika tidak ada enzim, atau aktivitas enzim terganggu maka reaksi metabolisme sel akan terhambat hingga pertumbuhan sel juga terganggu. Reaktan dari suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim disebut substrat dan tiap enzim memiliki sifat yang cukup spesifik, dimana enzim hanya bereaksi dengan substrat tertentu atau menghasilkan produk tertentu dari suatu substrat.

Biasanya nama enzim mempunyai akhiran *-ase*. Di depan *-ase* digunakan nama substrat di mana enzim itu bekerja atau nama reaksi yang dikatalisis. Misal : selulase,  $\alpha$ -glukosidase, dehidrogenase, urease, dan lain-lain. Tetapi pedoman pemberian nama tersebut diatas tidak selalu digunakan. Hal ini disebabkan nama tersebut digunakan sebelum pedoman pemberian nama diterima dan nama tersebut sudah umum digunakan.

Komponen utama dari suatu enzim adalah protein. Tanpa kehadiran suatu komponen non-protein, yang disebut kofaktor, banyak protein enzim kehilangan aktifitas. Komponen selain protein pada enzim dinamakan kofaktor. Koenzim dapat merupakan ion logam/ metal, atau molekul organik yang dinamakan koenzim. Gabungan antara bagian protein enzim (apoenzim) dan kofaktor dinamakan holoenzim. Ketika suatu kofaktor terikat sangat kuat sehingga sulit dipisahkan tanpa merusak enzim maka disebut gugus prostetik.

### 2.2.2 Golongan Enzim<sup>6</sup>

Nama enzim berasal dari bahasa Yunani  $\epsilon\nu\zeta\upsilon\mu\epsilon$  (baca: enzume) yang artinya adalah 'in yeast'. Hal ini pertama kali diusulkan oleh Kühne pada tahun 1878. Usulan nama enzim diperkuat dengan penemuan Buhner (1887) yang menunjukkan bahwa ekstrak ragi dapat digunakan untuk memfermentasi karbohidrat. *Enzim Commission* (E.C.) membagi enzim menjadi 6 golongan utama berdasarkan total reaksi yang dikatalisis :

Tabel 2.1 Golongan enzim berdasarkan reaksi yang dikatalisis

Kelas	Jenis Enzim	Tipe Reaksi
1	Oksidoreduktase	Redoks
2	Transferase	Transfer atom atau gugus
3	Hidrolase	Hidrolisis
4	Lyase	Pengeluaran atom atau gugus
5	Isomerase	Isomerasi
6	Ligase	Penggabungan dua molekul

Berdasarkan tempat kerja dan ditinjau dari sel yang membentuknya, enzim dapat dibedakan menjadi dua, yaitu eksoenzim dan endoenzim. Eksoenzim adalah enzim yang aktivitasnya diluar sel. Endoenzim adalah enzim yang aktivitasnya didalam sel.

Selain eksoenzim dan endoenzim, dikenal juga enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang dibentuk terus-menerus oleh sel tanpa memperhatikan apakah substratnya ada atau tidak. Enzim induktif adalah enzim yang dibentuk karena adanya rangsangan substrat atau senyawa tertentu yang lain. Misalnya pembentukan enzim beta-galaktosida pada *escherichia coli* yang diinduksi oleh laktosa sebagai substratnya.

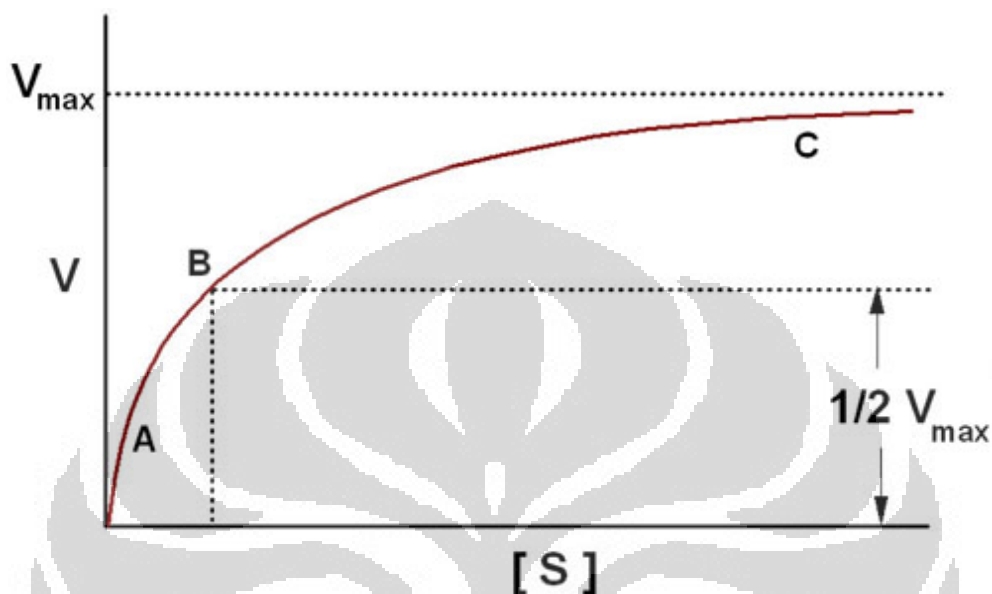
### 2.2.3 Kinetika Enzim

Dalam reaksi enzim dikenal kecepatan reaksi hidrolisis, penguraian atau reaksi katalisasi lain yang disebut *velocity* ( $V$ ). Harga  $V$  dari suatu reaksi enzimatis akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat  $[S]$ , akan tetapi setelah  $[S]$  meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Pada konsentrasi enzim tetap (tertentu) harga  $V$  hampir linier dengan  $[S]$ . Pada kondisi  $V$  tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya  $[S]$  disebut kecepatan maksimum ( $V_{max}$ ).  $V_{max}$  merupakan salah satu parameter kinetika enzim<sup>8</sup>.

Parameter kinetika enzim yang lain adalah konstanta *Michaelis-Menten*, yang dikenal sebagai  $K_m$ .  $K_m$  merupakan konsentrasi substrat yang

separuh dari lokasi aktifnya telah terisi, yaitu bila kecepatan reaksi enzim telah mencapai  $\frac{1}{2} V_{max}$ .

Secara umum untuk semua reaksi substrat tunggal terkatalis enzim grafik kecepatan awal terhadap konsentrasi substrat awal berbentuk hiperbola



Gambar 2.2 Grafik hubungan antara [S] terhadap [V]

(Sumber: Lehninger, 2008)

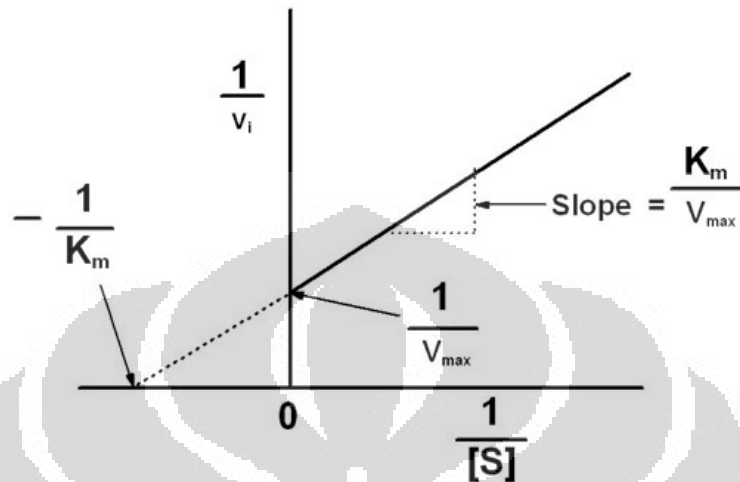
Grafik tersebut memiliki persamaan  $V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$ . Persamaan ini disebut persamaan Michaelis-Menten, dan memang awalnya diturunkan oleh Michaelis dan Menten lalu dimodifikasi oleh Briggs dan Haldane.

Nilai  $K_m$  ini memiliki dua arti, yang pertama menggambarkan konsentrasi substrat ketika setengah sisi aktif enzim terisi penuh. Arti yang kedua yaitu pada keadaan ini nilai  $K_m$  yang besar menunjukkan lemahnya afinitas enzim terhadap substrat sedangkan nilai  $K_m$  yang kecil menunjukkan kuatnya afinitas tersebut<sup>7</sup>.

Cara menentukan nilai  $K_m$  suatu enzim, juga kecepatan awalnya ( $V_{max}$ ) adalah dengan menggunakan grafik yang dirancang oleh Lineweaver dan Burk yang merupakan penataan-ulang dari persamaan Michaelis-Menten sebagai berikut:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max} S_o} + \frac{1}{V_{max}}$$

Persamaan ini adalah bentuk dari  $y = mx+c$  yang merupakan persamaan garis lurus. Maka dengan memplotkan  $1/V_0$  terhadap  $1/S_0$  nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  didapat grafik sebagai berikut:



Gambar 2.3 Grafik hubungan antara  $1/[S]$  terhadap  $1/[V]$   
(Sumber: Lehninger, 2008)

#### 2.2.4 Inhibisi Enzim

Inhibitor adalah suatu senyawa yang dapat menurunkan laju reaksi enzim. Inhibitor memiliki dua sifat yaitu inhibitor reversible dan inhibitor irreversible. Inhibitor reversible terikat secara reversible dan dapat dilepas dari enzim dengan cara dialisis atau dengan menambah komponen lain. Sedangkan inhibitor irreversible terikat secara kuat dan derajat inhibisinya akan semakin kuat dan tidak bisa dipisahkan dari enzim tanpa merusaknya. Inhibitor reversibel dapat dibagi lagi menjadi tiga kategori yaitu inhibitor kompetitif, nonkompetitif, dan inhibitor unkompetitif<sup>6</sup>.

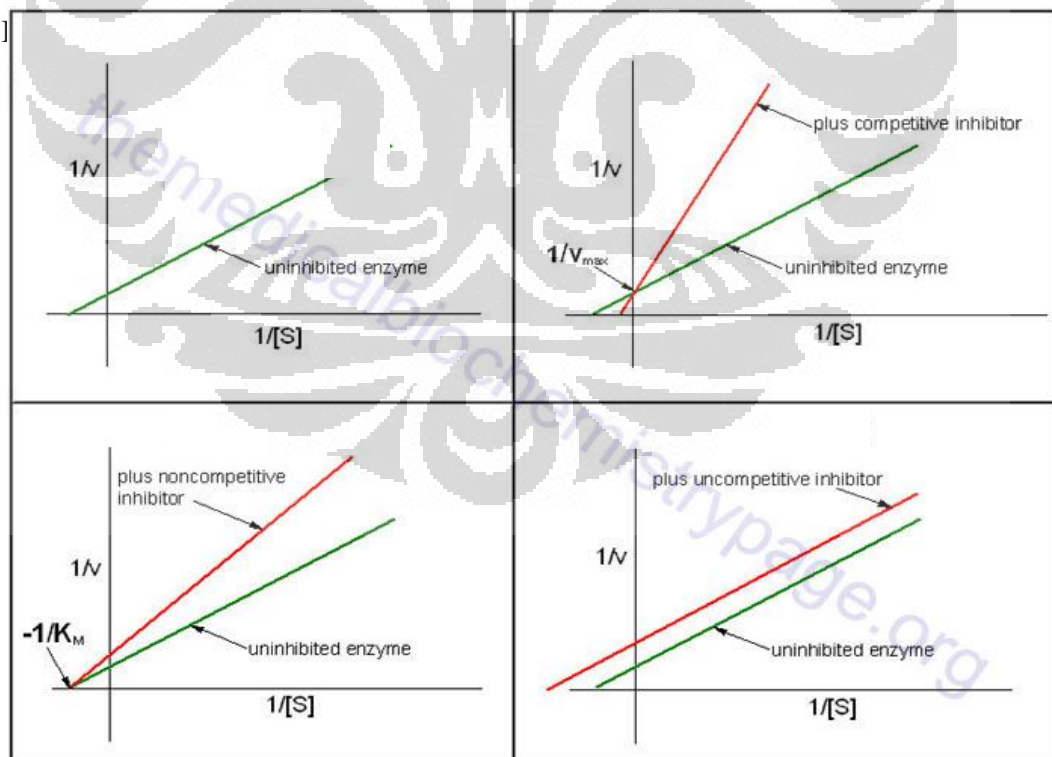
Tabel 2.2 Jenis-jenis inhibitor

Tipe Inhibitor	Situs ikatan pada enzim	Efek kinetik
Kompetitif	Secara khusus pada situs katalitik enzim, berkompetisi dengan substrat. Inhibisi dapat balik oleh substrat	$V_{max}$ tidak berubah, $K_m$ meningkat



Tipe Inhibitor	Situs ikatan pada enzim	Efek kinetik
Nonkompetitif	Mengikat enzim atau kompleks enzim substrat tidak pada sisi katalitik enzim. Ikatan substrat tidak berubah namun tidak dapat membentuk produk. Tidak dapat balik oleh substrat.	$K_m$ tidak berubah, $V_{max}$ menurun sesuai dengan konsentrasi inhibitor
Unkompetitif	Hanya berikatan pada kompleks enzim substrat. Ikatan enzim dengan substrat merubah enzim sehingga memunculkan situs inhibitor. Tidak dapat balik oleh substrat	$V_{max}$ dan $K_m$ menurun

Berikut ini adalah penggambaran ketiga jenis inhibisi oleh plot Lineweaver-



Gambar 2.4 Grafik jenis-jenis inhibisi  
(Sumber: [www.themedicalbiochemistrypage.com](http://www.themedicalbiochemistrypage.com))

### 2.2.5 Enzim $\alpha$ -Glukosidase (*Oryza sativa*)

Enzim  $\alpha$ -glukosidase yang dimurnikan dari tanaman: gandum, jagung, beras, bayem dan bit semuanya tergolong pada enzim  $\alpha$ -glukosidase tipe II. Dari kedua tipe hanya tipe II yang mampu menghidrolisis substrat polisakarida (yaitu pati yang larut air).<sup>2</sup>

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 secara efektif and memecah butiran pati yang ada sebagai polisakarida tak larut pada benih tanaman. Selain itu, enzim ini beraksi secara sinergis dengan  $\alpha$ -amilase dalam pemecahan butiran pati.<sup>9</sup>

## 2.3 Tahapan Isolasi Enzim<sup>10</sup>

Tahapan pemurnian Enzim sangat erat 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 isolasi protein dapat digolongkan dalam tiga tahapan yaitu:

1. Ekstraksi
2. Fraksinasi dengan *Salting Out*
3. Dialisis

### 2.3.1 Ekstraksi<sup>6,11</sup>

Material yang memiliki aktifitas enzim diperlakukan untuk memindahkan protein ke dalam bentuk terlarut sehingga dapat dimanipulasi. Bila material awal merupakan sel hewan atau tanaman maka perlu dilakukan metode penghancuran sel dan melepaskan enzim ke dalam larutan.. Kemudian untuk mendapatkan ekstrak yang jernih dilakukan filtrasi atau sentrifugasi untuk memisahkan material yang tidak larut dan debris sel. Maka didapatkan homogenat.

