

Original Research

Karakterisasi Enzim Pemecah Pati dari Malt Serelia

Alvina Cornelia Phieter ^{1*}, Ruth Chrisnasari ¹, Tjandra Pantjajani ¹

¹ Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Raya Kalirungkut Surabaya-Indonesia 60293

*corresponding author: alvina_cornelia@gmail.com

Abstract-Starch-degrading enzymes not only can be found in bacteria and fungi, but also in plants. Some plants that produce starch-degrading enzymes are germinated grain of sorghum, maize, and mung bean. pH and temperature are factors that can affect the activity of enzyme. Effect of pH and temperature to starch-degrading enzyme activity of these 3 cereal grains are reported in this research. Grain of sorghum, maize, and mung bean were germinated for 2 days and dried to produce malt. Enzymes from these 3 different malts were extracted using 7 buffers with different pH (4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7). Buffer that produced highest enzyme activity based on degradation of starch as a substrate (iodine-starch method) and based on formation of reducing sugars as products (DNS method) would be used for determining the effect of temperatures (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C). Effect of pH and temperatures to enzyme activity from 3 different malts tend to be fluctuating. Sorghum malt had the highest enzyme activity per gram malt based on degradation of starch activity test. Estimated enzyme activity of sorghum malt was $103,82 \text{ mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Maize malt had the highest enzyme activity based on formation of reducing sugars activity test. Estimated enzyme activity of maize malt was $13.08 \text{ mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Keywords: *amylase enzyme, sorghum malt, maize malt, mung bean malt, pH temperature*

Abstrak- Enzim pemecah pati dapat diperoleh dari tanaman selain dari bakteri dan fungi. Beberapa jenis tanaman yang memiliki enzim pemecah pati adalah biji sorgum, jagung, dan kacang hijau yang berkecambah. pH dan suhu merupakan beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas dari enzim. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim amilase dari ketiga jenis biji ini akan diamati dalam penelitian ini. Biji sorgum, jagung, dan kacang hijau dikecambahkan selama 2 hari dan dikeringkan untuk menghasilkan malt. Enzim dari ketiga jenis malt ini akan diekstrak menggunakan 7 buffer pH berbeda yaitu buffer pH 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5 dan 7. Buffer yang menghasilkan nilai aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi substrat pati (metode pati-iodin) dan berdasarkan pembentukan produk gula reduksi (metode DNS) akan digunakan lebih lanjut untuk melihat pengaruh suhu yaitu suhu 20 °C, 30 °C, 40 °C, dan 50 °C. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim ketiga jenis malt cenderung fluktuatif. Malt sorgum memiliki nilai aktivitas enzim per gram malt tertinggi berdasarkan uji aktivitas degradasi substrat pati (metode pati-iodin) yaitu $103,82 \text{ mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ dan malt jagung memiliki nilai aktivitas enzim per gram malt tertinggi berdasarkan uji aktivitas pembentukan gula reduksi (metode DNS) yaitu $13,08 \text{ mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Kata kunci: *amylase enzyme, sorghum malt, maize malt, mung bean malt, pH temperature*

PENDAHULUAN

United Nation Department of Economic and Social Affairs (UNDESA) memperkirakan populasi orang di dunia akan berkembang dari 6,9 milyar ke 9,1 milyar dan permintaan pangan akan meningkat 70% pada tahun 2050. Kualitas dari makanan dapat ditingkatkan dengan menggunakan enzim dalam industri pangan. Biomolekul ini dapat meningkatkan kualitas dari makanan seperti rasa, aroma, warna, tekstur, penampilan, dan kandungan nutrisi. Aplikasi enzim dalam bidang industri pangan dapat dibedakan menjadi beberapa sektor seperti *baking*, produksi jus, dan pembuatan bir (Singh & Kumar, 2016).

Berdasarkan data Badan Pusat Statistik yang diolah oleh Bizteka-CCI (2016), impor enzim di Indonesia dari tahun 2012-2016 meningkat dengan laju 11,95% per tahun. Pada tahun 2016, impor enzim di Indonesia mencapai 5.707 ton. Menurut Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) pada tahun 2015, kebutuhan enzim di Indonesia sekitar 99% dipenuhi dengan jalan mengimpor dari negara lain. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian dalam negeri untuk menghasilkan enzim sehingga kebutuhan dalam negeri dapat dipenuhi tanpa impor.

Salah satu jenis grup enzim yang sering digunakan adalah grup enzim pemecah/degradasi pati yang terdiri dari endoamilase, eksoamilase, *debranching enzymes*, dan transferase. Amilase adalah salah satu enzim yang penting dan menguasai sekitar 25% dari

pasar enzim dunia (Souza & Magalhaes, 2010). Amilase digunakan secara luas pada industri pangan seperti *baking*, pembuatan bir, produksi dari kue, jus buah, dan sirup pati.

Enzim pemecah pati dapat ditemukan pada biji serealia berkecambah, bakteri, fungi, dan hewan (Gupta *et al.*, 2008). Produksi amilase terbatas pada beberapa jenis dari bakteri dan fungi. Oleh karena itu, biji serealia berkecambah dapat menjadi salah satu sumber enzim amilase yang dapat digunakan. Malt dari jagung, sorgum, dan kacang hijau diketahui memiliki kandungan enzim pemecah pati. Kelebihan penggunaan ekstrak enzim dari tanaman dibandingkan dengan bakteri adalah biaya produksi yang rendah dan mudah untuk di *scale-up* (Amid, 2014). Selain itu, enzim *endogenous* dari malt serealia ini memiliki kelebihan proses ekstrak enzim yang mudah, sumber pangan yang aman, dan tidak membutuhkan rekayasa genetik (Knorr, 2015). Jumlah enzim yang dihasilkan dari malt juga banyak. Residu dari malt yang sudah diekstrak enzimnya dapat digunakan sebagai bahan pangan untuk ternak (Gupta, 2010). Biji yang akan dikecambahkan juga dapat memanfaatkan biji yang tidak lolos sortir. Tanaman sorgum, jagung, dan kacang hijau memiliki produktivitas yang tinggi dan dapat menjadi nilai tambah bagi ketiga jenis biji ini.

