

**PENGARUH WAKTU PERKECAMBAHAN BIJI KACANG HIJAU
(PHASEOLUS RADIATUS L.) TERHADAP PRODUKSI ENZIM α -
AMILASE**

***THE EFFECT OF TIME SEEDLING OF GREEN BEANS (PHASEOLUS
RADIATUS L.) ON PRODUCTION OF α -AMILASE ENZYMES***

Gumelar¹⁾ Dicky Eka Fariyanto²⁾

^{1,2}Program Studi Bioteknologi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi
Universitas Brawijaya

¹Email : gumelar@student.ub.ac.id

ABSTRAK

Berbagai industri memanfaatkan enzim α -amilase untuk meningkatkan nilai tambah pada suatu produk baik produk pangan maupun non pangan. Enzim α -amilase berkeja secara spesifik terhadap substrat biomassa berbasis pati. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas enzim α -amilase pada kecambah biji kacang hijau dengan 3 perlakuan (berumur 12, 24, dan 48 jam). Ekstraksi enzim α -amilase dilakukan dengan proses sentrifugasi, hasil dari sentrifugasi berupa supernant. Metode yang digunakan dalam uji aktivitas enzim α -amilase yaitu metode DNS (Dinitrosalicylic acid), metode ini digunakan untuk menentukan total gula pereduksi dalam sampel berbasis karbohidrat. Uji kualitatif reaksi enzimatik ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari oranye cerah menjadi warna coklat kemerahan pada sampel. Sedangkan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer dengan menghitung absorbansi pada tiap sampel, hasil absorbansi tiap sampel disubstitusikan pada persamaan kurva standar yang di dapat untuk menghitung aktivitas enzim α -amilase pada tiap sampel. Hasil uji aktivitas enzim α -amilase kecambah biji kacang hijau umur 12 jam sebesar 120.41 U/ml, aktivitas enzim α -amilase pada kecambah biji kacang hijau umur 24 jam sebesar 85.41 U/ml, dan aktivitas enzim α -amilase pada kecambah biji kacang hijau umur 48 jam sebesar 55.41 U/ml.

Kata kunci: α -amilase; kacang hijau (*Phaseolus Radiatus L*); kecambah

ABSTRACT

Various industries utilize α -amylase enzymes to increase the value added in both food and non-food products. α -amylase enzymes are specific to starch-based biomass substrates. The purpose of this research is to determine the activity of the enzyme α -amylase in green bean sprouts with 3 treatments (aged 12, 24, and 48 hours). The extraction of α -amylase enzymes is done by centrifugation, the result of centrifugation in the form of supernant. The method used in the activity test of α -amylase enzyme is the method of DNS (Dinitrosalicylic acid), this method is used to determine the total reduction sugar in carbohydrate-based samples. Qualitative test of enzymatic reaction is shown in the presence of discoloration of bright orange into a reddish brown color in the sample. While quantitative testing

using a spectrophotometer by calculating the absorbancy in each sample, the absorption result of each sample is substituted at the standard curve equation that can calculate the activity of the α -amylase enzyme in each sample. Test result of activity of α -amylase enzyme sprouts green beans age 12 hours is 120.41 U/ml, activity of α -amylase enzyme in green bean sprouts aged 24 hours is 85.41 U/ml, and activity of α -amylase enzyme in green bean sprouts age 48 hours is 55.41 U/ml.

*Keywords: α -amylase; mung beans (*Phaseolus Radiatus L*); sprout*

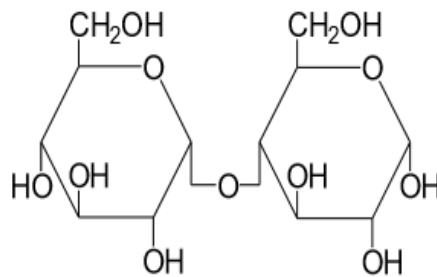
PENDAHULUAN

Berbagai industri saat ini banyak memanfaatkan enzim α -amilase untuk meningkatkan nilai tambah pada suatu produk, beberapa industry yang memanfaatkan enzim α -amilase diantaranya industry makanan, industry bakery, industri deterjen, industri tekstil, industry kertas, dan produksi alkohol (Sundarram and Murthy 2014). Penggunaan enzim dalam bidang industry dapat menghemat biaya produksi, penghematan energi lebih tinggi, spesifik terhadap substrat, produktivitas tinggi, dapat mengurangi penggunaan pelarut, mengurangi produk limbah. Sumber enzim α -amilase bisa didapatkan dari berbagai mikroorganisme, hewan, dan tanaman biji-bijian. Kacang hijau merupakan biji-bijian yang mudah didapat dan perkecambahannya cepat, dalam pertumbuhannya biji kacang hijau memerlukan suatu energi untuk merombak senyawa organik seperti seperti karbohidrat, lemak, dan, protein. Secara alami, biji kacang hijau mampu memproduksi enzim α -amilase yang digunakan untuk merombak senyawa karbohidrat.

