

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tinjauan Umum Amilase

Pati merupakan polisakarida, polimer glukosa, yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Adanya proses hidrolisis akan mengubah pati menjadi gula (Tranggono dan Sutardi, 1989). Amilase adalah enzim yang dapat menghidrolisis pati. Proses hidrolisis tersebut pertama kali akan menghasilkan produk berupa dekstrin, kemudian maltosa, dan pada akhirnya memproduksi glukosa (Crueger & Crueger, 1990). Sebagai hasil sampingan hidrolisis pati berupa air yang menyebabkan substrat/bahan menjadi berair atau '*juices*' (Ismeini & Oyan, 1987).

Menurut Winarno (1995), Amilase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik dari amilosa, amilopektin, dan glikogen. Amilase dapat dikelompokkan menjadi 3 golongan enzim, yaitu :  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, dan glukoamilase (Winarno, 1995).

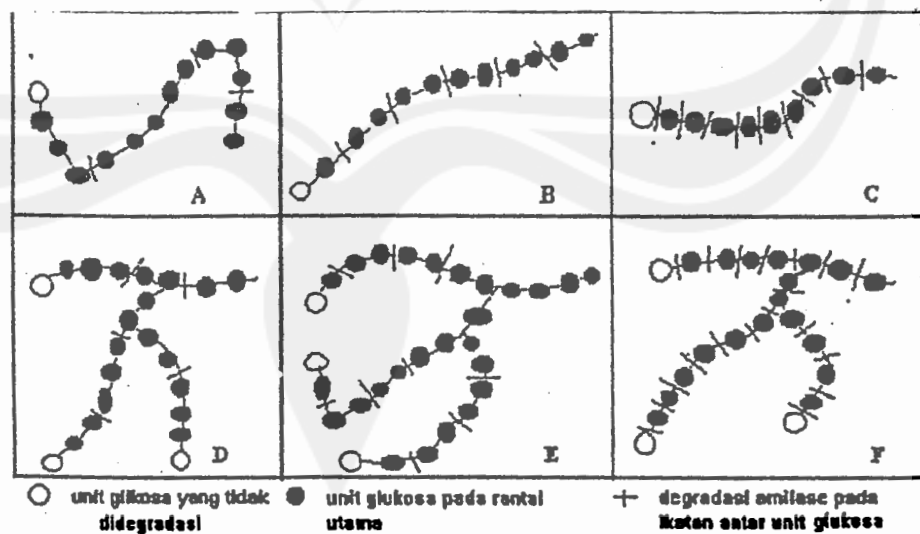
$\alpha$ -Amilase ( $\alpha$ -1,4 glucan 4-glucanohidrolase, endoamilase) merupakan enzim yang memecah pati secara acak dari tengah atau dari bagian dalam molekul, sehingga disebut endoamilase (Winarno, 1995). Umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme dan menghidrolisis ikatan  $\alpha$ 1,4-glikosidik pada amilosa, amilopektin, dan glikogen pada bagian dalam molekul, juga dapat menghidrolisa ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosidik pada polimer bercabang. Aktivitas  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dari penurunan kadar pati yang

larut atau dari kadar dekstrinnya dengan menggunakan substrat jenuh (Winarno,1995).

$\beta$ -Amilase ( $\beta$ -1,4 glukon maltohidrolase) merupakan enzim yang menghidrolisis unit-unit gula dari ujung molekul pati, karenanya disebut eksoamilase (Winarno,1995).

Glukoamilase (Amyloglucosidase, $\gamma$ -amilase) merupakan enzim yang dapat memisahkan glukosa dari terminal gula non-pereduksi substrat pati (Winarno,1995). Glukoamilase merupakan eksoacting enzim yang membuat  $\beta$ -D-glukosa dengan menghidrolisis rantai  $\alpha$ -1,4 pada rantai akhir yang tidak tereduksi dari amilosa, amilopektin, dan glikogen, juga menghidrolisis rantai  $\alpha$ -1,6 dan  $\alpha$ -1,3. Glukoamilase umumnya dihasilkan oleh fungi .