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas katalitik dari enzim adalah pH dan suhu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim α -amilase dari jagung yang berkecambah memiliki pH optimum sekitar 5-6 dan suhu optimal 40-50 °C (Riyad, 2014). Enzim β -amilase dari jagung yang berkecambah memiliki pH optimum sekitar 4-6,5 dan suhu optimal 55 °C (Menezes, 2009). Sedangkan, enzim α -amilase dari kacang hijau memiliki pH optimum 5-6 (Tripathi, 2007) dan suhu optimal pada rentang 30-40 °C (Suarni & Patong, 2007). Enzim α -amilase dari sorgum yang berkecambah memiliki suhu optimum 50-60 °C (Adelfila & Bakare, 2012) dan pH optimum 5 (Nour & Yagoub, 2010). Sedangkan, enzim β -amilase dari sorgum yang berkecambah memiliki pH optimum 5,5 dan suhu optimum 50 °C (Nour & Yagoub, 2010). Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik dari masing-masing enzim pemecah pati dari serealia.

METODE

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: labu ukur (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), gelas piala (*Pyrex*), tabung reaksi (*Pyrex*), *waterbath*, *blender*, saringan, ayakan 140 mesh, *cabinet dryer*, kain saring, pengaduk kaca, timbangan analitik, pH meter, spektrofotometer, mikropipet, tip, kuvet plastik, dan *sentrifuge*.

Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini antara lain benih sorgum varietas Numbu, benih kacang hijau VIMA 3, benih jagung Hibrida F1 Pertiwi, amilum (*Merck*), akuades, Iodin (*Merck*), Kalium Iodida (*Merck*), asam klorida (*Merck*), Coomassie Brilliant Blue G250 (*Amresco*), etanol PA (*Mallinckrodt*), DNS (*Sigma Aldrich*), Natrium hidroksida (*Merck*), *Rochelle's salt* (*Merck*), Asam asetat (*Merck*), Natrium asetat (*Merck*), Natrium dihidrogen fosfat (*Merck*), Dinatrium hidrogen fosfat (*Merck*), Kalsium klorida (*Merck*).

Variabel Penelitian dan Parameter Pengujian

Parameter pengujian terhadap ekstrak enzim dari 3 jenis biji berkecambah adalah aktivitas enzim pemecah pati berdasarkan degradasi pati & pembentukan gula reduksi dan kadar protein. Variabel independen dalam penelitian adalah jenis malt, yaitu sorgum, kacang hijau, dan jagung. Variabel dependen dalam penelitian adalah variasi pH (4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7) dan variasi suhu (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C). Pada tahap pertama, variabel dependen yang diuji adalah variasi pH. Data dari tahap pertama akan digunakan untuk tahap kedua. Pada tahap kedua, variabel dependen yang diuji adalah variasi suhu. Pada setiap uji dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Perkecambahan Biji Jagung, Sorgum, dan Kacang Hijau

Sebanyak 120 gram biji jagung, sorgum, dan kacang hijau dicuci dan direndam dengan akuades (1:3 w/v). Biji direndam selama 24 jam. Setelah proses perendaman, biji diletakkan pada saringan kemudian ditutupi dengan kain yang dilakukan pada suhu kamar untuk proses perkecambahan (± 25 °C) (Aderibigde & Adejumo, 2015). Proses perkecambahan ini dibiarkan selama 2 hari. Setiap hari, biji disiram 2x sehari dengan 500 ml air untuk proses germinasi. Kemudian, biji diletakkan dalam *cabinet dryer* pada suhu 40° selama 12 jam untuk proses *kilning* (Phiarais, 2005).

Ekstraksi Enzim Pemecah Pati dari Malt Biji Serealia

Biji serealia berkecambah dihancurkan dengan blender dan diayak menggunakan ayakan ukuran 140 mesh. Bubuk malt ini kemudian digunakan untuk ekstraksi enzim. Ekstraksi enzim pemecah pati dari biji serealia berkecambah menggunakan larutan buffer (1:4 w/v). Larutan buffer yang digunakan adalah larutan 50 mM buffer asetat pH 4,5 dan pH 5 yang mengandung 1mM CaCl₂; larutan 50 mM buffer fosfat pH 5,5; pH 6; pH 6,6; dan pH 7 yang mengandung 1mM CaCl₂. Larutan ini kemudian dibiarkan selama 30 menit sambil dikocok sesekali. Kemudian, larutan disentrifugasi pada 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C (Dutta & Jana, 2006). Larutan buffer yang digunakan untuk ekstraksi sesuai dengan nilai pH yang akan diuji aktivitasnya (Adefila & Bakare, 2012) (Adewale, 2006).

Pengukuran Aktivitas Enzim berdasarkan Degradasi Pati (Metode Iodin-Pati)

Sebanyak 0,25 ml ekstrak enzim masing-masing jenis biji ditambahkan dengan 0,25 ml substrat pati (1 g/L) yang dilarutkan dalam larutan buffer pH tertentu yang disesuaikan dengan variasi pH yang diuji. Pengukuran kontrol dilakukan dengan cara 0,25 ml akuades dan ditambahkan dengan 0,25 ml substrat pati (1 g/L). Kemudian, masing-masing diinkubasi selama ± 2 menit (sorgum&jagung) dan ± 6 menit (kacang hijau) pada suhu tertentu yang disesuaikan dengan variasi suhu yang diuji. Suhu yang digunakan untuk tahap pertama adalah suhu 30 °C. Setelah itu, ditambahkan 0,125 ml HCl 1M, kemudian ditambahkan 1 ml reagen iodine (5 mM I₂ dan 5 mM KI). Larutan ini kemudian diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm (Xiao, 2006).