Pati merupakan biomassa yang secara luas dapat digunakan dalam berbagai bidang, modifikasi pati untuk menghasilkan produk yang memiliki nilai tambah dapat dilakukan secara kimia atau enzimatik. Pati merupakan polisakarida dari glukosa yang dihubungkan oleh ikatan α -1,4-glikosida (Sutrisno, A. 2007. hlm. 46). Enzim α -amilase merupakan enzim golongan hydrolase yang mampu menghidrolis atau mendegradasi ikatan α -1,4-glikosida pada senyawa pati menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti oligosakarida (maltotriosa), disakarida (maltosa), atau monosakarida (glukosa) (Mikawlawng

2016). Pengukuran aktivitas enzim α -amilase dapat ditentukan dengan melakukan perhitungan jumlah gula reduksi setelah terjadi reaksi hidrolisis menggunakan metode DNS (*Dinitrosalicylic acid*), metode ini untuk menentukan total gula pereduksi dalam sampel yang mengandung pati (Fahmi, Astuti, and Sitorus 2017).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas optimum enzim α -amilase yang diproduksi oleh beberapa isolat mikroorganisme (*B.subtilis*, *A.flavus*, *B.cereus*, *A.niger*, dan *B.pumilus*) pada rentang waktu inkubasi 72 jam sampai 96 jam, pada waktu inkubasi tersebut biomassa (pati) mengalami penurunan dan meningkatkan produk (glukosa) (Ayansina, Adelaja, and Mohammed 2017). Penelitian ini lebih mengarah pada temuan-temuan aktivitas enzim α -amilase pada perkecambahan biji kacang hijau serta bertujuan untuk mengetahui aktivitas maksimum enzim α -amilase pada biji kacang hijau dengan tiga perlakuan, yaitu kecambah direndam 12 jam, kecambah direndam 24 jam, dan kecambah direndam 48 jam. Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi upaya pemanfaatan enzim α -amilase dari kecambah kacang hijau untuk mendegradasi biomassa berbasis pati.



The structure of a maltose molecule showing a chain of two glucose units joined by an α -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic linkage

Gambar 1. Struktur maltosa

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mortar, kertas saring, gelas beaker 250 ml, Erlenmeyer 250 ml, sentrifuse, karet hisap (bulb), pipet ukur 1 ml, labu ukur 10 ml, *magnetic stirrer*, spektrofotometer, kuvet, kompor listrik, tabung reaksi dan rak. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kecambah kacang hijau, buffer asetat (0.1-0.5 M) pH 5.5, reagen DNS, maltosa 50 mg, dan *soluble starch*.

Prosedur

1. Persiapan sampel

Biji kacang hijau ditimbang sebanyak 15 gram dan dikelompokkan ke dalam masing-masing 5 gram untuk 3 perlakuan yaitu biji kacang hijau dikecambahkan selama 12 jam, biji kacang hijau dikecambahkan selama 24 jam, dan biji kacang hijau dikecambahkan selama 48 jam.

2. Ekstraksi enzim α -amilase

5 gr sampel dari masing-masing perlakuan dihancurkan dan ditambahkan 50 ml buffer asetat (0.1-0.5 M) pH 5.5, kemudian didiamkan selama 30 menit, lalu disaring. Filtrat hasil dari peyaringan disentrifugasi, diambil supernatant hasil sentrifugasi.

3. Pembuatan kurva larutan standar

50 mg maltosa dilarutkan dalam 50 ml larutan buffer asetat dan diencerkan sampai konsentrasi 800 ppm, lalu larutan maltosa diambil 1 ml dari masing-masing pengenceran dan ditambahkan 3 ml DNS, kemudian dipanaskan sampai berubah warna, setelah itu didinginkan dan dicari panjang gelombang maksimum (540 nm), lalu diukur nilai absorbansi larutan maltosa dari masing-masing pengenceran.