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 material berupa sereal atau tepung enzim dapat diekstrak dengan hanya menempatkan dalam medium cair dan pengadukan.

Medium ekstraksi (larutan buffer) dimana enzim akan keluar setelah sel mengalami pemecahan harus dijaga temperaturnya dibawah 4°C agar enzim dalam sel hidup tidak aktif sehingga meminimalkan kehilangan aktifitas. 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.

### 2.3.2 Fraksinasi Dengan *Salting out*<sup>6,11</sup>

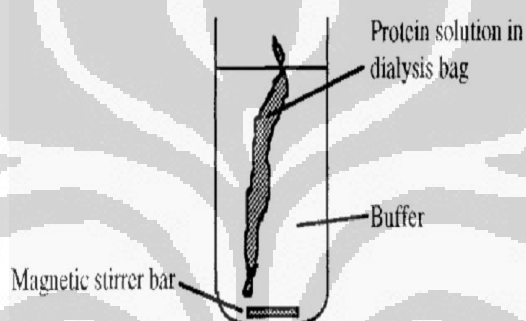
Metode yang paling banyak dipakai adalah fraksinasi dengan menggunakan konsentrasi garam yang tinggi, biasa disebut *salting-out*. Kelarutan protein dalam media air diperkuat oleh pembentukan interaksi ionik lemah termasuk ikatan hidrogen antara molekul terlarut dengan air.

Ikatan hidrogen antara protein dengan air menstabilkan protein dalam larutan, namun disamping itu terbentuk pula interaksi antara yang bersifat non-polar antara sesama molekul protein. Interaksi ini membentuk suatu daerah non-polar tunggal yang memaksa air keluar dan membentuk suatu lingkungan yang hidrofobik.

Dengan mengendapkan enzim dengan metode ini maka enzim akan terpisah dari mono-,oligo- sakarida, nukleotida, asam amino bebas, protein lain yang teringgal 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.

### 2.3.3 Dialisis <sup>11</sup>

Dialisis merupakan proses yang digunakan untuk menghilangkan molekul kecil seperti garam atau larutan protein dari enzim yang didapatkan melalui tahapan sebelumnya. 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.



Gambar 2.5 Dialisis  
(Dennison, 2002)

## **BAB 3**

### **BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini berlangsung selama 3 bulan, mulai dari bulan September sampai November 2011, bertempat di 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, pH meter, 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 beras baru, beras lapuk (berumur kurang lebih 4 bulan dan telah dipisahkan dari kutunya), dan dedak dengan masing-masing dari tiga varietas lokal, yaitu varietas Sarinah, IR 64, dan IR 46 yang didapat dari persawahan Desa Samarang, Kabupaten Garut, Jawa Barat.

##### **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),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dimetilsulfoksida (DMSO), quersetin, dan ekstrak mahkota dewa.

### 3.4 Prosedur Kerja

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

Semua sampel sumber enzim baik berupa beras baru, beras lapuk maupun dedak dari ketiga varietas beras local (sarinah, IR 64 dan IR 46) dihancurkan menjadi tepung menggunakan *blender*, kemudian disaring dengan ayakan (ukuran Mesh 700) . Tepung yang diperoleh selanjutnya masing-masing disebut sebagai :

1. tepung beras baru sarinah (TBBS)
2. tepung beras lapuk sarinah (TBLS)
3. tepung dedak sarinah (TDS)
4. tepung beras baru IR64 (TBB64)
5. tepung beras lapuk IR64 (TBL64)
6. tepung dedak IR64 (TD64)
7. tepung beras baru IR46 (TBB46)
8. tepung beras lapuk IR46 (TBL46)
9. tepung dedak IR46 (TD46)

Kesembilan sampel di atas akan diuji aktivitas  $\alpha$ -glukosidase nya dan sampel dengan aktifitas enzim paling tinggi akan digunakan lebih lanjut pada penelitian ini sebagai sumber enzim.

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

Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 20 gram, secara terpisah dimasukkan ke dalam beker gelas yang berisi 50mL larutan buffer fosfat 67 mM pH 7,00 dingin. Campuran kemudian diaduk selama satu jam menggunakan *magneticstirrer* yang dilengkapi dengan *icebath*, dan dibiarkan semalaman dalam lemari pendingin. Selanjutnya homogenat yang diperoleh, disaring dengan kain kasa dan filtratnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatant yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang akan diuji aktivitas  $\alpha$ -glukosidasenya.

### 3.4.3 Penentuan pH buffer optimum pada Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase dari Sampel

Untuk melihat pengaruh pH pada buffer yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kasar enzim dari tepung beras lapuk IR 46 dilakukan variasi pH, yaitu: pH 4,00; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00; 8,00. Tepung beras lapuk IR 46 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 6,80 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:

$$\text{Unit/mL} = \frac{(A_{400} \text{ Uji} - A_{400} \text{ Blanko}) (10)(5,7)}{(18,3)(20)(2)(0,2)} \quad (3.1)$$

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 cara 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 3,5 mL akuademin kemudian ditambahkan 5,5 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 650 nm. Sebagai larutan standar digunakan BSA dengan variasi konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; dan 1,00 mg/mL. Pada pengukuran blanko, larutan enzim diganti dengan air bebas mineral.

### 3.4.6 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Metode Fraksinasi Dengan Ammonium Sulfat

Dari hasil uji aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase terhadap ekstrak kasar enzim dari semua sampel (TBBS, TBLs, TDS, TBB 64, TBL 64, TD 64, TBB 46, TBL 46, dan TD 46), sampel yang memiliki aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi selanjutnya akan digunakan sebagai sumber enzim yang akan diteliti lebih lanjut.

Sebanyak 80 gram tepung sampel dicampurkan ke dalam 200 mL larutan buffer dengan pH sesuai hasil optimasi. Selanjutnya, untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim, campuran diberi perlakuan yang sama dengan prosedur kerja seperti



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 bath*. Garam ammonium sulfat dengan 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 menggunakan buffer hasil optimasi pH sampai larut. Endapan ini untuk selanjutnya disebut fraksi I. Supernatan difraksinasi lebih jauh setelah didiamkan semalaman 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 aktivitasnya dan ditentukan kadar proteinnya sesuai dengan prosedur kerja 3.4.4 dan 3.4.5.

Rumus untuk menghitung banyaknya ammonium sulfat yang ditambahkan pada masing-masing tingkat kejenuhannya adalah sebagai berikut:

$$\frac{533(S_2 - S_1)}{100 - (0.3 \times S_2)} \times \frac{\text{Volume filtrat}}{1000} = \dots \text{ gram} \quad (3.2)$$

### 3.4.7 Dialisis dan Penentuan pH Optimum Enzim

Fraksi ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik paling tinggi selanjutnya didialisis. Sebanyak 9 mL larutan enzim dimasukkan ke dalam membran selofan dan diikat pada kedua ujung kantung dengan benang. Kemudian membran berisi enzim direndam dalam larutan buffer dengan konsentrasi sepuluh kali lebih encer dari larutan enzim, misalnya konsentrasi buffer enzim adalah 67 mM, maka konsentrasi buffer untuk perendaman dialisis adalah 6,7 mM. Kemudian larutan dan kantung diaduk dengan *magnetic stirrer*. Proses ini dilakukan selama 9 jam dan suhu sistem dijaga 4°C. Selama dialisis dilakukan pergantian buffer selama 2 jam sekali.

Sebelum digunakan, kantung dialisis terlebih dahulu disiapkan. Pertama-tama membran selofan disiapkan dengan ukuran yang sesuai dengan banyaknya larutan enzim (13 cm), lalu direndam dalam air bebas mineral selama 2 jam.

Kemudian membran selofan direbus dengan air bebas mineral pada suhu 70°C selama 5 menit 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 selama 5 menit.

Enzim yang setelah melalui tahap dialisis kemudian ditentukan pH optimumnya. Ke dalam 6 tabung reaksi yang masing-masing berisi 5 mL larutan buffer dengan pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; dan 8,0 dilakukan uji sesuai cara kerja butir 3.4.4.

### 3.4.8 Penentuan Nilai $K_m$ dan $V_{max}$

Larutan enzim yang telah diketahui nilai pH optimumnya kemudian ditentukan parameter kinetika enzimnya ( $K_m$  dan  $V_{max}$ ) yang didasarkan atas plot grafik hubungan antara konsentrasi substrat (S) dan aktivitas enzim (V).

Larutan substrat PNPG dibuat dengan konsentrasi antara 1 mM – 15 mM, lalu dilakukan pengujian aktivitas enzim sesuai dengan prosedur 3.4.4 dengan menggunakan buffer pH optimum sesuai dengan uji 3.4.8.

Selanjutnya dibuat tabel (V) dan (S) dan dikonversi menjadi 1/V dan 1/(S), lalu ditentukan nilai  $V_{max}$  dan  $K_m$  yang didasarkan atas persamaan kurva *Lineweaver-Burk* sebagai berikut:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$\downarrow$        $\downarrow$        $\downarrow$        $\downarrow$   
 y =    m    x    +    c

### 3.4.9 Pengaruh Ion-ion Logam

Masing-masing garam  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , dan  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  dibuat larutan dengan konsentrasi 5 mM, 8 mM, 40 mM, dan 200 mM. Kemudian dilakukan uji aktivitas pengaruh ion logam dengan cara memasukkan 5 ml buffer dengan pH hasil optimasi, 0,2 mL enzim, dan 0,2 mL larutan garam pada masing-masing konsentrasi ke dalam tabung reaksi, lalu disetimbangkan pada suhu  $37^\circ C$  selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan PNPG 10 mM dan diinkubasi  $37^\circ C$  selama 20 menit. Untuk menghentikan reaksi diambil 2 mL campuran dan ditambahkan 8 mL larutan  $Na_2CO_3$  100 mM, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 400 nm dan dihitung aktivitasnya sesuai rumus 3.1.

### 3.4.10 Uji Aktivitas Inhibisi terhadap Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Ekstrak Mahkota Dewa dan Quersetin

Larutan enzim, sebelum digunakan diencerkan 5 kali dengan buffer dengan pH hasil optimasi. Campuran reaksi terdiri dari 10  $\mu L$  larutan sampel (masing-masing disiapkan untuk quersetin dan ekstrak mahkota dewa) dalam DMSO, 490  $\mu L$  buffer dengan pH hasil optimasi dan 250  $\mu L$  PNPG 10 mM sebagai substrat. Setelah campuran reaksi diinkubasi pada  $37^\circ C$  selama 5 menit, 250  $\mu L$  larutan enzim ditambahkan dan diinkubasi hingga 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000  $\mu L$   $Na_2CO_3$  200 mM. Kemudian campuran diukur serapan pada panjang gelombang 400 nm. Komposisi pereaksi dalam sistem reaksi untuk setiap pengujian dengan volume total 2 mL dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Komposisi pereaksi dalam sistem reaksi

	Blanko( $\mu$ )	Kontrol( $\mu L$ )	S0( $\mu L$ )	S1( $\mu L$ )
Sampel	-	-	10	10
DMSO	10	10	-	-
Buffer	490	490	490	490
Substrat	250	250	250	250
Inkubasi $37^\circ C$ , 20 menit				
Buffer	250	-	250	-
Enzim	-	250	-	250
Inkubasi $37^\circ C$ , 15 menit				
$Na_2CO_3$ 200 mM	1000	1000	1000	1000

Larutan standar quersetin dan larutan ekstrak mahkota dewa dibuat dengan variasi konsentrasi 1%; 0,5% ; 0,25%; dan 0.125%. Persen inhibisi didapat dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}}) - (A_{s1} - A_{s0})}{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}})} \times 100\% \quad (3.3)$$