Pengukuran Aktivitas Enzim berdasarkan Pembentukan Gula Reduksi (Metode DNS)

Sebanyak 0,25 ml larutan ekstrak enzim buffer pH tertentu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan dengan 0,25 ml larutan pati (1 g/L) yang dilarutkan dalam buffer pH tertentu. Larutan campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 0,5 ml reagen DNS. Larutan ini kemudian dipanaskan pada suhu 90 °C selama 5-15 menit sampai terbentuk warna merah kecoklatan. Kemudian, larutan ditambahkan 0,165 ml garam Rochelle. Larutan blanko dibuat sama dengan pembuatan larutan sampel, kecuali enzim ditambahkan setelah penambahan reagen DNS (Dutta & Jana, 2006) (Nour & Yagoub, 2010). Kemudian, larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 575 nm.

Pengukuran Kadar Protein (Metode Bradford)

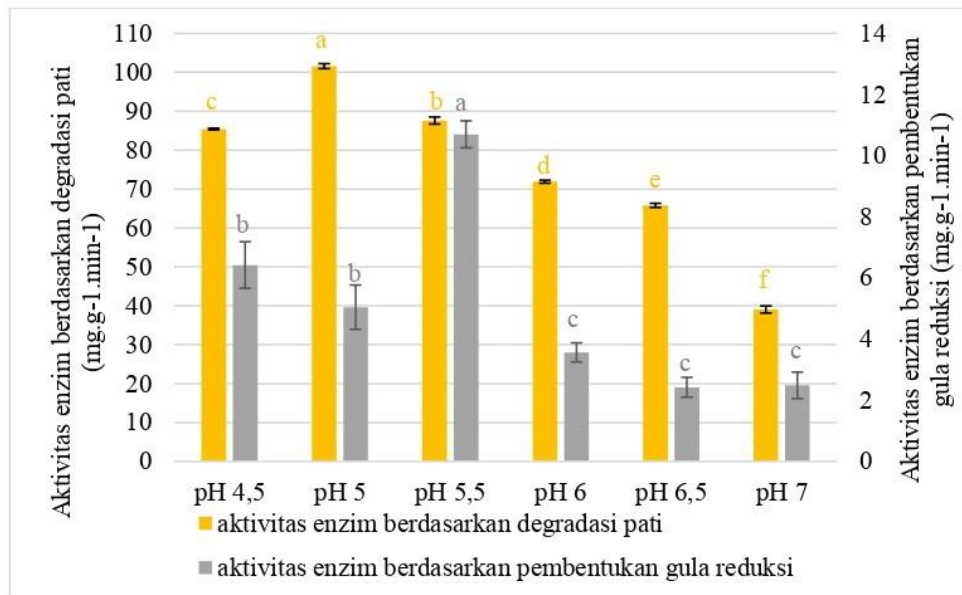
Sebanyak 50 μ l larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2,5 ml reagen Bradford. Kemudian, divortex dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Serapan kemudian dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Larutan blanko dibuat dengan mengganti 50 μ l larutan sampel dengan 50 μ l akuades.

Analisa Data

Data parametrik hasil penelitian diolah dengan metode *ANOVA one way* dengan metode *post hoc Tukey*, jika data berdistribusi normal dan homogen. Data yang tidak normal akan ditransformasi menggunakan *Johnson Transformation*, jika data hasil transformasi menunjukkan data berdistribusi normal, maka data diolah menggunakan *ANOVA one way*

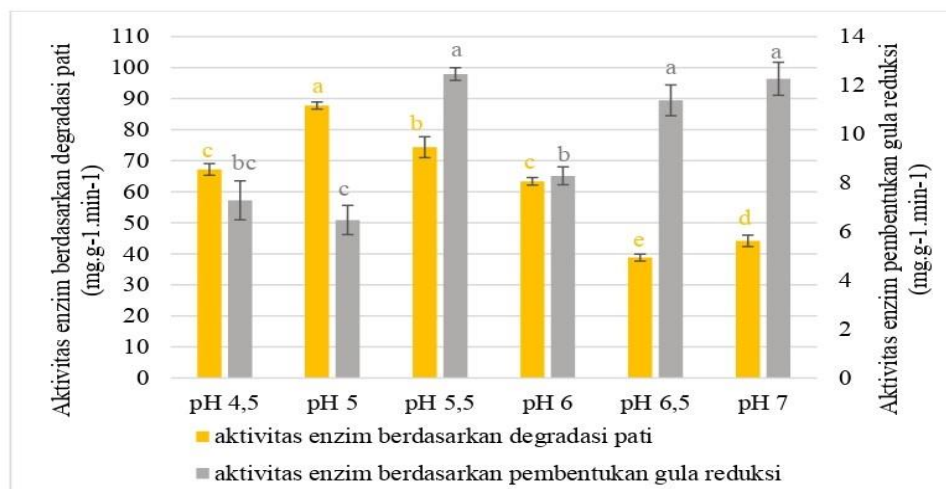
dengan metode *post hoc Tukey*. Data yang tidak berdistribusi normal maupun tidak homogen, dianalisa dengan metode Kruskal-Wallis. Jika hasil statistik menunjukkan perbedaan signifikan dengan $\alpha=0,05$, maka dilakukan analisa *multiple comparison* dengan metode *Bonferroni*

HASIL dan PEMBAHASAN



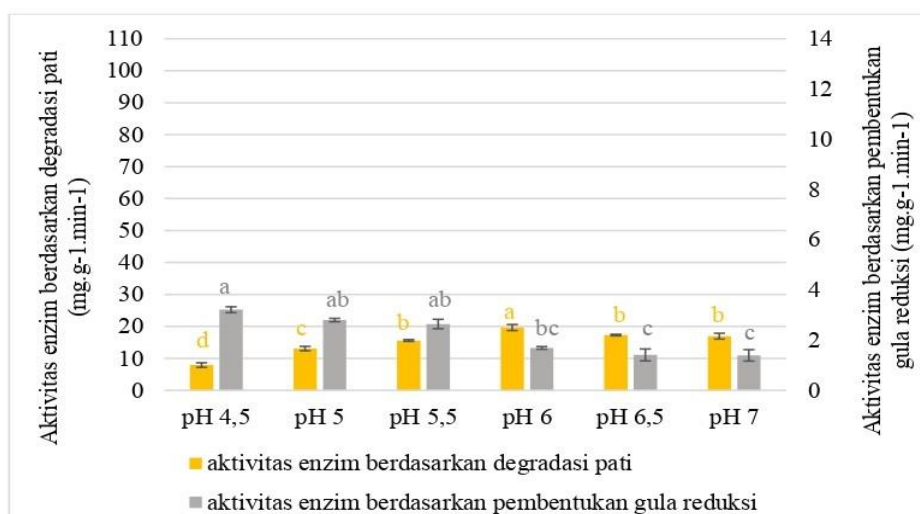
Gambar 1. Efek Perbedaan pH terhadap Nilai Aktivitas Enzim dari Sorgum. Nilai yang ditunjukkan merupakan rata-rata \pm standar deviasi.