4. Pengukuran aktivitas enzim α -amilase

0.2 gram soluble starch dilarutkan dalam 20 ml air, lalu dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Diambil 1 ml larutan soluble starch dicampurkan dengan 1 ml larutan enzim hasil ekstraksi, lalu diinkubasi pada suhu optimum 30°C

selama 3 menit. Diambil campuran hasil inkubasi, lalu diencerkan dengan aquades 10 ml dalam labu ukur, kemudian diambil hasil pengenceran sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 ml DNS dan dipanaskan, kemudian diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

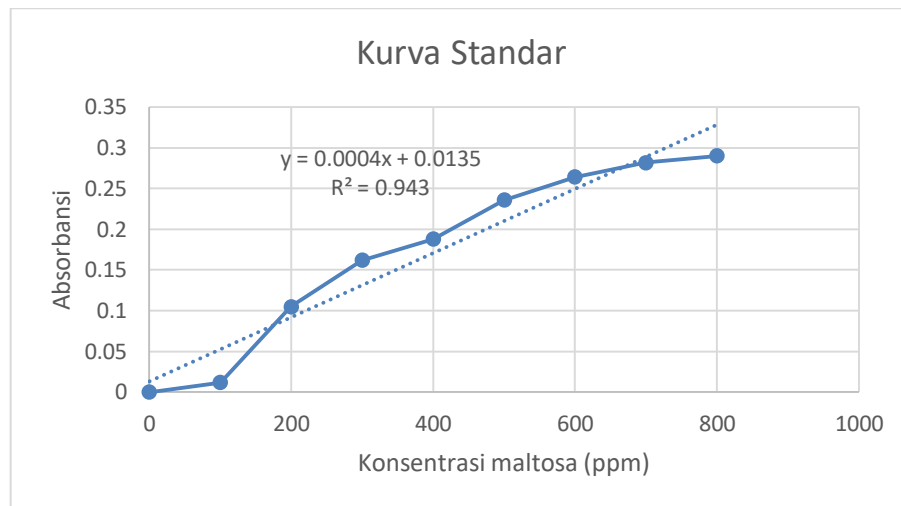
1. Ekstraksi enzim α -amilase

Dalam proses sentrifugasi akan terbentuk dua fase yaitu fase atas dan fase bawah. Fase atas merupakan supernatant yang berisi enzim yang diproduksi oleh biji kecambah kacang hijau dan fase bawah merupakan pellet. Supernatant yang terbentuk dipisahkan dari pellet untuk dilakukan treatment selanjutnya.

2. Pembuatan kurva standar

Table 1. Absorbansi larutan standar maltosa

Konsentrasi maltosa	Absorbansi
0 ppm	0
100 ppm	0.012
200 ppm	0.105
300 ppm	0.162
400 ppm	0.188
500 ppm	0.236
600 ppm	0.264
700 ppm	0.282
800 ppm	0.290



Gambar 2. Grafik kurva standar larutan maltosa

3. Pengukuran aktivitas enzim α -amilase

Tabel 2. Nilai absorbansi dan konsentrasi kecambah biji kacang hijau

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi
Kecambah biji kacang hijau 12 jam	0.158	361.25
Kecambah biji kacang hijau 24 jam	0.116	256.25
Kecambah biji kacang hijau 48 jam	0.080	166.25

Untuk menghitung aktivitas enzim α -amilase dapat menggunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas enzim } \alpha\text{-amilase} = C \times \frac{1}{\text{waktu inkubasi}} \times \frac{1 \text{ unit}}{1 \text{ mikromol}}$$

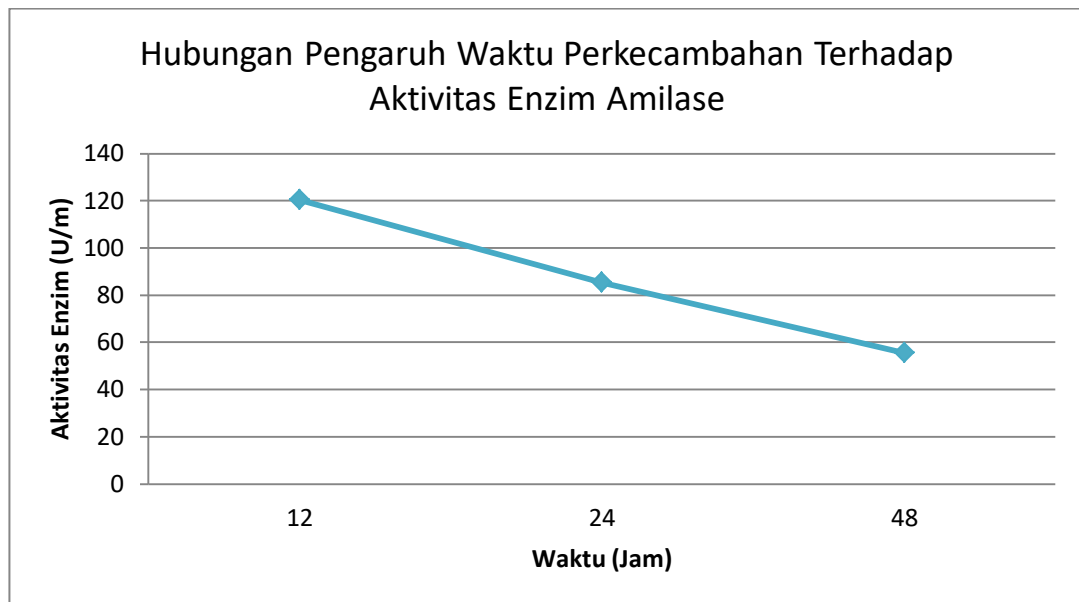
Keterangan:

C = konsentrasi maltosa per 1 ml ekstrak enzim (mikromol)

1 unit = besarnya aktivitas enzim α -amilase yang dibutuhkan dalam membebaskan 1 mikromol maltosa per menit

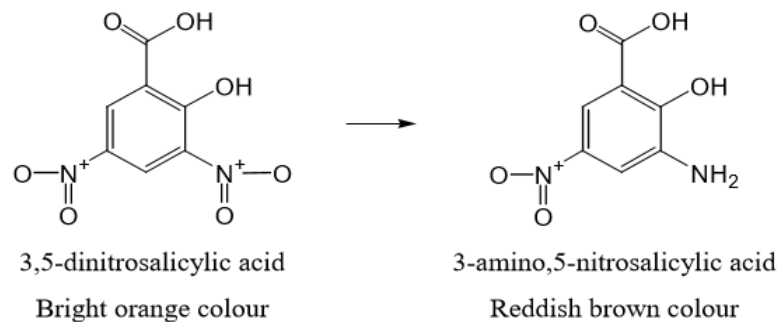
Table 3. hasil aktivitas enzim α -amilase kecambah biji kacang hijau

Sampel	Aktivitas enzim (U/ml)
Kecambah biji kacang hijau 12 jam	120.41
Kecambah biji kacang hijau 24 jam	85.41
Kecambah biji kacang hijau 48 jam	55.41



Gambar 3. Grafik Hubungan pengaruh waktu perkecambahan terhadap aktivitas enzim amilase

Identifikasi secara kualitatif untuk menunjukkan terjadinya reaksi enzimatis dapat dilihat dari laju reaksinya. Laju reaksi dapat dikenal dengan mengukur jumlah media (biomassa berbasis pati) yang dapat dimanfaatkan atau jumlah produk yang terbentuk dalam satuan waktu. Metode DNS (*Dinitrosalicylic acid*) yang digunakan dapat mengidentifikasi adanya reaksi enzimatis secara kualitatif indikator ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi coklat kemerahan. DNS berfungsi sebagai oksidator yang ketika bereaksi dengan sampel akan tereduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat sedangkan gugus aldehid pada glukosa akan dioksidasi oleh asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi gugus karboksil, reaksi ini berlangsung dalam suasana basa (Teo 2013).



Gambar 4. Reaksi reagen DNS (*Dinitrosalicylic acid*)

Selanjutnya, untuk mengidentifikasi secara kuantitatif aktivitas enzim menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum 540 nm. Senyawa yang dihasilkan dari reaksi DNS dengan gula pereduksi yaitu asam 3-amino-5-nitrosalisilat, senyawa ini mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 540 nm – 550 nm. Pada pengujian ini hasil ekstraksi enzim α -amilase yang diperoleh dari filtrat kecambah biji kacang hijau sebanyak 1 ml. Data hasil penelitian aktivitas enzim α -amilase pada 3 perlakuan kecambah biji kacang hijau berturut-turut sebesar 120.41 U/ml umur 12 jam, 85.41 U/ml umur 24 jam, dan 55.41 U/ml umur 48 jam. Hal ini dikarenakan peningkatan aktivitas enzim α -amilase berhubungan dengan jumlah karbohidrat yang terdapat pada kecambah. Kandungan senyawa karbohidrat pada kecambah lebih tinggi dibandingkan pada biji. Hal ini terjadi karena saat awal perkecambahan mulai tumbuh akar, dimana akar ini menyerap air dan sumber karbon pada tanah sehingga pada saat perkecambahan mampu meningkatkan total kandungan senyawa karbohidrat (Ferreira dkk. 2009).