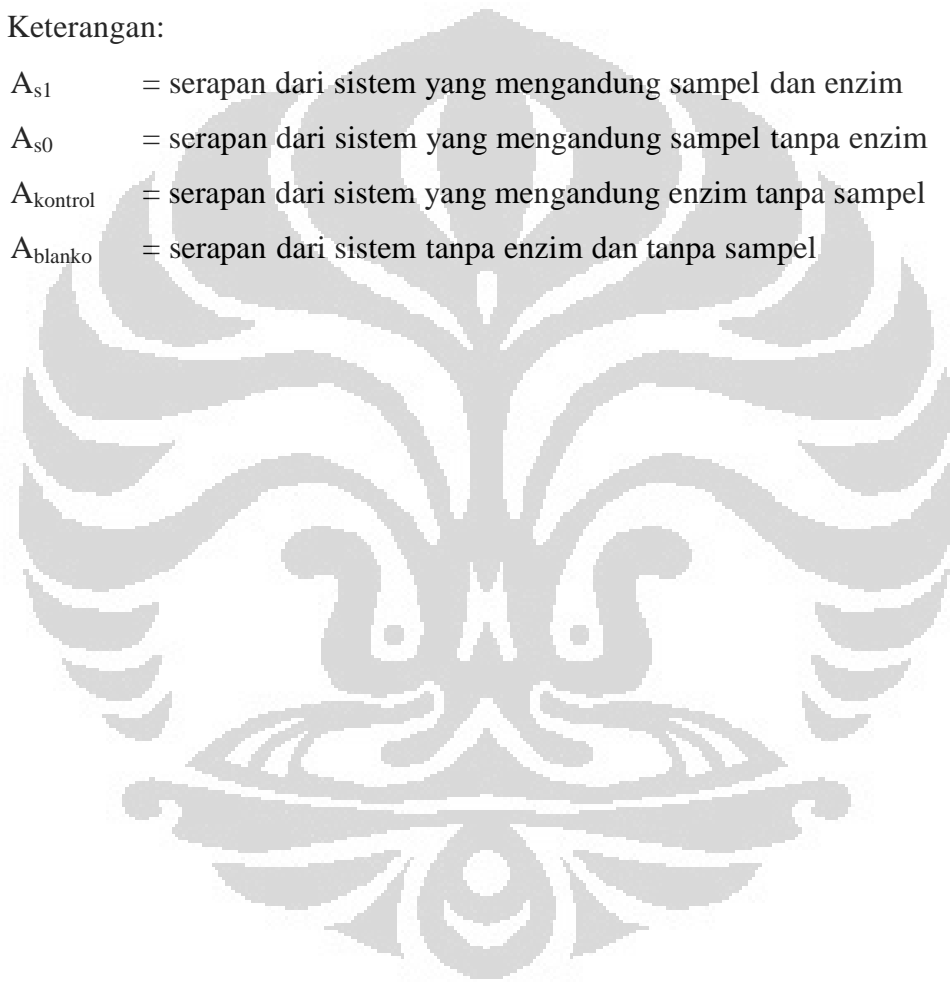
Keterangan:

$A_{s1}$  = serapan dari sistem yang mengandung sampel dan enzim

$A_{s0}$  = serapan dari sistem yang mengandung sampel tanpa enzim

$A_{\text{kontrol}}$  = serapan dari sistem yang mengandung enzim tanpa sampel

$A_{\text{blanko}}$  = serapan dari sistem tanpa enzim dan tanpa sampel



## BAB 4

### HHASIL DAN PEMBAHASAN

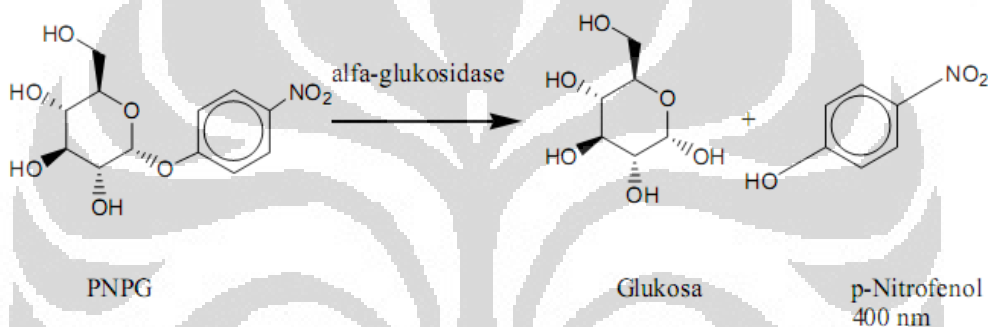
#### 4.1 Preparasi Sampel dan Pemilihan Sumber Enzim

Pemilihan sumber enzim merupakan tahap pertama yang dilakukan pada isolasi enzim  $\alpha$ -glukosidase. Pada penelitian ini sebagai sumber enzim digunakan beras baru, beras lapuk, dan dedak dari tiga jenis varietas padi lokal, yaitu IR 64, IR 46, dan Sarinah yang berasal dari Kabupaten Samarang, Garut. Sumber-sumber enzim tersebut dipilih karena ketersediaan dan kemudahan mendapatkannya di pasaran. Penggunaan beras lapuk sebagai sumber enzim adalah dalam rangka memanfaatkan limbah beras lapuk yang kandungan gizinya sudah berkurang dan sudah tidak dikonsumsi lagi oleh masyarakat.

Enzim  $\alpha$ -glukosidase (EC 3.2.1.20) merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan glikosida  $\alpha(1\rightarrow4)$  yang terdapat pada pati dan glikogen. Enzim ini berperan dalam degradasi pati dan berfungsi pada perkecambahan biji dengan cara menghidrolisis oligosakarida. Oligosakarida merupakan hasil hidrolisis dari polisakarida oleh  $\alpha$ -amilase and  $\beta$ -amilase. Pada beras enzim  $\alpha$ -glukosidase terdapat pada dinding sel, terikat pada membran bersama-sama dengan substrat karbohidratnya, dan enzim -enzim lain yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat tersebut<sup>13</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>.

Preparasi sampel dilakukan dengan menghancurkan beras dan dedak menggunakan *blender*, kemudian diayak dengan saringan 700 Mesh. Proses ini bertujuan untuk memecah sel sehingga enzim yang tersimpan dapat dengan mudah keluar dan masuk ke dalam medium cair (buffer). Tepung beras dan dedak kemudian disimpan di dalam lemari pendingin untuk mencegah adanya pertumbuhan mikroorganisme yang mungkin dapat mengubah kandungan kimia sumber enzim yang akan digunakan.

Pada penelitian ini dari kesembilan jenis sampel tepung (TBBS, TBLs, TDS, TBB 64, TBL 64, TD 64, TBB 46, TBL 46, dan TD 46) akan ditentukan sampel tepung mana yang memiliki aktivitas  $\alpha$ -glukosidase yang paling tinggi. Selanjutnya sampel tepung dengan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase tertinggi tersebut akan digunakan lebih lanjut sebagai sumber enzim. Uji aktivitas enzim didasarkan pada kemampuan enzim ini dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis substrat *p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside* (PNPG) menjadi glukosa dan *p*-Nitrofenol yang berwarna kuning. Warna kuning (hasil reaksi) kemudian diukur serapannya pada 400 nm<sup>14</sup>. Persamaan reaksi enzimatik antara enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan substratnya dapat dilihat pada gambar 4.1.



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

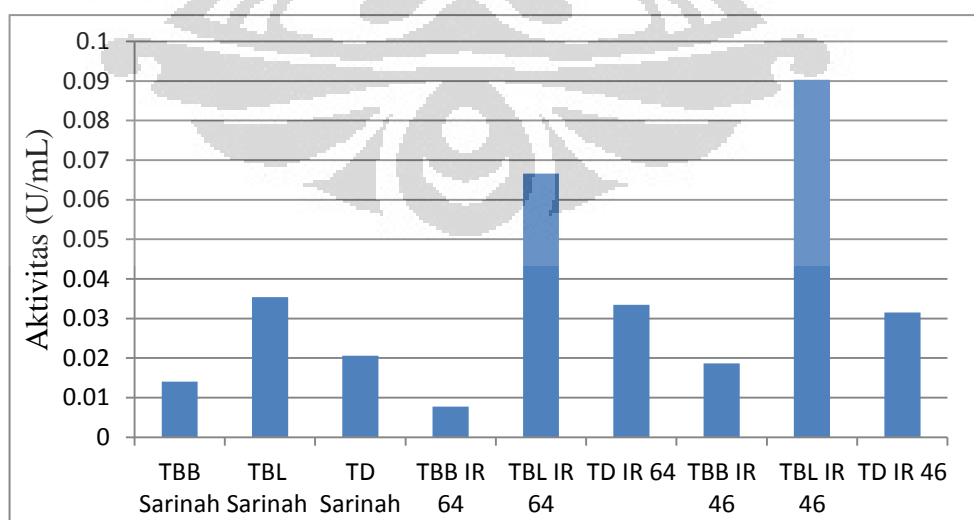
#### 4.2 Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim $\alpha$ -Glukosidase

Pada pembuatan ekstrak kasar enzim, baik tepung beras maupun tepung dedak ditambahkan larutan buffer fosfat 67 mM pada pH 7,00. Jumlah volume buffer yang ditambahkan untuk mengekstrak enzim adalah minimal dua kali bahan awal karena semakin banyak volume buffer yang ditambahkan, semakin banyak juga protein enzim yang terekstrak. Akan tetapi di sisi lain dengan semakin banyaknya volume buffer yang digunakan, ekstrak enzim kasar yang diperoleh menjadi lebih encer. Dalam penelitian ini digunakan perbandingan volume 1 : 2,5 agar larutan ekstrak yang didapat tidak terlalu encer sehingga enzim yang terisolasi keberadaannya lebih stabil dan mudah diisolasi<sup>15</sup>. Buffer yang digunakan adalah buffer fosfat, karena memiliki beberapa keuntungan yaitu: kisaran kerjanya pada pH 5,6 hingga 8,8 yang secara umum mendekati pH fisiologis<sup>16</sup>. Buffer fosfat pH 7,00 digunakan karena  $\alpha$ -glukosidase yang berasal

dari sumber enzim beras memiliki pH optimum 7,00. 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>10</sup>. Selain itu, penggunaan buffer dengan kekuatan ion yang tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga dipilih konsentrasi yang rendah. Hasil penentuan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari sembilan jenis sampel tepung yang diekstrak dengan buffer fosfat pH 7,00, dapat dilihat pada tabel 4.1 dan gambar 4.2

Tabel 4.1 Aktivitas enzim dari sembilan ekstrak pada pH 7

Jenis Beras	Aktivitas (mU/mL)	Kadar Protein (mg/mL)
TBB Sarinah	14,0	1,1578
TBL Sarinah	35,4	1,0072
TD Sarinah	20,6	1,3672
TBB IR 64	7,8	1,2730
TBL IR 64	66,6	2,9676
TD IR 64	33,5	1,3823
TBB IR 46	18,7	1,1259
<b>TBL IR 46</b>	<b>90,3</b>	<b>1,6669</b>
TD IR 46	31,5	1,5840



Gambar 4.2 Aktivitas enzim kasar dari sembilan jenis sampel tepung dalam buffer fosfat pada pH 7

Pada Tabel 4.1 dapat dilihat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase paling tinggi terdapat dalam ekstrak kasar TBL IR 46 (90,3 m U/mL) disusul ekstrak kasar TBL IR 64 (0.0666 U/mL), dan TBL Sarinah (35,4 U/mL). Ekstrak tepung beras lapuk jauh lebih tinggi aktivitasnya dibandingkan ekstrak kasar TBB dan TD. Tingginya aktivitas ekstrak kasar TBL disebabkan karena beras lapuk merupakan hasil penguraian organisme yaitu kutu beras (*Tribolium castanum*) yang memiliki enzim  $\alpha$ -glukosidase. Selain itu, tingginya aktivitas  $\alpha$ -glukosidase pada beras lapuk kemungkinan disebabkan juga oleh adanya mikroorganisme lain seperti jamur yang berkembang biak selama pelapukan beras. Berdasarkan literatur, enzim  $\alpha$ -glukosidase yang berasal dari jamur merupakan jenis  $\alpha$ -glukosidase II, sedangkan  $\alpha$ -glukosidase yang diisolasi dari kutu beras (jenis serangga) merupakan jenis  $\alpha$ -glukosidase I. Sedangkan Jenis enzim  $\alpha$ -glukosidase yang terdapat baik pada mamalia maupun tanaman adalah  $\alpha$ -glukosidase II<sup>2</sup>. Untuk selanjutnya, sampel TBL 46 akan digunakan lebih lanjut sebagai sumber  $\alpha$ -glukosidase.

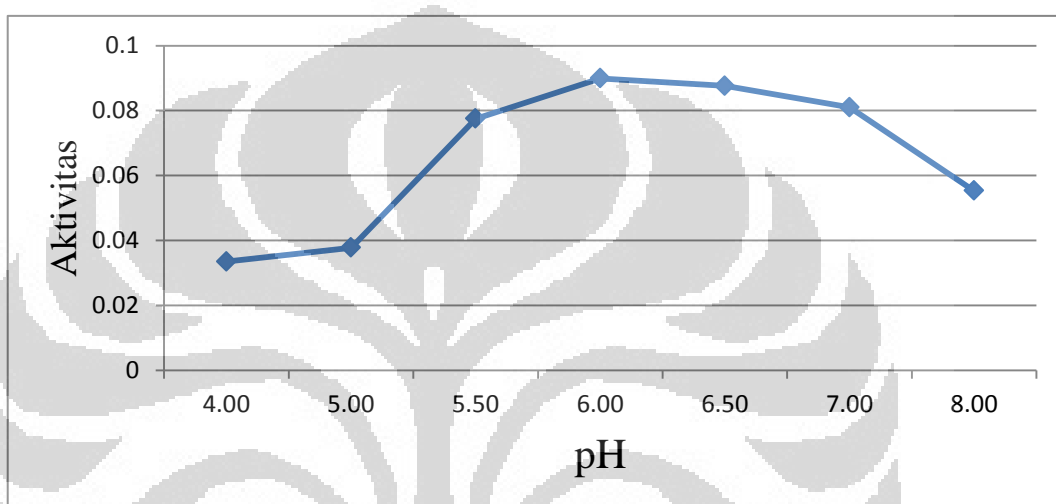
#### **4.3 Penentuan pH Buffer Optimum pada Ekstraksi Enzim Kasar dari TBL**

Tujuan percobaan ini adalah untuk mengetahui pada pH berapa aktivitas optimum  $\alpha$ -glukosidase yang terdapat dalam ekstrak enzim kasar yang diperoleh dari sampel TBL. Variasi pH yang digunakan dalam proses perendaman sampel tepung adalah untuk pH 4,00; 5,00; 5,50 (dengan buffer asetat), pH 6,00; 6,50; 7,00; dan 8,00 (dengan buffer fosfat). Penggunaan jenis buffer yang berbeda disebabkan karena masing-masing buffer memiliki kapasitas buffer yang berbeda-beda, buffer fosfat memiliki kapasitas minimum pH 5,6 sedangkan buffer asetat pH 3,5. Ketujuh nilai tersebut dipilih karena nilai tersebut berada pada sekitar rentang  $\pm 1$  dari pKa<sub>2</sub> dari buffer fosfat yang digunakan yaitu 6,8 dan  $\pm 1$  dari pKa buffer asetat yaitu 4,7<sup>16</sup>.