Hasil penelitian terhadap aktivitas enzim malt sorgum pada variasi pH dapat dilihat pada Gambar 1. pH yang menghasilkan nilai aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati adalah pH 5 dengan nilai aktivitas enzim per gram malt sebesar 101,58 mg.g-1.min-1. Hasil ini kemungkinan disebabkan oleh kerja enzim α -amilase (enzim endoamilase) yang dominan. Menurut Nour dan Yagoub (2010), enzim α -amilase dari sorgum memiliki pH optimum yaitu pH 5. Sedangkan, pH yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi adalah pH 5,5 dengan nilai aktivitas enzim per gram malt sebesar 10,70 mg.g-1.min-1. Menurut Oyowole (2011), kandungan enzim glukoamilase pada malt sorgum lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan enzim α -amilase dan β -amilase. Sehingga, kemungkinan enzim yang bekerja dominan untuk menghasilkan gula reduksi adalah glukoamilase. Penelitian mengenai pH optimum dari α -glukosidase dan glukoamilase dari malt sorgum sendiri belum dilakukan penelitiannya. Enzim β -amilase dari sorgum diketahui memiliki pH optimum yaitu 5,5 (Nour & Yagoub, 2010). Kerja enzim β -amilase dapat menyebabkan pH optimum yang didapat dalam penelitian ini adalah pH 5,5.



Gambar 2. Efek Perbedaan pH terhadap Nilai Aktivitas Enzim dari Jagung. Nilai yang ditunjukkan merupakan rata-rata ± standar deviasi.

Hasil penelitian terhadap aktivitas enzim malt jagung pada variasi pH dapat dilihat pada Gambar 2. pH yang menghasilkan nilai aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati adalah pH 5 dengan nilai aktivitas enzim per gram malt sebesar 87,78 mg.g-1.min-1. Hasil ini mungkin disebabkan oleh kerja enzim α -amilase (enzim endoamilase) yang dominan. Menurut Riyad (2014), α -amilase dari jagung yang berkecambah memiliki pH optimum sekitar 5-6. Sedangkan, pH yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi adalah pH 5,5; pH 6,5 dan pH 7 dengan nilai aktivitas enzim per gram malt sebesar 12,47; 11,39; 12,27 mg.g-1.min-1. Menurut Oyowole (2011), kandungan enzim glukoamilase pada malt jagung lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan enzim α -amilase dan β -amilase. Sehingga, kemungkinan enzim yang bekerja dominan untuk menghasilkan gula reduksi adalah glukoamilase. Penelitian mengenai pH optimum dari α -glukosidase dan glukoamilase dari malt jagung sendiri belum dilakukan penelitiannya. Sehingga, kemungkinan pada salah satu pH yang menghasilkan aktivitas enzim adalah pH optimum dari enzim glukoamilase atau α -glukosidase. Sedangkan, enzim β -amilase dari jagung memiliki pH optimal antara 4-6,5 (Riyad, 2014).

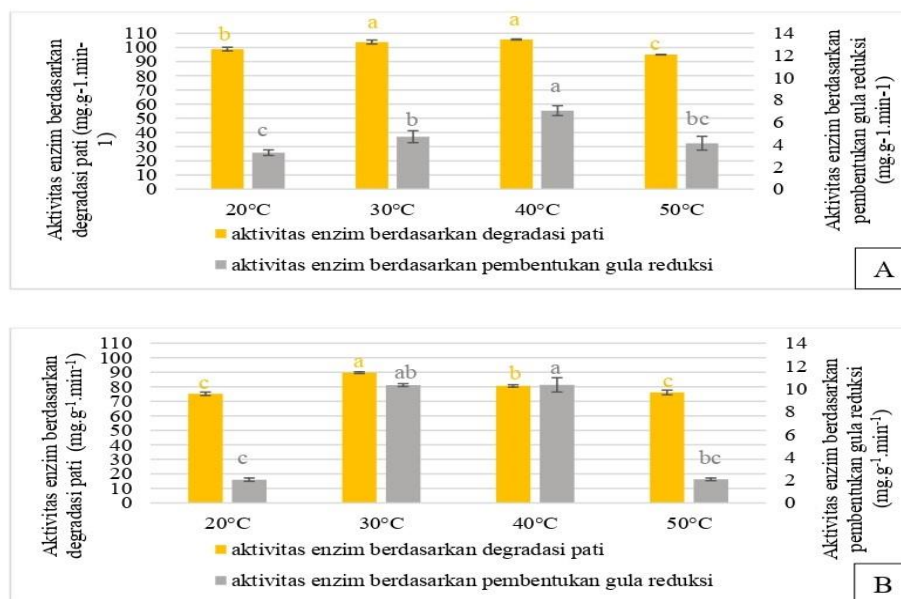


Gambar 3. Efek Perbedaan pH terhadap Nilai Aktivitas Enzim dari Kacang Hijau. Nilai yang ditunjukkan merupakan rata-rata ± standar deviasi.