Proses degradasi amilase pada amilosa dan amilopektin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram skematik yang menggambarkan aksi Amilase. (A) dan (D) degradasi acak amilosa dan amilopektin oleh  $\alpha$ -amilase untuk menghasilkan dekstrin. (B) dan (E) degradasi secara bertahap amilosa dan amilopektin oleh  $\beta$ -amilase dari gugus akhir non reduksi untuk membentuk maltosa. (C) dan (F) hidrolisis amilosa dan amilopektin oleh amiloglukosidase untuk membentuk glukosa (Sumber: Reed, 1975)



stabil asam sejauh ini hanya ditemukan pada *Aspergillus niger* (Crueger & Crueger, 1990).

Menurut Fogarty dan Kelly (1980), berat molekul (BM) dari  $\alpha$ -amilase  $\pm$  50.000 (Tabel 1). Enzim ini biasanya stabil pada kisaran pH 5,5 – 8,0 dan pada pH ekstrem jika ada suplai senyawa yang mengandung ion kalsium. Aktivitas dari  $\alpha$ -amilase biasanya hilang pada suhu lebih dari 50° Celcius.

Seluruh  $\alpha$ -amilase merupakan enzim metalo kalsium (*calcium metallo enzymes*) yaitu enzim yang mempunyai senyawa pengaktif berupa logam yang dapat mempercepat reaksi enzimatik.  $\alpha$ -Amilase merupakan enzim metalo kalsium pertama yang ditemukan, akan tetapi spesifitas, afinitas, dan fungsi dari ion  $\text{Ca}^+$  belum diketahui secara pasti. Enzim ini mengandung ion kalsium minimal 1 atom per molekul enzim. Adanya ion ini menyebabkan  $\alpha$ -amilase dapat tahan dalam kondisi yang ekstrim seperti pH, temperatur atau perlakuan dengan urea.

Aktivitas yang tinggi memerlukan minimal 4 gram atom kalsium per mol enzim.  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus oryzae* mengikat 10 gram atom kalsium per mol enzim, 9 gram di antaranya sangat mudah lepas dan tidak mempengaruhi aktivitas katalitik enzim. Logam divalen yang lain contohnya strontium, barium, dan magnesium dapat menjauhkan ion kalsium dari ikatan enzim tanpa menyebabkan penurunan aktivitasnya secara nyata, tapi hal ini hanya terjadi jika ada perubahan pada sisi aktif enzim (Fogarty & Kelly, 1980).

$\alpha$ -Amilase dari jamur (fungi) diproduksi secara komersial oleh *Aspergillus oryzae*. Produksi  $\alpha$ -amilase membutuhkan sumber karbon berupa pati (Yabuki *et al.*, 1927) Adapun sumber-sumber nitrogen yang dipakai adalah amonium sitrat,

*mycological peptone*, kalsium sitrat, dan amonium sulfat. Apabila amonium sitrat digunakan sebagai sumber N maka produksi enzim 95 % adalah ekstraseluler, sedangkan jika digunakan potasium nitrat, produksi akan meningkat 50 %, dan 82 %-nya adalah intraselular. Isomaltosa dan panosa merupakan induser yang paling aktif bagi  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* (Fogarty & Kelly, 1980).

Menurut Rahayu (1991), faktor-faktor yang berpengaruh pada pembentukan  $\alpha$ -amilase adalah :

1. Gen yang dapat membentuk struktur dan sifat  $\alpha$ -amilase
2. Senyawa represor yang dapat mengatur fungsi  $\alpha$ -amilase
3. Induser yang dapat membebaskan gen dari penghambatan represor

Tabel 1. Karakteristik  $\alpha$ -amilase pada beberapa mikrobia (Fogarty & Kelly, 1980)