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

pH	Aktivitas (mU/mL)
4,00	33,5
5,00	37,8
5.50	77,5
<b>6,00</b>	<b>89,9</b>
6.50	87,6
7,00	81,0
8,00	55,3

Gambar 4.3 Grafik variasi pH terhadap aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase

Pada gambar 4.3 dapat dilihat bahwa aktivitas enzim yang paling tinggi diperoleh pada ekstrak enzim kasar dengan buffer fosfat pH 6 yaitu sebesar 89,9 mU/mL. pH optimum yang diperoleh sesuai dengan lingkungan di mana enzim tersebut berasal. Beras lapuk yang berperan sebagai sumber enzim ini diperkirakan memiliki suasana pH sedikit asam. Hal ini disebabkan karena jamur dan kutu beras yang terdapat pada beras lapuk dapat memproduksi senyawa-senyawa bersifat asam<sup>18</sup>. Namun pada pH di atas 6,5 terlihat aktivitas enzim mengalami sedikit penurunan.

#### 4.4 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Glukosidase dengan Metode Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat

Pada penelitian tahap berikutnya, dilakukan isolasi enzim kasar dari TBL IR 46 pada pH buffer 6. Ekstrak kasar enzim yang diperoleh, selanjutnya dimurnikan dengan fraksinasi bertingkat menggunakan garam amonium sulfat.

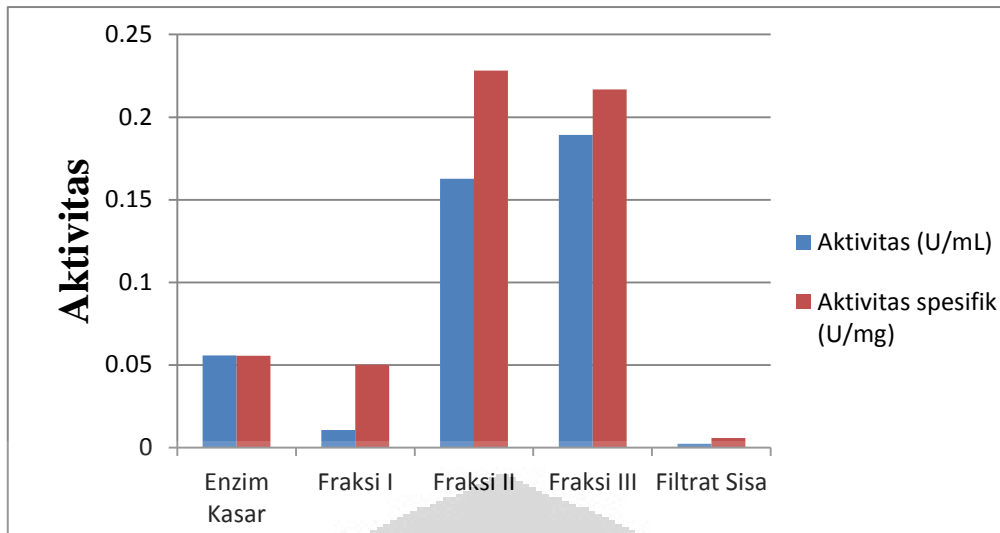
Garam yang paling umum digunakan untuk pemurnian enzim adalah garam yang meningkatkan hidrasi daerah hidrofil dan dehidrasi daerah hidrofob pada protein. Anion yang masuk ke dalam kategori ini adalah anion polivalen seperti sulfat. Untuk kation dipilih yang tidak memiliki kemungkinan untuk mengadakan kompleks dengan protein, maka semua ion metal polivalen tidak dapat digunakan. Oleh karena itu, garam yang dipakai pada penelitian ini adalah ammonium sulfat karena memenuhi semua kriteria di atas<sup>6</sup>.

Dengan 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>6</sup>.

Pada percobaan ini dilakukan fraksinasi 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  $\alpha$ -glukosidase dan ditentukan kadar proteinnya untuk menentukan aktivitas dan aktivitas spesifik enzim.

Tabel 4.3 Data hasil fraksinasi enzim  $\alpha$ -Glukosidase dengan Ammonium Sulfat

Tahapan Pemurnian	Aktivitas m(U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (mU/mg)	Tingkat Kemurnian
Enzim Kasar	55,7	1,0034	55,4	1
Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat				
Fraksi I (0-20%)	10,5	0,2098	50,1	0,8967
<b>Fraksi II (20-50%)</b>	<b>162,7</b>	<b>0,7131</b>	<b>228,2</b>	<b>4,1130</b>
Fraksi III (50-70%)	189,2	0,8733	216,7	3,9048
Filtrat Sisa	2,3	0,4058	5,8	0,1037



Gambar 4.4 Grafik tahapan fraksinasi ammonium sulfat terhadap aktivitas dan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -Glukosidase

Pada tabel 4.3 dapat dilihat bahwa aktivitas spesifik tertinggi terdapat pada fraksi II (20-50%) diikuti dengan fraksi III (50-70%) yaitu 228,2 mU/mg dan 216,7 mU/mg dengan tingkat kemurnian secara berurutan 4,1130 kali lipat dan 3,9048 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<sup>17</sup>. 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.

#### 4.5 Dialisis dan Penentuan pH Optimum Enzim

Pada percobaan selanjutnya, terhadap Fraksi II ammonium sulfat 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 4.4 dapat dilihat aktivitas enzim pada saat sebelum dan setelah dialisis.

Tabel 4.4 Data Aktivitas Enzim Sebelum dan Sesudah Dialisis

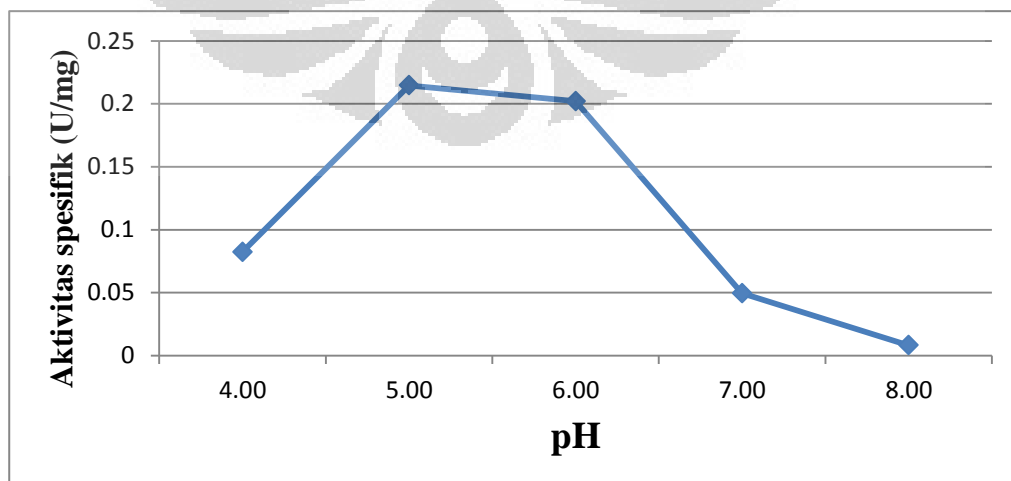
	Aktivitas (mU/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Akt. Spesifik (mU/mg)
Fraksi 20-50% sebelum dialisis	194,3	1,2843	151,3
<b>Fraksi 20-50% setelah dialisis</b>	<b>295,1</b>	<b>1,2352</b>	<b>238,9</b>

Dari data pada tabel 4.4 terlihat bahwa kadar protein daridialisis mengalami penurunan. Hal ini terjadi 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.

Untuk menentukan pH optimum enzim, maka enzim hasil dialisis ditambahkan ke dalam larutan buffer dengan variasi pH 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00. Pada tabel 4.5 dapat dilihat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase pada berbagai nilai pH buffer.

Tabel 4.5 Aktivitas enzim hasil dialisis pada berbagai nilai pH

pH	Aktivitas m(U/mL)	Akt. Spesifik (mU/mg)
4,00	101,6	82,3
<b>5,00</b>	<b>265,1</b>	<b>214,6</b>
6,00	249,6	202,0
7,00	61,1	49,5
8,00	10,1	8,2



Gambar 4.5 Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas enzim hasil dialisis

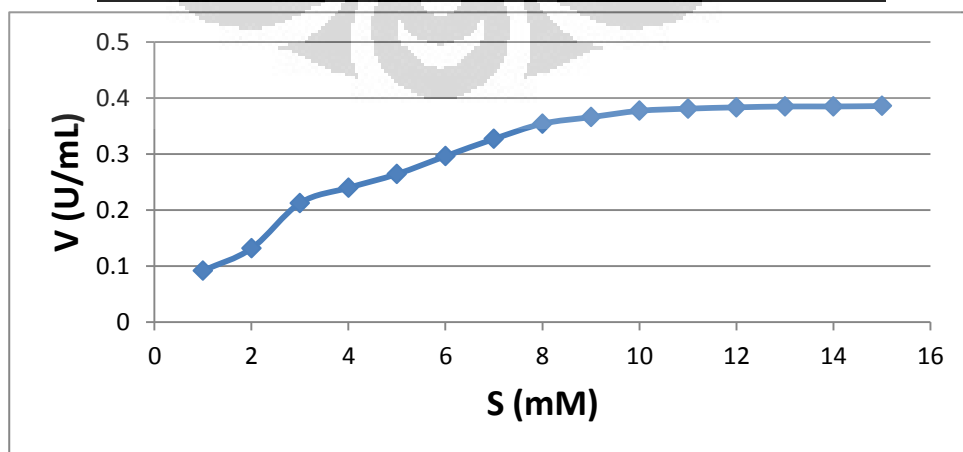
Pada gambar 4.5 dapat dilihat aktivitas enzim pada pH 4 masih rendah, kemudian meningkat dan mencapai optimum pada pH 5,00. Aktivitas enzim terus menurun dari pH 6,00 sampai pH 8,00.

#### 4.6 Penentuan Parameter Kinetika Enzim

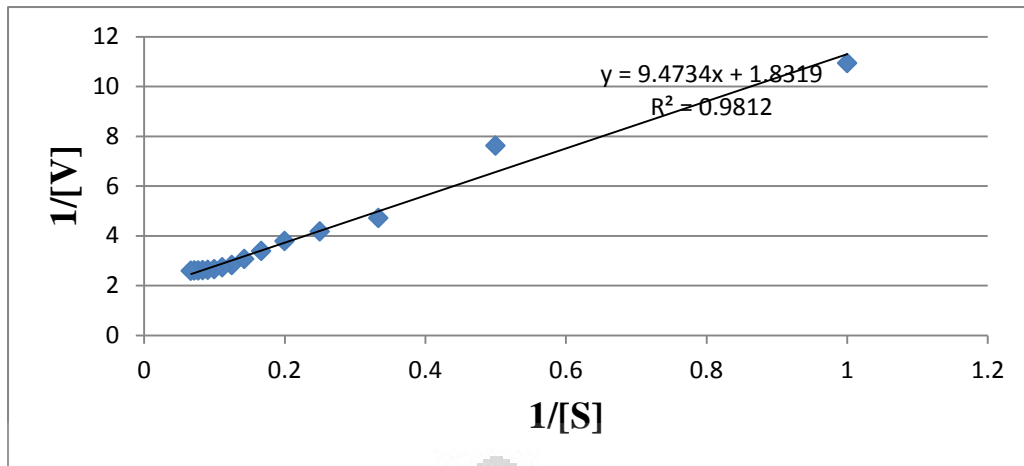
Untuk menentukan parameter kinetika enzim, nilai yang perlu diketahui adalah  $K_m$  dan  $V_{max}$ . Pada percobaan, substrat PNPg divariasikan dengan konsentrasi antara 1 mM – 15 mM, kemudian dilakukan uji aktivitas seperti prosedur sebelumnya.

Tabel 4.6 Aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase pada berbagai konsentrasi substrat

S (mM)	Aktivitas (U/mL) (V)	1/S	1/V
1	0,0915	1	10,9295
2	0,1312	0,500	7,6214
3	0,2122	0,333	4,7127
4	0,2394	0,250	4,1763
5	0,2640	0,200	3,7882
6	0,2959	0,167	3,3795
7	0,3267	0,143	3,0613
8	0,3539	0,125	2,8255
9	0,3656	0,111	2,7353
10	0,3769	0,100	2,6533
11	0,3808	0,091	2,6262
12	0,3831	0,083	2,6102
13	0,3847	0,077	2,5996
14	0,3847	0,071	2,5996
15	0,3854	0,067	2,5943



Gambar 4.6 Grafik hubungan antara [S] terhadap [V]



Gambar 4.7 Grafik hubungan antara  $1/[S]$  terhadap  $1/[V]$

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  $37^\circ\text{C}$ . Hubungan antara  $[S]$  dan  $[V]$  dapat dilihat pada gambar 4.6. Nilai  $V$  meningkat sejalan dengan besarnya konsentrasi  $[S]$ , tetapi pada konsentrasi  $11\text{ mM}$  dan seterusnya, nilai  $V$  menjadi konstan. Untuk menentukan nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$ , digunakan persamaan kurva *Lineweaver-Burk*:  $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$

Persamaan garis regresi grafik hubungan antara  $1/[S]$  dan  $1/[V]$  (tabel 4.6) dapat dilihat pada gambar 4.7. Dari persamaan regresi  $Y=9,4734X + 1,8319$ , maka diperoleh  $1,8319=1/V_{max}$  sehingga  $V_{max} = 0.55\text{ mM/menit}$  dan  $9,4734=K_m/V_{max}$  sehingga  $K_m=5,17\text{ mM}$ .