Hasil penelitian terhadap aktivitas enzim malt kacang hijau pada variasi pH dapat dilihat pada Gambar 3. pH yang menghasilkan nilai aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati adalah pH 6 dengan nilai aktivitas enzim per gram malt sebesar 19,66 mg.g⁻¹.min⁻¹. Hasil ini mungkin disebabkan oleh kerja enzim α -amilase (enzim endoamilase) yang dominan. Menurut Tripathi (2007), enzim α -amilase dari kacang hijau memiliki pH optimum 5-6. Sedangkan, pH yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi adalah pH 4,5 sebesar 3,21 mg.g⁻¹.min⁻¹. Penelitian mengenai enzim eksoamilase dari kacang hijau sendiri belum dilakukan. Hasil penelitian ini dapat menjadi indikator kemungkinan malt kacang hijau mengandung enzim eksoamilase selain dari enzim endoamilase, dimana diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui kandungan enzim eksoamilase dari kacang hijau.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH mempengaruhi aktivitas enzim dari ketiga jenis malt. pH dapat mempengaruhi asam amino pada sisi aktif dari enzim yang dapat mempengaruhi aktivitas katalitik dari enzim. pH dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim/denaturasi karena ionisasi dari asam amino (Battestin, 2007). Selain itu, pH dapat mempengaruhi karakter ionik dari substrat, sehingga dapat mempengaruhi substrat untuk berikatan dengan enzim (laju reaksi) (Salwanee, 2013). Nilai aktivitas enzim yang tertinggi pada pH tertentu menandakan enzim dalam kondisi stabil dan memiliki laju reaksi tertinggi antara sisi aktif enzim dan substrat (Amid, 2014).

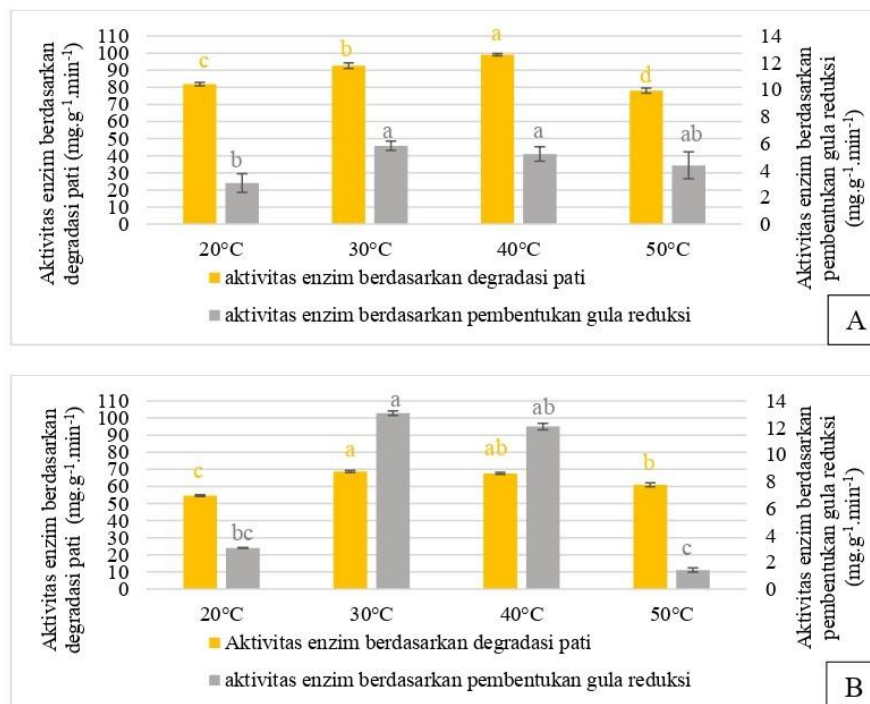
Nilai aktivitas enzim yang cenderung fluktuatif mungkin disebabkan oleh penggunaan ekstrak enzim kasar yang mengandung bermacam-macam jenis enzim, dimana masing-masing enzim memiliki struktur yang berbeda. Masing-masing jenis enzim ini juga memiliki nilai pH optimum yang berbeda-beda. Selain itu, nilai aktivitas ini juga dipengaruhi oleh buffer ekstrak yang digunakan, dimana dalam penelitian ini digunakan buffer ekstrak berbagai macam pH. Buffer ekstrak pada pH tertentu ini mempengaruhi jumlah protein terlarut yang terekstraksi (Sazili, 2010). Menurut penelitian yang dilakukan Sazili (2010), jenis buffer, pH, konsentrasi dan jenis protein yang diekstrak mempengaruhi konsentrasi protein terlarut yang terekstraksi. Penelitian lain menyebutkan jenis buffer dan pH yang digunakan mempengaruhi konsentrasi protein yang terekstraksi (Nahar, 2013).



Gambar 4. Efek Perbedaan Suhu terhadap Nilai Aktivitas Enzim Sorgum: (A) Ekstrak enzim pH 5; (B) Ekstrak enzim pH 5,5. Nilai yang ditunjukkan merupakan rata-rata ± standar deviasi.

Hasil penelitian terhadap aktivitas enzim malt sorgum pada variasi suhu dapat dilihat pada Gambar 4. Penelitian mengenai pengaruh suhu terhadap malt sorgum menggunakan ekstrak sorgum pH 5 (pH yang menghasilkan aktivitas enzim berdasarkan degradasi pati tertinggi) dan pH 5,5 (pH yang menghasilkan aktivitas enzim berdasarkan pembentukan gula reduksi tertinggi). Hasil pada Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas enzim berdasarkan degradasi pati dari ekstrak buffer pH 5 lebih besar dibandingkan dengan ekstrak buffer pH 5,5. Sedangkan, aktivitas enzim berdasarkan pembentukan gula reduksi dari ekstrak buffer pH 5,5 lebih besar dibandingkan dengan ekstrak buffer pH 5. Hasil ini sesuai dengan hasil dari tahap pertama yaitu pengaruh pH terhadap aktivitas enzim.

Suhu yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati dari ekstrak sorgum pH 5 adalah 30 °C dan 40 °C masing-masing sebesar 103,82 dan 105,62 mg.g⁻¹.min⁻¹. Sedangkan, aktivitas enzim tertinggi dari ekstrak sorgum pH 5,5 adalah 30 °C sebesar 89,74 mg.g⁻¹.min⁻¹. Suhu yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi dari ekstrak sorgum pH 5 adalah suhu 40 °C sebesar 7,05 mg.g⁻¹.min⁻¹. Sedangkan, aktivitas enzim tertinggi dari ekstrak sorgum pH 5,5 adalah suhu 40 °C sebesar 10,35 mg.g⁻¹.min⁻¹. Nilai aktivitas enzim pada suhu 40 °C tidak berbeda signifikan dengan aktivitas enzim pada suhu 30 °C, yaitu 10,33 mg.g⁻¹.min⁻¹. Menurut Adefila dan Bakare (2012), enzim α -amilase sorgum yang berkecambah memiliki suhu optimum 50-60 °C. Sedangkan, enzim β -amilase dari sorgum memiliki suhu optimum 50 °C.