Pada gambar 3 menunjukkan karakteristik perkecambahan dan aktivitas enzim tertinggi dicapai pada tahap awal dan terendah pada tahap akhir. Semakin lama pengaruh waktu perkecambahan maka semakin kecil nilai aktivitas enzim amilase. Hal ini terjadi karena fase awal perkecambahan memerlukan energi yang besar sehingga semakin banyak jumlah enzim amilase yang dibentuk untuk

memecah granula pati. Enzim menyerang daerah amorf dan daerah kristal, menyebabkan lubang di daerah butiran pati sehingga mengalami lisis. Hasil lisis tersebut kemudian dialihkan ke fase pertumbuhan kecambah sehingga semakin lama waktu, pembentukan enzim amilase dan aktivitasnya menurun karena telah memasuki fase pertumbuhan (Ortiz, Fabiola, 2018. hlm. 2-25). Asam giberelin berperan penting dalam proses perkecambahan dan eksogen dari asam giberelin dapat merangsang aktivitas enzim α -amilase (Thakare, Patil, and Malpathak 2011), sehingga aktivitas enzim α -amilase lebih tinggi pada biji kecambah kacang hijau berumur 12 jam daripada kecambah biji kacang hijau berumur 48 jam karena jumlah karbohidrat pada kecambah biji kacang hijau berumur 12 jam lebih banyak. Sedangkan jumlah karbohidrat pada kecambah biji kacang hijau yang berumur 48 jam lebih sedikit karena karbohidrat telah banyak dirombak sehingga aktivitas enzim α -amilase jauh lebih sedikit yaitu sebesar 55.41 U/ml.

KESIMPULAN

Berdasarkan data hasil penelitian aktivitas enzim α -amilase tertinggi terdapat pada biji kecambah kacang hijau berumur 12 jam dengan nilai aktivitas enzim α -amilase sebesar 120.41 U/ml. Sedangkan aktivitas enzim α -amilase terendah terdapat pada biji kecambah kacang hijau berumur 48 jam dengan nilai aktivitas enzim α -amilase sebesar 55.41 U/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayansina, Ayantade Dayo Victor, Ademola Olasoji Adelaja, and Sani Sambo Datsugwai Mohammed. 2017. "Characterization of Amylase from Some *Aspergillus* and *Bacillus* Species Associated with Cassava Waste Peels." *Advances in Microbiology* 07(04):280–92.
- Fahmi, Ismi, Winni Astuti, and Saibun Sitorus. 2017. "ISOLATION AMYLASE FROM SPROUTS SEED OF JACKFRUIT (*Artocarpus Heterophyllus* Lam) ISOLASI AMILASE DARI KECAMBAH BIJI NANGKA (*Artocarpus Heterophyllus* Lam) Ismi Fahmi 1* , Winni Astuti 1 Dan Saibun Sitorus 1 1." *Atomik* 2:140–42.
- Ferreira, Cristiane Da Silva, Maria Teresa Fernandez Piedade, Marco Aurélio Silva Tiné, Davi Rodrigo Rossatto, Pia Parolin, and Marcos Silveira Buckeridge. 2009. "The Role of Carbohydrates in Seed Germination and Seedling Establishment of *Himatanthus Sucuuba*, an Amazonian Tree with Populations Adapted to Flooded and Non-Flooded Conditions." *Annals of Botany* 104(6):1111–19.

- Mikawlawng, K. 2016. *Aspergillus in Biomedical Research*. Elsevier B.V
- Ortiz, Fabiola, dkk.. 2018. Enzyme activity during germination of different cereals
A Food Reviews International.
- Sundarram, Ajita, and Thirupathihalli Pandurangappa Krishna Murthy. 2014. “ α -
Amylase Production and Applications : A Review.” *Journal of Applied &
Environmental Microbiology* 2(4):166–75.
- Sutrisno, A. 2007. *Teknologi Enzim*, Malang: UB Press..
- Teo, Mee-lin Lim Chai. 2013. “Analysis of in Vitro Digestibility of Starches and
Microcapsules : Evaluation of Retention and Release of Folic Acid in the
Fortification of Foods.” (June).
- Thakare, Utkarsha, Neelam Patil, and Nutan Malpathak. 2011. “Performance of
Chick Pea under the Influence of Gibberellic Acid and Oxygenated Peptone
during Germination.” *Advances in Bioscience and Biotechnology* 02(01):40–
45.