Aktivitas enzim  $\alpha$ -Glukosidase pada percobaan terus meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, tetapi menjadi konstan ketika substrat terus-menerus ditingkatkan. Hal ini terjadi karena suatu reaksi enzimatis akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat  $[S]$ , akan tetapi setelah  $[S]$  meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Kondisi dimana kecepatan enzimatis tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya  $[S]$  disebut kecepatan maksimum ( $V_{max}$ )<sup>8</sup>. Penentuan nilai  $V_{max}$  akan menghasilkan nilai  $K_m$  yaitu kecepatan reaksi enzimatis ketika telah mencapai setengah dari kecepatan maksimum. Apabila nilai  $K_m$  kecil, berarti afinitas enzim terhadap substrat tinggi sedangkan jika nilai  $K_m$  besar afinitas enzim terhadap substrat rendah. Harga  $K_m$

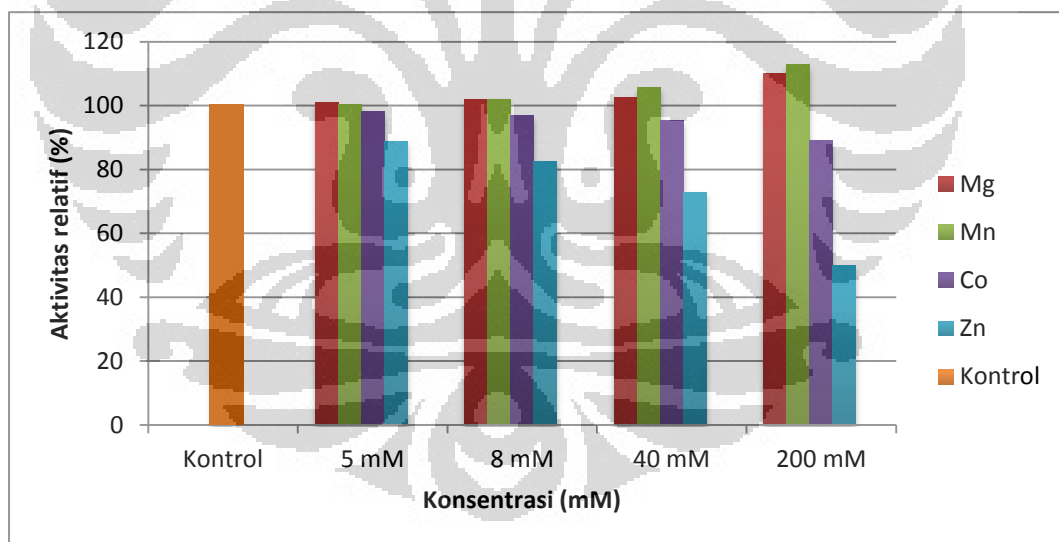
enzim sangat bervariasi tergantung dari jenis substrat, keadaan lingkungan, dan kekuatan ion.

#### 4.7 Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Aktivitas Enzim $\alpha$ -glukosidase

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah di antaranya adalah inhibitor dan aktivator dari ion logam.  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , dan  $Zn^{2+}$  diduga dapat menaikkan dan menurunkan aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase.<sup>25</sup> Berikut ini merupakan hasil uji pengaruh ion logam terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase.

Tabel 4.7 Data pengaruh ion-ion logam pada berbagai konsentrasi

Logam	Aktivitas Spesifik (U/mg)				Aktivitas relatif (%)			
	5 mM	8 mM	40 mM	200 mM	5 mM	8 mM	40 mM	200 mM
Mg	0,185	0,186	0,187	0,201	100,91	101,82	102,46	110,03
Mn	0,184	0,187	0,193	0,207	100,37	102,06	105,74	112,94
Co	0,179	0,177	0,174	0,163	98,09	96,81	95,35	89,06
Zn	0,163	0,151	0,133	0,092	88,88	82,5	72,93	50,05
Kontrol	0,183							



Gambar 4.8 Grafik hubungan antara variasi konsentrasi logam terhadap %inhibisi aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk IR 46

Pada tabel 4.7 dapat dilihat bahwa  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$  meningkatkan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan bertambahnya konsentrasi. Kenaikan aktivitas tertinggi didapatkan pada konsentrasi 200 mM untuk  $Mn^{2+}$  aktivitas relatifnya naik menjadi

112,94 % disusul dengan  $Mg^{2+}$  sebesar 110,03%. Sedangkan pada  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  terjadi penurunan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dengan bertambahnya konsentrasi. Penurunan terkecil terjadi pada  $Zn^{2+}$  pada konsentrasi 200 mM dengan aktivitas relatif turun menjadi 50,05 % diikuti dengan  $Co^{2+}$  dengan aktivitas relatif turun menjadi 89,06%. Hasil tersebut dapat diperjelas dengan melihat gambar 4.8. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa  $Mg^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  berperan sebagai kofaktor  $\alpha$ -glukosidase sedangkan  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  berperan sebagai inhibitor  $\alpha$ -glukosidase.

#### 4.8 Pengaruh Senyawa Inhibitor Ekstrak Buah Mahkota Dewa dan Quersetin terhadap Aktivitas $\alpha$ -Glukosidase

Tujuan percobaan ini adalah untuk menguji kemampuan inhibisi dari ekstrak buah mahkota dewa dan senyawa Quersetin terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase hasil pemurnian parsial. Adanya efek inhibisi terhadap aktivitas  $\alpha$ -glukosidase dari kedua sampel inhibitor tersebut dapat dilihat dari penurunan serapan dan intensitas warna kuning yang terbentuk setelah dibandingkan dengan larutan control. Pada uji aktivitas, enzim  $\alpha$ -glukosidase akan menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (PNPG) menjadi glukosa dan *p*-nitrofenol yang berwarna kuning. Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil absorbansi *p*-nitrofenol yang berwarna kuning<sup>19</sup>.

Pada penelitian ini sebagai inhibitor digunakan quersetin dan ekstrak mahkota dewa. Quersetin adalah bahan alam yang diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase lebih besar dari pada Acarbosa, yaitu obat yang biasa digunakan oleh penderita diabetes untuk menurunkan kadar glukosa dalam darah.

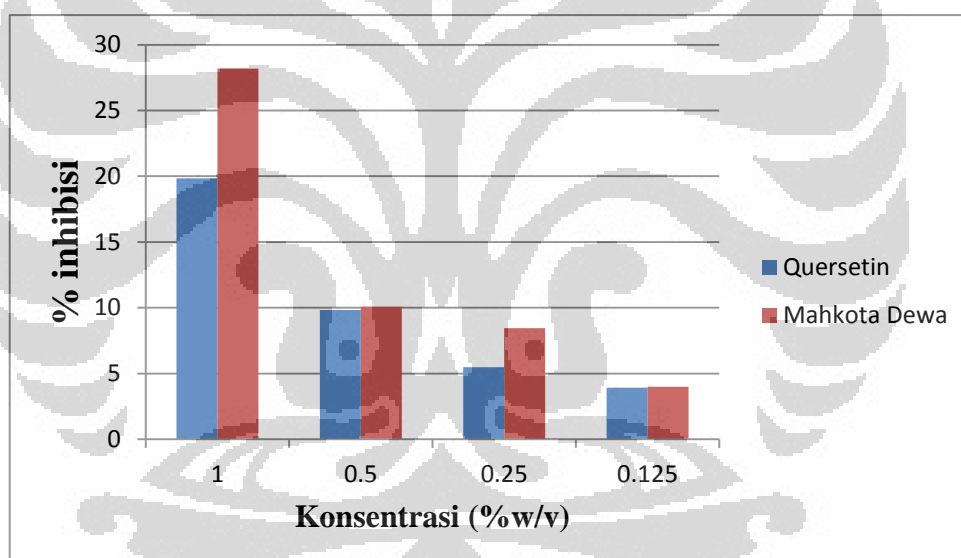
Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan tanaman yang berasal dari Papua dan telah lama digunakan secara tradisional sebagai alternatif obat antidiabetes dan penyakit lain seperti kanker, liver, reumatik, ginjal, jantung, dan hipertensi. Oleh karena itu, perkembangan ilmu pengetahuan untuk membuktikan aktivitas hipoglikemik pada tanaman ini dengan uji inhibisi terhadap  $\alpha$ -glukosidase sangat penting<sup>14</sup>. Data absorbansi dan persen inhibisi dari hasil uji inhibisi  $\alpha$ -glukosidase dengan quersetin dapat dilihat pada Tabel 4.8.



Tabel 4.8 Data serapan dan persen inhibisi  $\alpha$ -glukosidase mahkota dewa dan quersetin pada enzim  $\alpha$ -glukosidase hasil pemurnian parsial dari beras lapuk

Mahkota Dewa	
K (% w/v)	% Inhibisi
1%	28,20
0.5%	10,10
0.25%	8,44
0.125%	1,57

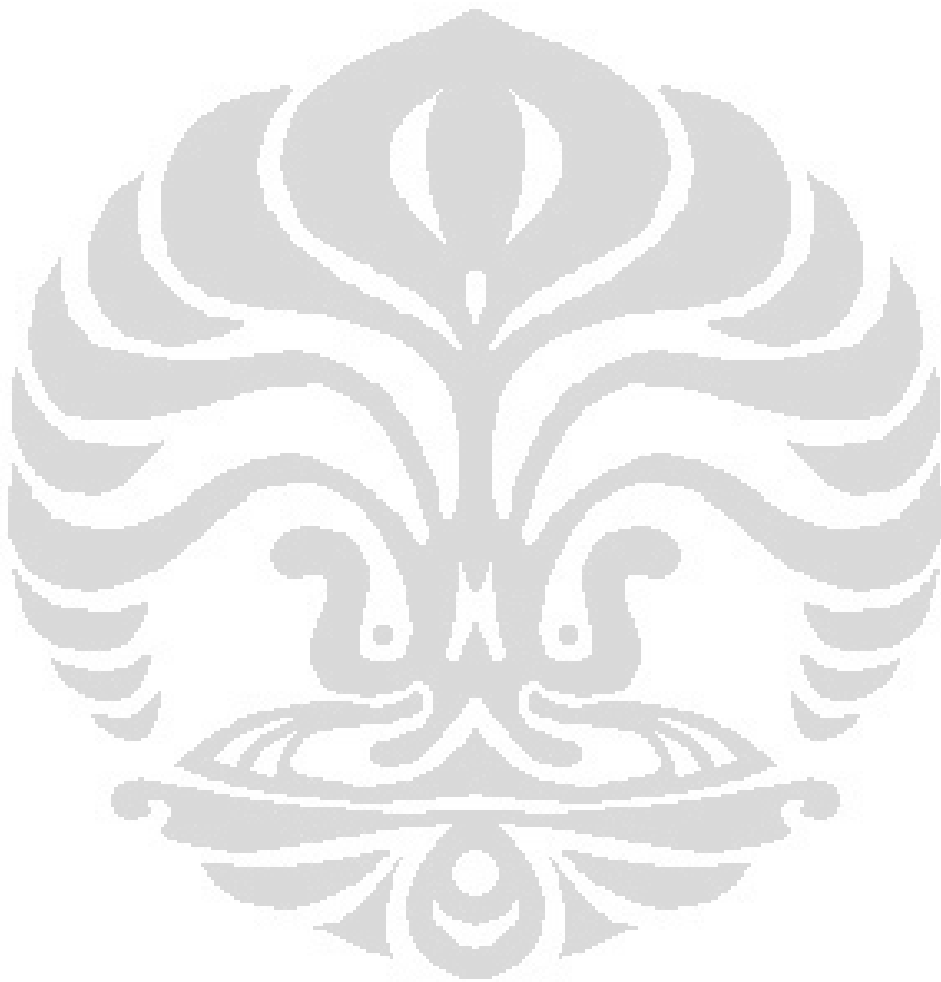
Quersetin	
K (% w/v)	% Inhibisi
1%	19,84
0.5%	9,84
0.25%	5,48
0.125%	3,92



Gambar 4.9 Data serapan dan persen inhibisi  $\alpha$ -glukosidase mahkota dewa dan quersetin dengan enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk

Dari data pada Tabel 4.8 dapat dilihat bahwa quersetin dan ekstrak mahkota dewa dapat menginhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase yang ditandai dengan terjadinya penurunan serapan dibandingkan dengan kontrol (yang telah dikurangi blanko). Contoh perhitungan dapat dilihat pada lampiran 11. Pada ekstrak buah mahkota dewa dan quersetin, kadar 1% memiliki persen inhibisi tertinggi sebesar 28,29% dan 19,84%. Namun daya inhibisinya menurun sebanding dengan penurunan kadar konsentrasi pada kedua senyawa inhibitor tersebut. Ekstrak buah mahkota dewa

mempunyai persen inhibisi lebih tinggi dari quersetin, artinya ekstrak buah mahkota dewa memiliki efek antihiperlikemik lebih baik daripada quersetin.