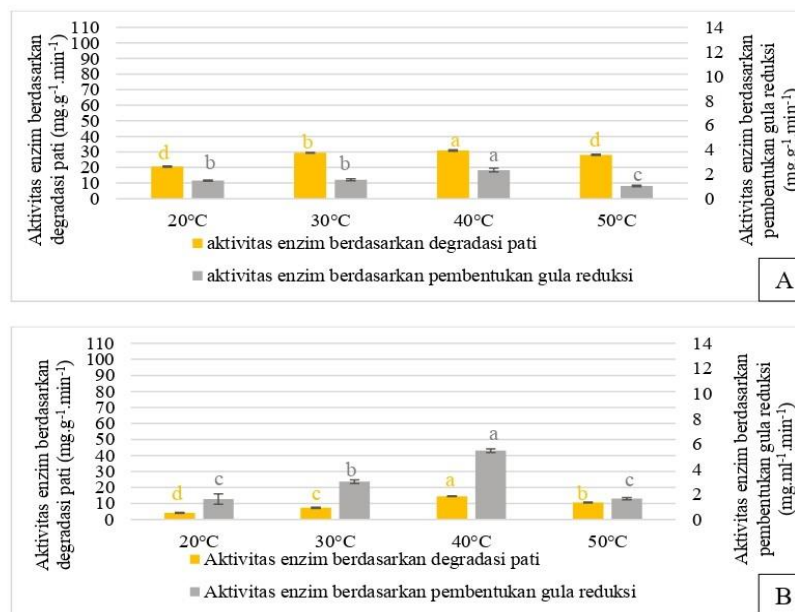


Gambar 5. Efek Perbedaan Suhu terhadap Nilai Aktivitas Enzim Jagung: (A) Ekstrak enzim pH 5; (B) Ekstrak enzim pH 5,5. Nilai yang ditunjukkan merupakan rata-rata \pm standar deviasi.

Hasil penelitian terhadap aktivitas enzim malt jagung pada variasi suhu dapat dilihat pada Gambar 5. Penelitian mengenai pengaruh suhu terhadap malt jagung menggunakan ekstrak jagung pH 5 (pH yang menghasilkan aktivitas enzim berdasarkan degradasi pati tertinggi) dan pH 5,5 (pH yang menghasilkan aktivitas enzim berdasarkan pembentukan gula reduksi tertinggi). Hasil pada Gambar 5 menunjukkan bahwa aktivitas enzim berdasarkan degradasi pati dari ekstrak buffer pH 5 lebih besar dibandingkan dengan ekstrak buffer pH 5,5. Sedangkan, aktivitas enzim berdasarkan pembentukan gula reduksi dari ekstrak buffer pH 5,5

lebih besar dibandingkan dengan ekstrak buffer pH 5. Hasil ini sesuai dengan hasil dari tahap pertama yaitu pengaruh pH terhadap aktivitas enzim.

Suhu yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati dari ekstrak kacang hijau pH 6 adalah 40 °C sebesar 30,94 mg.g⁻¹.min⁻¹. Sedangkan, aktivitas enzim tertinggi dari ekstrak kacang hijau pH 4,5 adalah 40 °C sebesar 14,41 mg.g⁻¹.min⁻¹. Suhu yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi dari ekstrak kacang hijau pH 6 adalah suhu 40 °C sebesar 2,34 mg.g⁻¹.min⁻¹. Aktivitas enzim tertinggi dari ekstrak kacang hijau pH 4,5 adalah suhu 40 °C sebesar 5,47 mg.g⁻¹.min⁻¹. Kedua jenis ekstrak menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada suhu 40 °C. Menurut Suarni dan Patong (2007), suhu optimal enzim α -amilase kacang hijau pada rentang 30-40 °C.



Gambar 6. Efek Perbedaan Suhu terhadap Nilai Aktivitas Enzim Kacang Hijau: (A) Ekstrak enzim pH 6; (B) Ekstrak enzim pH 4,5. Nilai yang ditunjukkan merupakan rata-rata ± standar deviasi.

Hasil penelitian terhadap aktivitas enzim malt kacang hijau pada variasi suhu dapat dilihat pada Gambar 6. Penelitian mengenai pengaruh suhu terhadap malt kacang hijau menggunakan ekstrak kacang hijau pH 6 (pH yang menghasilkan aktivitas enzim berdasarkan degradasi pati tertinggi) dan pH 4,5 (pH yang menghasilkan aktivitas enzim berdasarkan pembentukan gula reduksi tertinggi). Hasil pada Gambar 6 menunjukkan bahwa aktivitas enzim berdasarkan degradasi pati dari ekstrak buffer pH 6 lebih besar dibandingkan dengan ekstrak buffer pH 4,5. Sedangkan, aktivitas enzim berdasarkan pembentukan gula reduksi dari ekstrak buffer pH 4,5 lebih besar dibandingkan dengan ekstrak buffer pH 6. Hasil ini sesuai dengan hasil dari tahap pertama yaitu pengaruh pH terhadap aktivitas enzim.