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

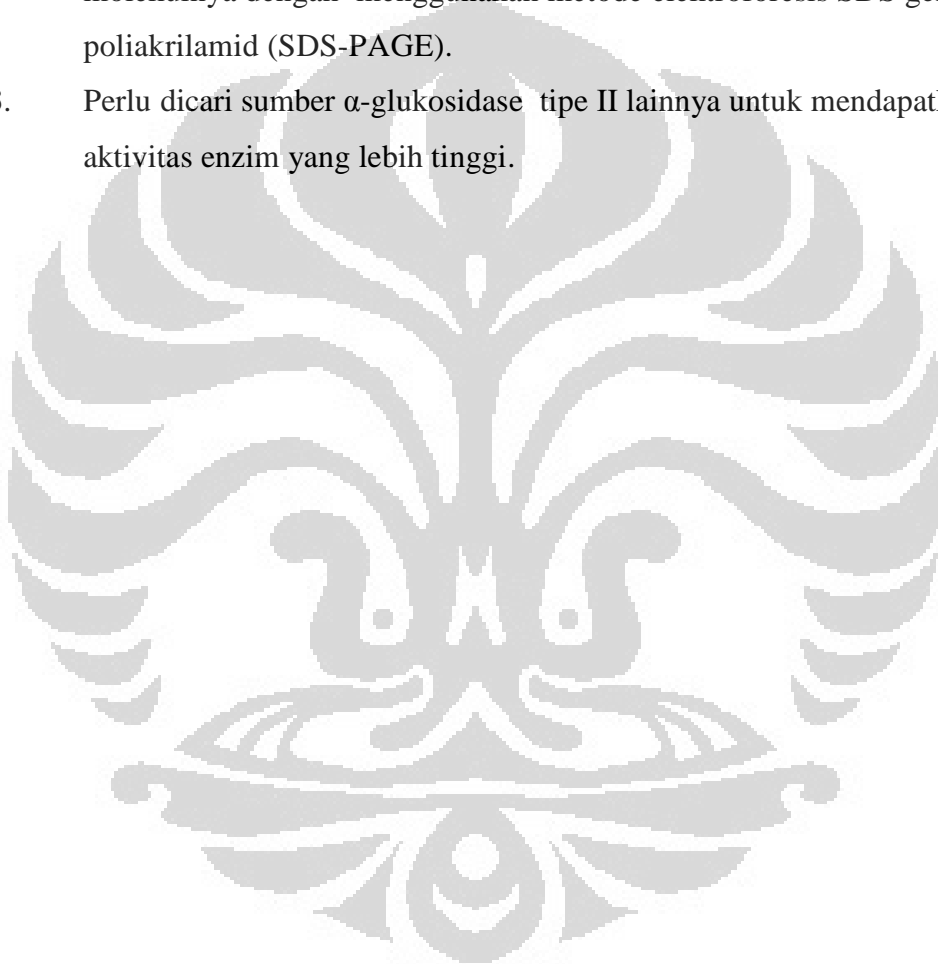
#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Dari sembilan sumber enzim yang digunakan yaitu Tepung beras baru Sarinah (TBBS), tepung beras lapuk Sarinah (TBLS), tepung dedak Sarinah (TDS), tepung beras baru IR 64 (TBB IR 64), tepung beras lapuk IR 64 (TBL 64), tepung dedak IR 64 (TD IR 64), tepung beras baru IR 46 (TBB IR 46), tepung beras lapuk IR 46 (TBL IR 46), tepung dedak IR 46 (TD IR 46), yang memiliki aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase tertinggi adalah tepung beras lapuk IR 46 (TBL IR 46) sebesar 90,3 mU/mL.
2. Aktivitas spesifik ekstrak kasar  $\alpha$ -glukosidase dapat ditingkatkan setelah dimurnikan melalui fraksinasi dengan ammonium sulfat sebesar 4,113 kali enzim kasar. Aktivitas spesifik tertinggi terdapat pada fraksi II (20-50%) ammonium sulfat yaitu sebesar 228,2 mU/mg.
3. Enzim  $\alpha$ -glukosidase yang diperoleh pada fraksi II setelah didialisis memiliki aktivitas spesifik sebesar 238,9 mU/mg dan pH optimum 5,00.
4. Enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk IR 46 memiliki nilai  $V_{max}$  = 0,55 dan  $K_m$  = 5,17 mM.
5.  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$  merupakan aktivator enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan meningkatkan aktivitas relatif  $\alpha$ -glukosidase sebesar 110,03% dan 112,94% pada konsentrasi 200 mM, sedangkan  $Co^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  merupakan inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase dengan menurunkan aktivitasnya masing-masing sebesar 89,06% dan 50,05% pada konsentrasi 200 mM.
6. Quersetin dan ekstrak mahkota dewa dengan kadar 1% memiliki persen inhibisi masing-masing sebesar 19,84% dan 28,20%.

## 5.2 Saran

1. Untuk mendapatkan enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi perlu dilakukan tahap pemurnian lebih lanjut dengan metode lain seperti kromatografi kolom penukar ion dan kromatografi kolom gel filtrasi .
2. Untuk menentukan jenis enzim  $\alpha$ -glukosidase tipe I atau tipe II perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut seperti antara lain ditentukan berat molekulnya dengan menggunakan metode elektroforesis SDS gel poliakrilamid (SDS-PAGE).
3. Perlu dicari sumber  $\alpha$ -glukosidase tipe II lainnya untuk mendapatkan aktivitas enzim yang lebih tinggi.

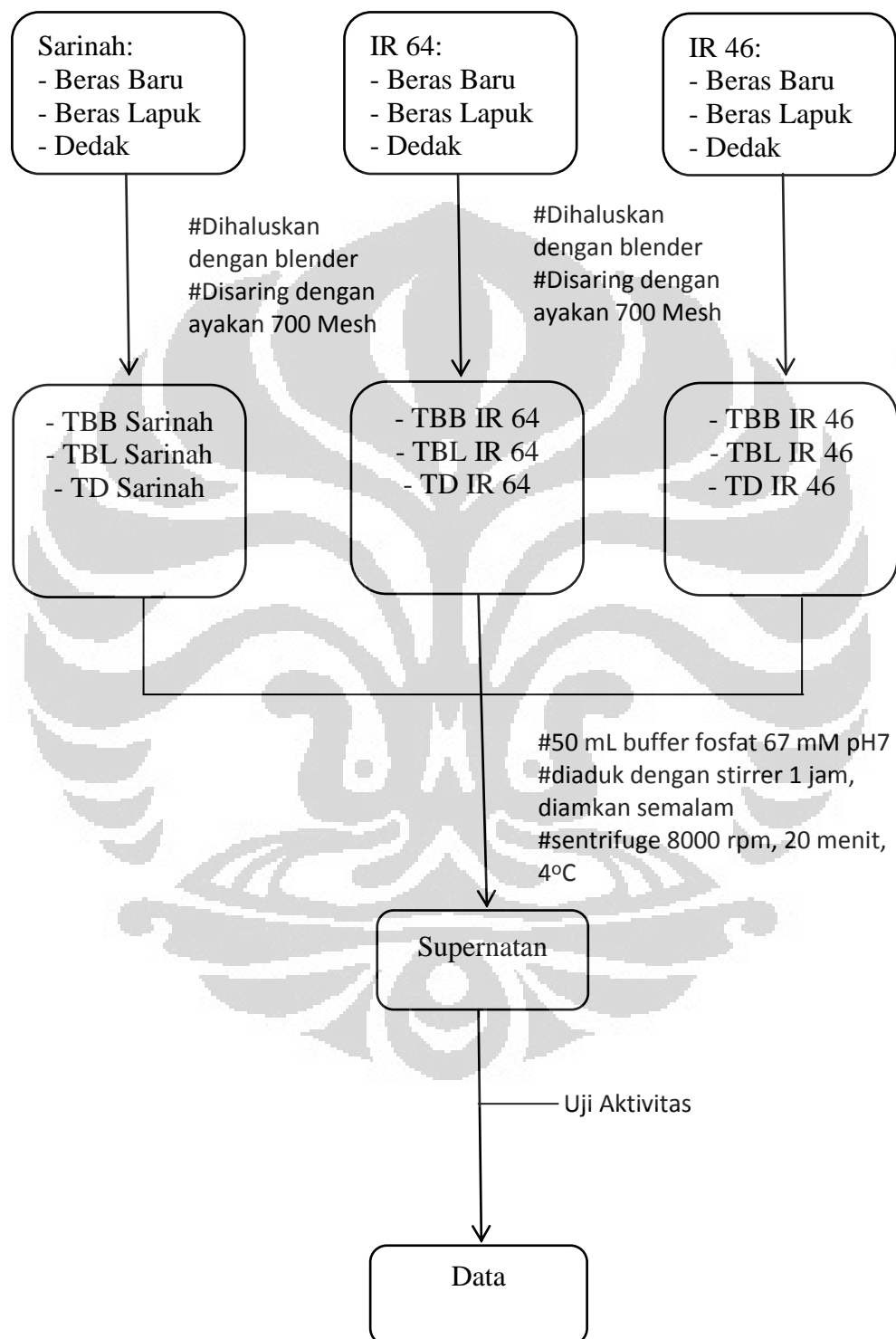


## DAFTAR REFERENSI

1. 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.
2. 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: 1035-1040.12,27
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. Investasi Padi. [www.garutkab.go.id/galleries/pdf link/ekonomi/investasi/Padi.pdf](http://www.garutkab.go.id/galleries/pdf_link/ekonomi/investasi/Padi.pdf). Tanggal 23 November 2011. Pukul 20:08 WIB.
5. Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* 5nd ed. New York : W.H. Freeman and Company.
6. Palmer, T. (1991). *Understanding Enzymes* 3rd ed. West Sussex: Ellis Horwood Limited.6,8,10,15,17 30,31
7. *Introduction to Enzymes*.<http://themedicalbiochemistrypage.org/enzyme-kinetics.html>. Tanggal 23 November 2011. Pukul 23:50 WIB
8. Putra, G.P.G. Penentuan Kinetika Enzim Poligalakturonase (PG) Endogenous dari Pulp Biji Kakao. 2009. *Jurnal Biologi* (1):21-24. Bali: Universitas Udayana
9. Nakai et al. (2007) Multiple Forms of  $\alpha$ -Glucosidase in Rice Seeds (*Oryza sativa* L., var *Nipponbare*). *Biochimie.*, 89, 49-62.13,21
10. Dennison, C. (2002). *A Guide to Protein Isolation*. New York: Kluwer Academic Publisger.14,26
11. Scopes, R. K. (1994). *Protein Purification: Principles and Practice* 3rd ed. New York: Springer-Verlag.16,18,19,33

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 21 Agustus 2011. Pukul 17:08 WIB.
13. Yamasaki Y, Haruyoshi K. (1992). Wall-Bound  $\alpha$ -Glucosidase of Suspension-Cultured Sugar-Beet Cells. *Phytochemistry*. 31:2605-2607.
14. Sugiwati, S., Setiasih, S., (2010). Antidiabetic Activity of Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Stem Extracts as An Inhibitor of Alpha-Glucosidase. Proceeding International Conference and Talk Show on Medical Plant; Jakarta 19<sup>th</sup>- 21th October 2010. Depok: Faculty of Math and Natural Science. Page 365-372.
15. Budiman, A., Isolasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Gabah (*Oryza sativa*). 2011. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Departemen Kimia, Universitas Indonesia.
16. Buffer:<http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/buffers>.Tanggal 10 Agustus. Pukul 02:32 WIB
17. Deutscher, M. P. (1990). *Methods in Enzymology vol 182: Guide to Protein Purification*. California: Academic Press.
18. *Tribolium Confusum*. <http://homepage.ntlworld.com/alan.cann/articles/Tribolium.html>. Tanggal 22 Desember 2011. Pukul 13.20 WIB.11
19. 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.
20. Bayer. 2004.Precose (Acarbose Tablets). <http://www.drugs.com/PDR/PrecoseTablets.html>. 22 Desember 2011. Pukul 14.05 WIB
21. 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