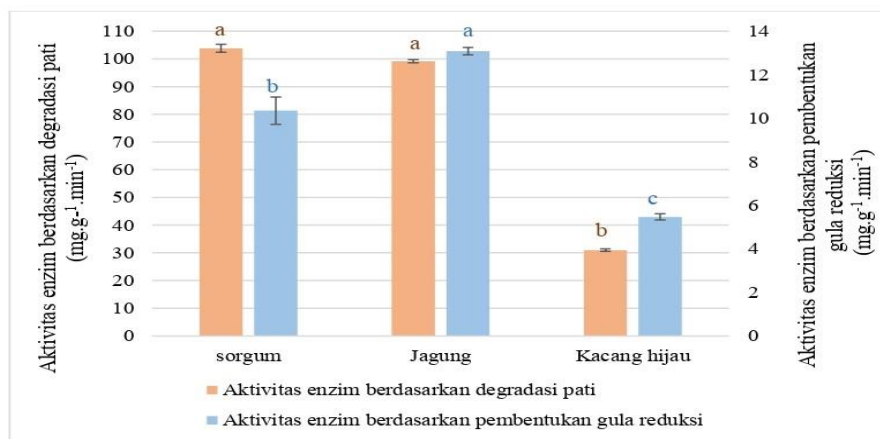
Suhu yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati dari ekstrak kacang hijau pH 6 adalah 40 °C sebesar 30,94 mg.g⁻¹.min⁻¹. Sedangkan, aktivitas enzim tertinggi dari ekstrak kacang hijau pH 4,5 adalah 40 °C sebesar 14,41 mg.g⁻¹.min⁻¹. Suhu yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi dari ekstrak kacang hijau pH 6 adalah suhu 40 °C sebesar 2,34 mg.g⁻¹.min⁻¹. Aktivitas enzim tertinggi dari ekstrak kacang hijau pH 4,5 adalah suhu 40 °C sebesar 5,47 mg.g⁻¹.min⁻¹. Kedua jenis ekstrak menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada suhu 40 °C. Menurut Suarni dan Patong (2007), suhu optimal enzim α -amilase kacang hijau pada rentang 30-40 °C.

Hasil penelitian untuk malt sorgum dan jagung menunjukkan bahwa suhu yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi tidak sama dengan penelitian yang telah dilakukan

sebelumnya mengenai suhu optimum dari α dan β -amilase. Selain itu, pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim cenderung fluktuatif. Nilai aktivitas enzim yang cenderung fluktuatif mungkin disebabkan oleh penggunaan ekstrak enzim kasar yang mengandung bermacam-macam jenis enzim, dimana masing-masing enzim memiliki struktur yang berbeda. Masing-masing jenis enzim ini juga memiliki nilai suhu optimum yang berbeda-beda. Hal inilah yang menyebabkan nilai aktivitas enzim yang cenderung fluktuatif. Penelitian yang dilakukan oleh Battestin (2007) mengungkapkan bahwa ekstrak kasar enzim tanase dan enzim tanase yang sudah dimurnikan memiliki suhu optimum yang berbeda.

Suhu dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Ketika suhu dinaikkan, maka energi kinetik substrat dan enzim juga meningkat sehingga mempengaruhi laju reaksi. Ketika suhu melebihi suhu optimum dari enzim, energi akan meningkat dan menyebabkan ikatan yang membentuk struktur 3 dimensi dari enzim putus. Sehingga, enzim terdenaturasi dan tidak aktif. Selain itu, peningkatan suhu juga dapat menyebabkan substrat terdenaturasi dan tidak aktif (Battestin, 2007). Suhu rendah dapat memperlambat kerja dari aktivitas enzim.

Perbandingan Nilai Aktivitas Enzim dari 3 Jenis Malt



Gambar 7. Perbandingan Nilai Aktivitas Enzim dari 3 Jenis Malt. Nilai yang ditunjukkan merupakan rata-rata \pm standar deviasi.

Perbandingan nilai aktivitas enzim dari 3 jenis malt dapat dilihat pada Gambar 7. Hasil menunjukkan bahwa sorgum dan jagung memiliki nilai aktivitas enzim berdasarkan degradasi pati tertinggi dibandingkan dengan kacang hijau. Nilai aktivitas enzim sorgum dan jagung masing-masing sebesar 103,82 dan 99,15 mg.g-1.min-1. Nilai aktivitas enzim kedua jenis malt ini berbeda secara signifikan dengan nilai aktivitas enzim dari kacang hijau sebesar 30,94 mg.g-1.min-1. Jagung memiliki aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi. Nilai aktivitas enzim dari jagung adalah 13,08 mg.g-1.min-1. Aktivitas enzim dari malt jagung berbeda secara signifikan dengan malt jagung dan kacang hijau yaitu sebesar 10,35 dan 5,47 mg.g-1.min-1.

Menurut Taylor (2013), enzim α -amilase dari jagung (49 IU/g malt) lebih tinggi dibandingkan dengan sorgum (20 IU/ g malt). Menurut Adewale (2006), enzim α -amilase dari sorgum (270 U/mg) lebih tinggi dibandingkan dengan jagung (52 U/mg). Sedangkan, kacang hijau hanya memiliki aktivitas enzim 1-3 U/g malt (Suarni & Patong, 2007). Menurut Taylor (2013), enzim β -amilase dan α -glukosidase dari sorgum lebih tinggi dibandingkan dengan jagung. Menurut Oyowale (2011), enzim glukamilase dari sorgum lebih tinggi dibandingkan jagung.

Faktor yang kemungkinan dapat mempengaruhi nilai aktivitas enzim adalah faktor yang berhubungan dengan proses perkecambahan, dimana lama perkecambahan, suhu perendaman, lama perendaman, suhu dan lama *kilning* (Ceppi, 2010). Selain itu, nilai aktivitas

enzim juga dapat dipengaruhi oleh jenis/sumber dari pati yang digunakan. Pada penelitian ini, pati yang digunakan adalah pati yang berasal dari kentang (*Merck*). Penelitian yang dilakukan Sriwuchong (2005) menunjukkan bahwa tingkat hidrolisis pati dari kentang ($\pm 5\%$) dalam rentang waktu 72 jam oleh enzim α -amilase dari pankreas babi cenderung lebih rendah dibandingkan tingkat hidrolisis dari pati lain seperti pati singkong ($\pm 88,4\%$). Hal ini dikarenakan kandungan amilopektin pada kentang cenderung memiliki rantai yang panjang dibandingkan dengan pati singkong.