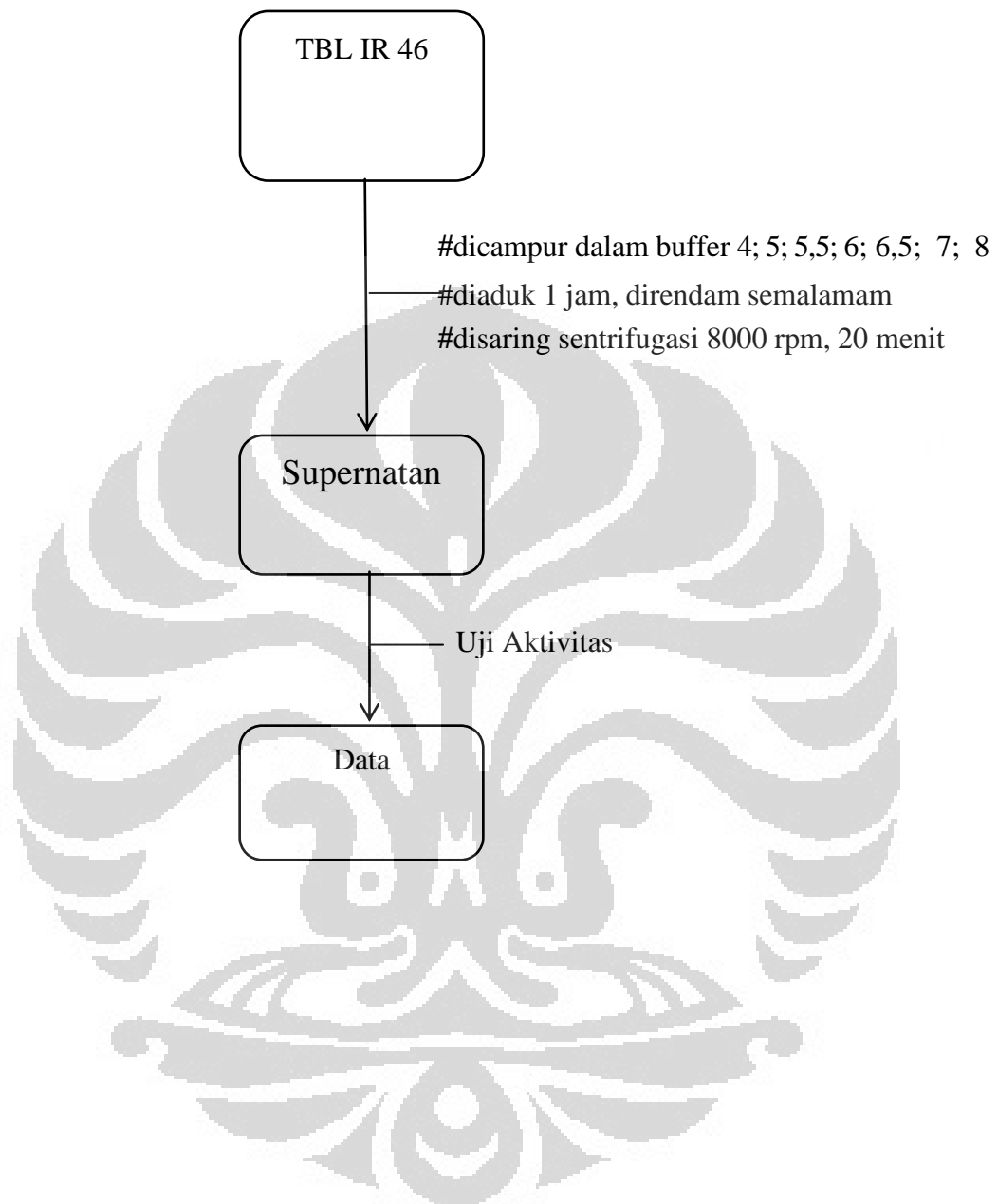
22. Enzymes. <http://www.karinya.com/enzymes.htm>. Tanggal 23 November 2011. Pukul 23.20 WIB.
23. Characteristics of Enzymes. <http://www.brenda-enzymes.org>. Tanggal 24 November 2011. Pukul 05.05 WIB.
24. Triana, R., Iskandar, Y., Hanafi, M., Kardono, L.B.S. 2010. Efek Inhibitor dari Ekstrak Etilasetat *Aspergillus terreus* terhadap  $\alpha$ -Glukosidase secara in vitro. Pusat Penelitian Kimia-LIPI, Puspiptek Serpong.
25. Li, B.K., Chan, K. Y. 1983. Production and Properties of  $\alpha$ -Glucosidase from *Lactobacillus acidophilus*. J. Env. Microbiology. Page 1380-1387
26. Bachhawat, A., Shihabudeen, M., Thirumurugan, K. 2011. Screening of Fifteen Indian Ayurvedic Plants for Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity and Enzyme Kinetics. J. of Pharmacy. India: University Vellore
27. Gupta, A., Gautam, S. 1993. Purification and Properties of an Extracellular  $\alpha$ -Glucosidase from The Thermophilic Fungus *Malbranchea sulfurea*. J. of Microbiology. Department of Bioscience: India. Page 963-967.
28. Rejeki, D., Asy'ari, M., Wuryanti. 2010. Pengaruh Ion  $Zn^{2+}$  terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri Halofilik Isolat *Bittern* Tambak Garam Madura. Semarang: Departemen Kimia Universitas Diponegoro.

**LAMPIRAN 1: Skema Prosedur Kerja****Preparasi Sampel sebagai Sumber Enzim dan Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim  $\alpha$ -Glukosidase**

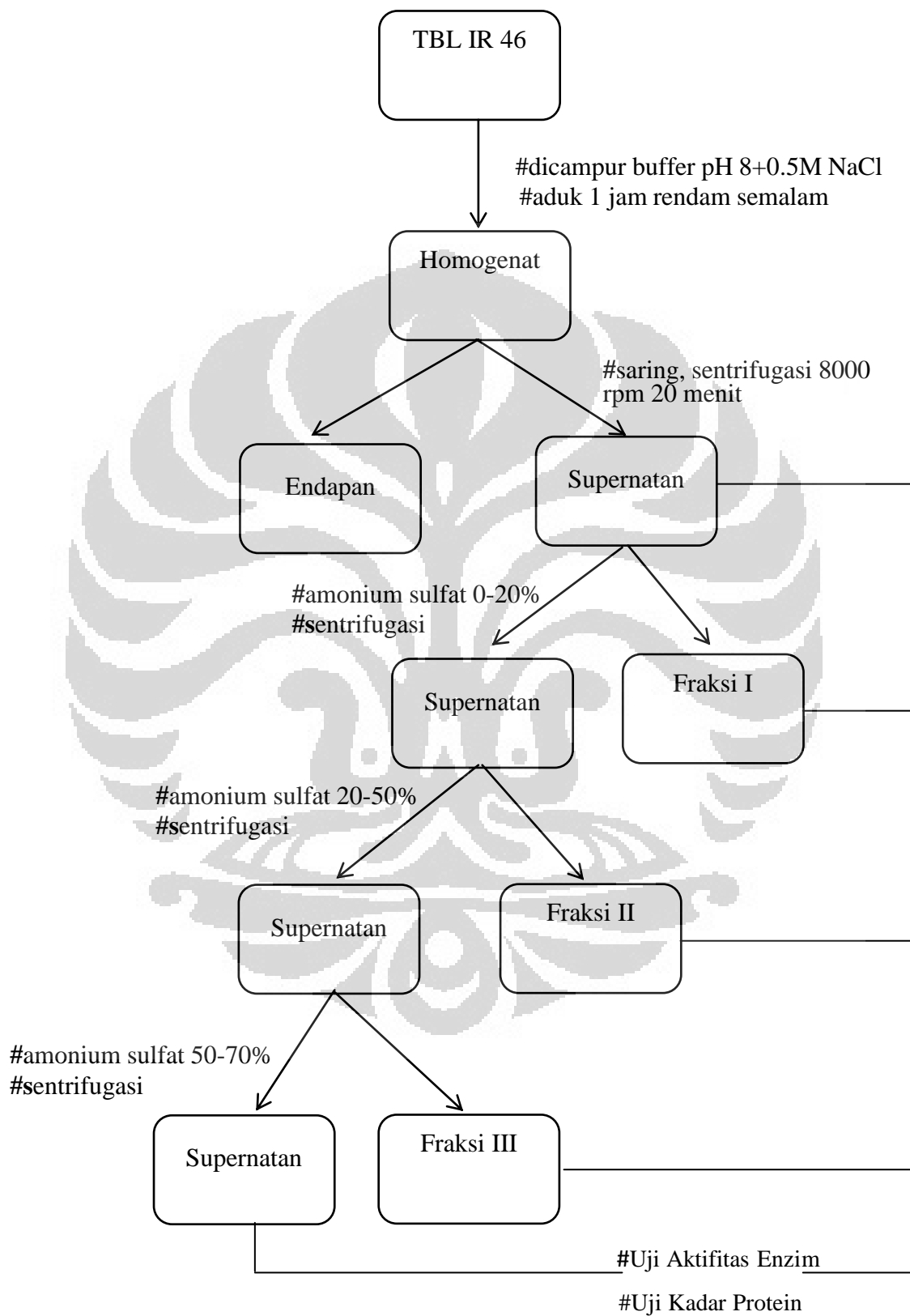


(Lanjutan)

**Penentuan pH Buffer Optimum pada Ekstraksi Enzim Kasar  $\alpha$ -Glukosidase**

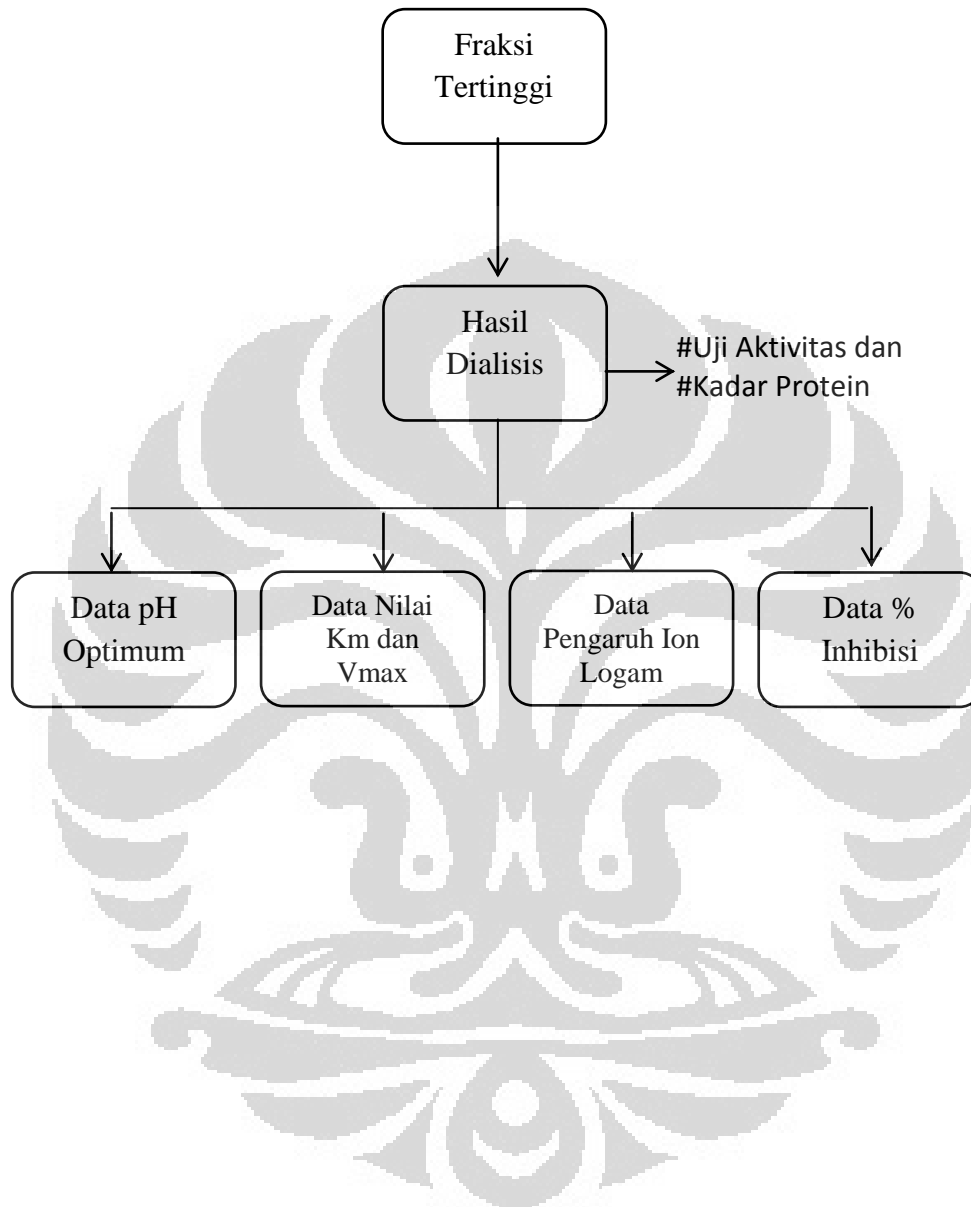


(Lanjutan)

Isolasi dengan *Salting Out*

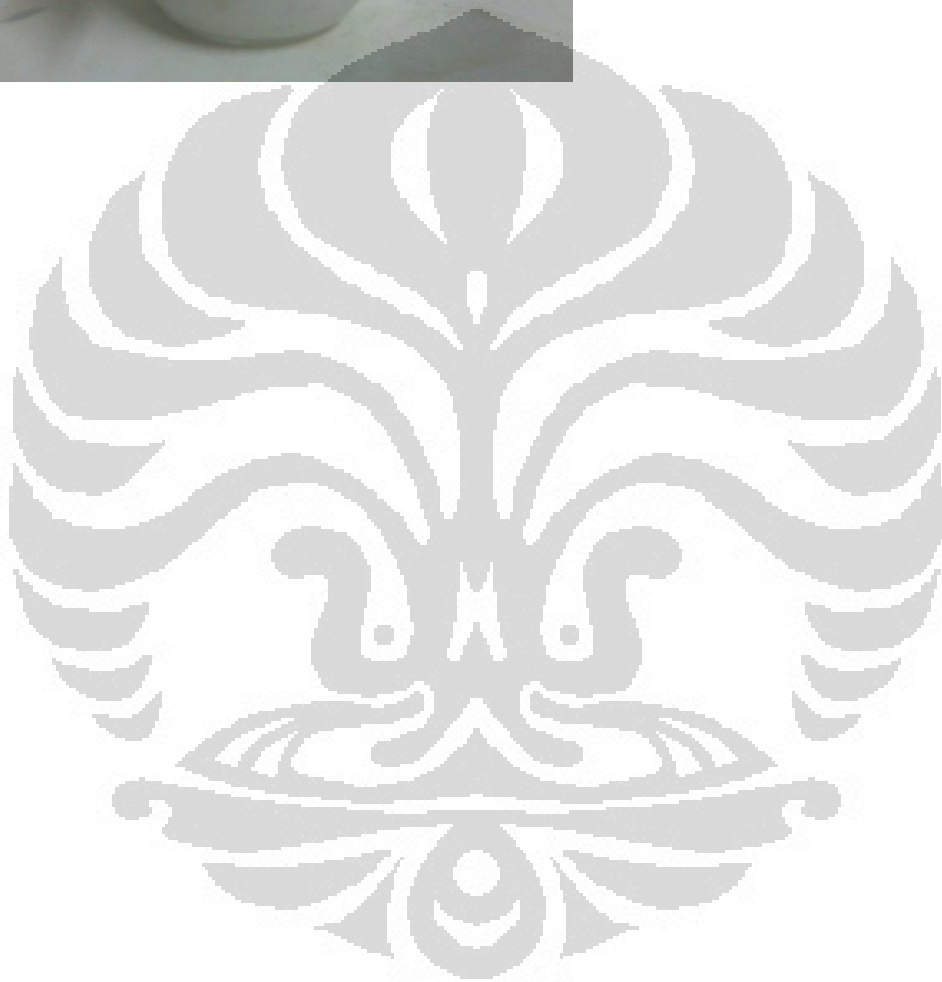
(Lanjutan)