Pengaruh suhu dan pH terhadap nilai aktivitas enzim dari malt sorgum, jagung, dan kacang hijau berbeda-beda. Hal ini mungkin disebabkan oleh struktur enzim (komposisi asam amino) yang berbeda dan isoform dari enzim amilase. Diversitas genetik merupakan alasan utama mengapa terdapat beberapa bentuk dari amilase/isoform pada serealia (Hunjan, 2006). Sorgum memiliki 2 isozyme dari α -amilase dengan berat molekul 41,5 dan 42,7 kDa dan 3 isozyme dari β -amilase dengan berat molekul 20, 40, 60 kDa (Dicko, 2006). Endosperm dari malt jagung mengandung 4 isozyme dari α -amilase dan 1 isozyme dari β -amilase (Hunjan, 2006). Malt kacang hijau diketahui memiliki 2 isozyme dari α -amilase (Tripathi, 2007). Komposisi asam amino dari α -amilase berbeda antara 1 sereal dengan sereal lain. Selain itu, dapat berbeda jika bersumber dari bagian yang berbeda dari sereal yang sama.

SIMPULAN

Nilai aktivitas enzim pemecah pati berdasarkan degradasi pati dan pembentukan gula reduksi malt sorgum, jagung, dan kacang hijau cenderung fluktuatif pada variasi pH dan suhu. Malt sorgum pada pH 5 dan suhu 30 °C menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati. Sedangkan, malt sorgum pada pH 5,5 dan suhu 40 °C menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi. Malt jagung pada pH 5 dan suhu 40 °C menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati. Sedangkan, malt jagung pada pH 5,5 dan suhu 30 °C & 40 °C menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi. Malt kacang hijau pada pH 6 dan suhu 40 °C menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati. Sedangkan, malt kacang hijau pada pH 4,5 dan 40 °C menghasilkan aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi. Malt sorgum memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi berdasarkan degradasi pati dan malt jagung memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi berdasarkan pembentukan gula reduksi

PUSTAKA ACUAN

- Adefila, OA, & Bakare, MK, 2012, 'Characterization of an alpha-amylase from sorghum obtained under optimized conditions', *J. Ins. Brew*, Volume 118, pp. 63-69.
- Adewale, IO, 2006, 'Comparative studies on alpha-amylases from malted maize, millet, and sorghum', *Carbohydrate polymers*, Volume 66, pp. 71-74.
- Amid, M, 2014, 'Optimization of processing parameters for extraction of amylase enzyme from dragon peel using response surface methodology', *Hindawi Publishing Corporation*, pp. 1-12.
- Ceppi, ELM, 2010, 'Experimental studies to obtain rice malt'. *J. Agric. Food Chem.*, Volume 58, pp. 7701-7707.
- Dicko, MH, 2006, 'Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities', *African Journal of Biotechnology*, 5(5), pp. 384-395.
- Dutta, TK, & Jana, M, 2006, 'The effect of temperature, pH, and salt on amylase in *Heliodiaptomus viduus*', *Turk J Zool*, Volume 30, pp. 187-195.
- Gupta, M, 2010, 'Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3).
- Hunjan, GK, 2006, 'Presence of an alpha-amylase isozyme with high temperature optima in the wheat variety tolerant to high temperature at juvenile plant stage', *APP*, 28(3), pp. 205-215.

- Knorr, V, 2015, 'Production and application of barley malt extract with high peptidase activity for the degradation of gluten in wort', *Eur Food Res Technol*.
- Nahar, MK, 2013, 'Effect of buffer and pH on the protein extraction for chicken meat', *Advanced Materials Research*, Volume 795, pp. 206-210.
- Nour, MEME, & Yagoub, SO, 2010, 'Partial purification and characterization of alpha and beta amylases isolated from Sorghum bicolor cv.(Feterita) Malt', *Journal of Applied Sciences*, pp. 1314-1319.
- Oyowole, 2011, 'Comparative studies on properties of amylases extracted from kilned and unkilned sorghum and corn', *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, pp. 146-149.
- Phiarais, BPN, 2005, 'The impact of kilning on enzymatic activity of buckwheat malt', *J. Inst. Brew*, pp. 290-298.
- Riyad, H, 2014, Characterization of alpha-amylase in wheat and maize, *Disertasi*.
- Salwanee, S, 2013, 'Effects of Enzyme Concentration, Temperature, pH, and Time on the Degree of Hydrolysis of Protein Extract from Viscera of Tuna by Using Alcalase', *Sains Malaysiana*, 42(3), pp. 279-287.
- Sazili, AQ, 2010, 'The effectiveness of soluble protein extractability under the effect of pH, molarity, and type of buffers of three different major skeletal muscles in cattle', *Asian Journal of Biological Sciences*, 3(3), pp. 134-138.
- Singh, R, & Kumar, M, 2016, 'Microbial enzymes: industry progress in 21st century', *3 Biotech*, 6(2), p. 174.
- Souza, PMd, & Magalhaes, PdOe, 2010, 'Appication of microbial alpha-amylase in industry-a review', *Brazilian Journal of Microbiology*, pp. 850-861.
- Sriwuchong, S, 2005, 'Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility', *Carbohydrate polymers*, 60(4), pp. 529-538.
- Suarni & Patong, R, 2007, 'Potensi kecambah kacang hijau sebagai sumber enzim alpha-amilase', *Indo. J. Chem.*, pp. 332-336.
- Taylor, J, 2013, '125th Anniversary Review: The science of the tropical cereals sorghum, maize, and rice in relation to lager beer brewing', *J. Inst. Brew*, Volume 119, pp. 1-14.
- Tripathi, P, 2007, 'a-Amylase from mung beans (*Vigna radiata*) – Correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling', *Phytochemistry*, Volume 68, pp. 1623-1631.
- Xiao, Z, 2006, 'A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities', *Analytical Biochemistry*.

BIBLIOGRAFI

- Aderibigbe, F, & Adejumo, LA, 2015, 'Effect of different hydrolysis methods on starch degradation', *African Journal of Biotechnology*, pp. 264-271.
- Menezes, JP, 2009, 'Production and characterization of amylases from zea mays malt', *Braz. Arch. Biol. Technol.*, pp. 991-1000.