**Dialisis, Penentuan pH optimum, Penentuan Nilai Km dan Vmax, Pengaruh Ion-ion Logam, dan Uji Inhibisi**



**LAMPIRAN 2: Beras Lapuk IR 46**



**LAMPIRAN 3: Homogenat tepung beras**

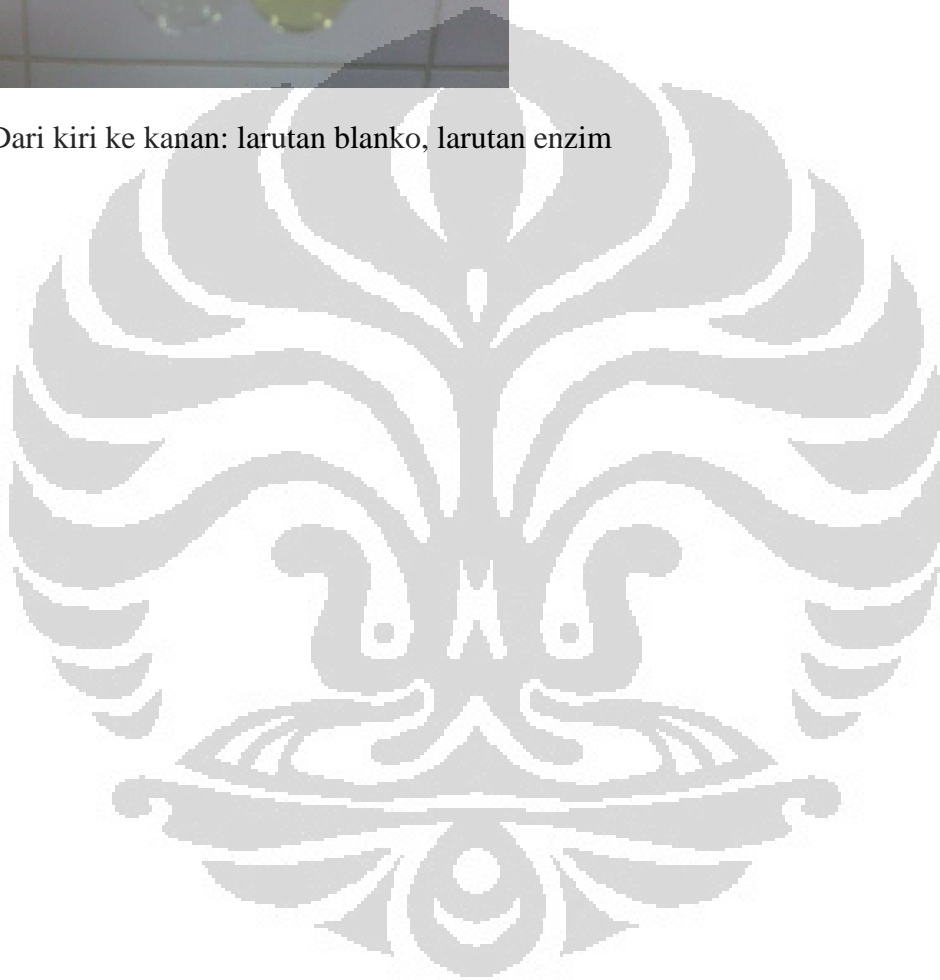
**LAMPIRAN 4: Supernatan pada optimasi pH buffer**

Dari kiri ke kanan: buffer pH 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8



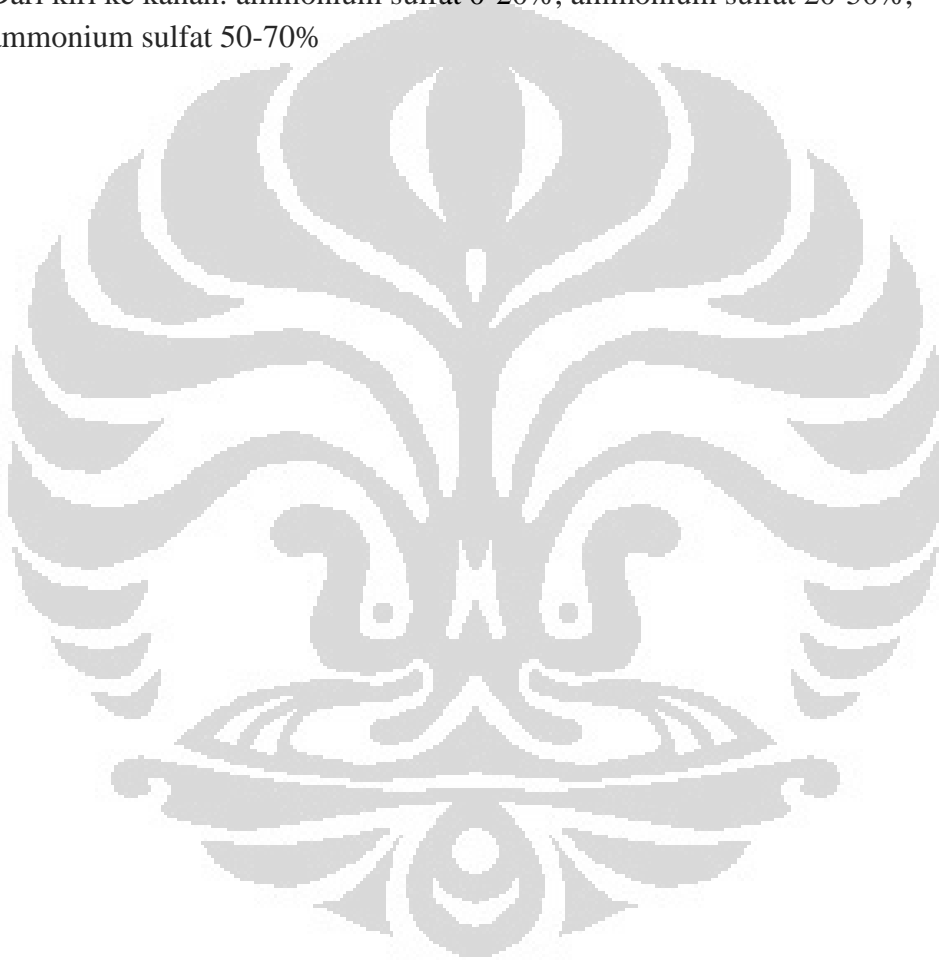
**LAMPIRAN 5: Uji aktivitas dengan penambahan substrat PNPG**

Dari kiri ke kanan: larutan blanko, larutan enzim

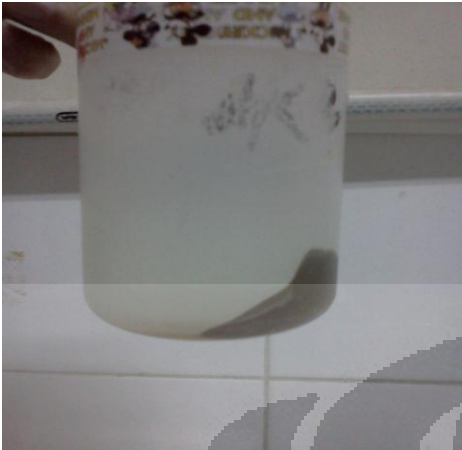


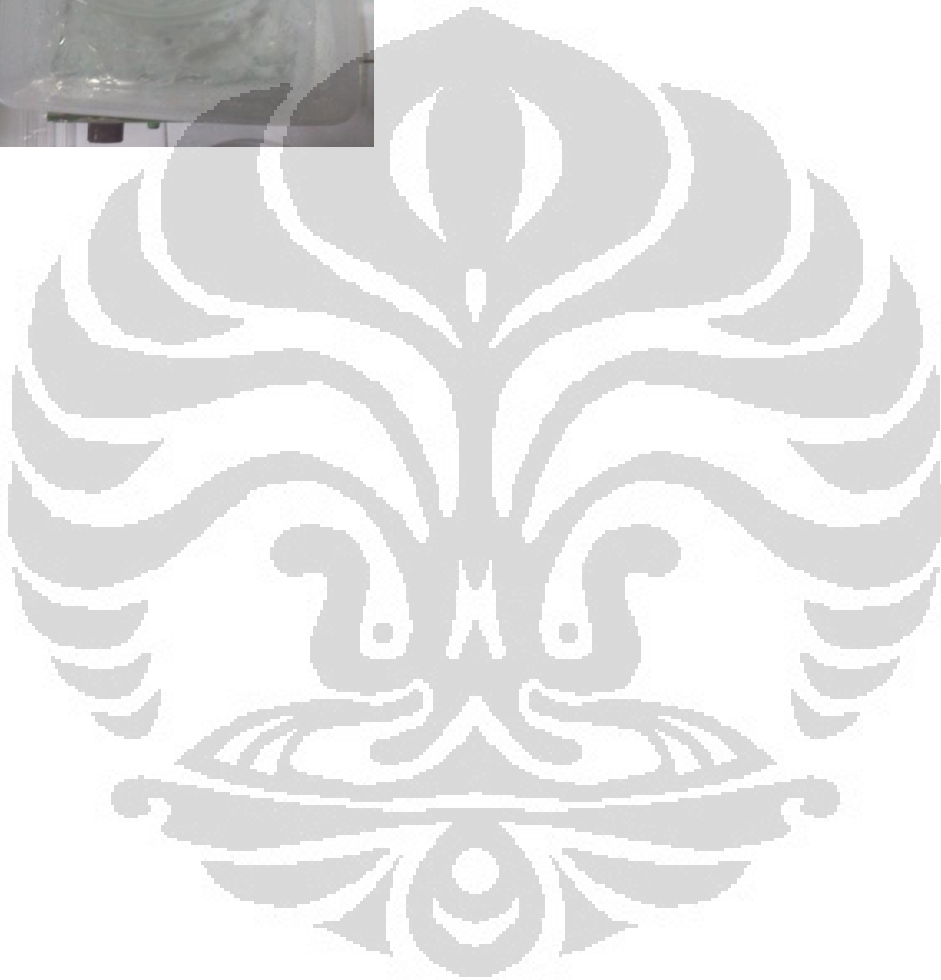
**LAMPIRAN 6: Supernatan pada *Salting out***

Dari kiri ke kanan: ammonium sulfat 0-20%, ammonium sulfat 20-50%, ammonium sulfat 50-70%





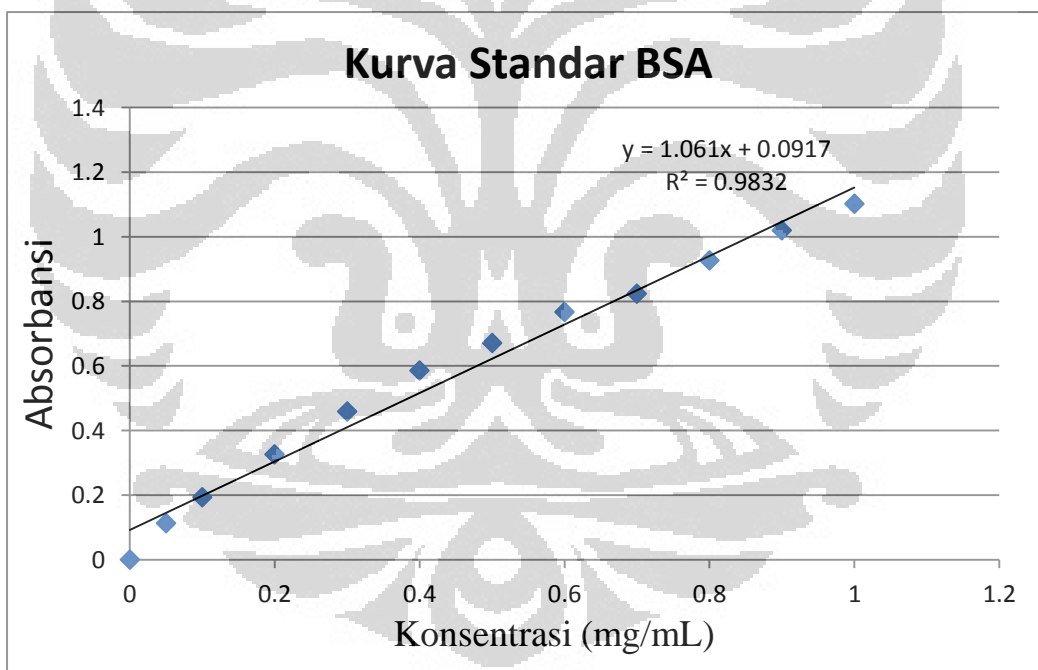
**LAMPIRAN 7: Endapan pada *Salting out***

**LAMPIRAN 8: Dialisis**

**LAMPIRAN 9: Gambar alat-alat yang digunakan***Hotplate**Stirrer**Vortex**Ultra Sentrifuge**Waterbath**Spektrofotometer UV/VIS  
Hitachi 2000*

**LAMPIRAN 10: Pengukuran Protein dengan Metode Lowry**

K (mg/mL)	Abs
0	0
0.05	0.113
0.1	0.194
0.2	0.326
0.3	0.459
0.4	0.586
0.5	0.671
0.6	0.767
0.7	0.824
0.8	0.927
0.9	1.02
1	1.102



**LAMPIRAN 11: Data Serapan Uji Inhibisi dan Contoh Perhitungan**

Mahkota Dewa		
K (% w/v)	As1-As0	% Inhibisi
1%	0.825	28.20
0.5%	1.033	10.10
0.25%	1.052	8.44
0.125%	1.131	1.57
Kontrol-Blanko = 1.149		

Quersetin		
K (% w/v)	As1-As0	% Inhibisi
1%	0.921	19.84
0.5%	1.036	9.84
0.25%	1.086	5.48
0.125%	1.104	3.92
Kontrol-Blanko = 1.149		

Pada quersetin dengan kadar 1% persen inhibisinya adalah:

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Inhibisi} &= \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}}) - (As_1 - As_0)}{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blanko}})} \times 100\% \\
 &= \frac{(1.149 - 0.921)}{(1.149)} \times 100\% \\
 &= 19,84 \%
 \end{aligned}$$