Mikrobia	Berat Molekul	pH Optimum	Temperatur Optimum (°C)
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	68.000	3,5	75
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	49.000	5,9	65
<i>Bacillus caldolyticus</i>	-	5,4	70
<i>Bacillus coagulans</i>	-	5,2	57
<i>Bacillus licheniformis</i>	22.000	5,0-8,0	76
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	49.000	5,4-6,1	70
<i>Bacillus subtilis</i>	47.000	5,3-6,4	50
<i>Bacillus saccharophila</i>	-	5,25-5,75	40
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	40.000	4,6-5,3	40
<i>Thermoactinomyces vulgarius</i>	-	5,9-7,0	60
<i>Thermonospora curvata</i>	62.000	5,5-6,0	65
<i>Aspergillus niger</i>			
(a) Enzim tahan asam	61.000	5,0-6,0	35
(b) Enzim tidak tahan asam	58.000	4,0-5,0	50
<i>Aspergillus oryzae</i>	52.600	5,5-5,9	40

### C. *Aspergillus oryzae* dan Sifat-sifatnya

Genus *Aspergillus* merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang tergolong sangat potensial dalam mendegradasi pati menjadi glukosa melalui proses sakarifikasi untuk menghasilkan sirup fruktosa, asam organik, asam amino, antibiotik, dan etanol melalui fermentasi. *Aspergillus sp* sudah banyak digunakan di dalam industri-industri terutama industri pangan karena kemampuannya memproduksi enzim terutama enzim amilase. Kelebihan lainnya yang diberikan kelompok jamur ini adalah tidak menghasilkan produk yang bersifat toksik dan aman digunakan (Frost & Moss, 1987).

*Aspergillus oryzae* adalah species jamur satu kelompok dengan *Aspergillus flavus* yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim amilolitik yang sangat baik. Strain-strain dalam kelompok ini juga menghasilkan enzim proteolitik yang kuat (Sudarmadji, 1989). Struktur yang dapat dilihat pada strain ini yaitu tangkai dan sel kaki (Gambar 2). Koloni yang tumbuh pada medium scapek agar pada suhu 25 ° C memiliki diameter 4 – 5 cm. Apabila diinkubasi selama 7 hari, mikroorganisme ini terdiri atas konidiofor yang panjang dan kadang-kadang tercampur dengan miselia udara. Kepala konidia berwarna kuning kehijauan dan akhirnya berubah menjadi berwarna coklat. Ukuran konidianya lebih besar bila dibandingkan dengan konidia *Aspergillus flavus* (Sudarmadji, 1989).

Menurut Raper dan Fennell (1977), sporulasi dari *A. oryzae* dipengaruhi oleh nutrisi. Sukrosa, fruktosa, maltosa, dan *soluble starch* (pati yang mudah larut) merupakan sumber karbon terbaik. Sumber-sumber nitrogen yang dapat

digunakan di antaranya 0,5 – 0,6 %  $\text{NH}_4$  suksinat, 0,1 – 0,2 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , dan 0,2 – 0,4 %  $\text{NaNO}_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Amonium klorida ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) akan menurunkan nilai pH sampai ke tingkat yang sangat rendah sedangkan  $(\text{NH}_4) \text{CO}_3$  akan meningkatkan pH sampai 9. Warna spora akan berubah dari hijau menjadi coklat dengan meningkatnya unsur nitrogen.

Medium yang dipergunakan untuk menumbuhkan *Aspergillus oryzae* harus memenuhi persyaratan nutrien-nutrien yang dipergunakan baik untuk pertumbuhan maupun untuk produksi enzim. Menurut Rahayu (1991), pada dasarnya medium harus mengandung senyawa-senyawa sumber karbon, sumber nitrogen, dan beberapa senyawa sebagai faktor tumbuh seperti asam-asam amino, vitamin dan mineral, serta senyawa-senyawa yang diperlukan sebagai inducer atau pemacu produksi enzim. Mineral-mineral yang ditambahkan merupakan pendukung sumber-sumber nitrogen, fosfor, sulfur dan kalsium. Air dan bahan dasar yang dipergunakan biasanya berisi ion logam atau dalam bentuk garamnya seperti  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Au}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , dan  $\text{Mo}^{2+}$  yang dipergunakan untuk pertumbuhan atau sebagai konstituen utama koenzim. Diantara elemen-elemen tersebut yang paling esensial adalah  $\text{Ca}^{2+}$ , untuk aktivitas dan stabilitas enzim.

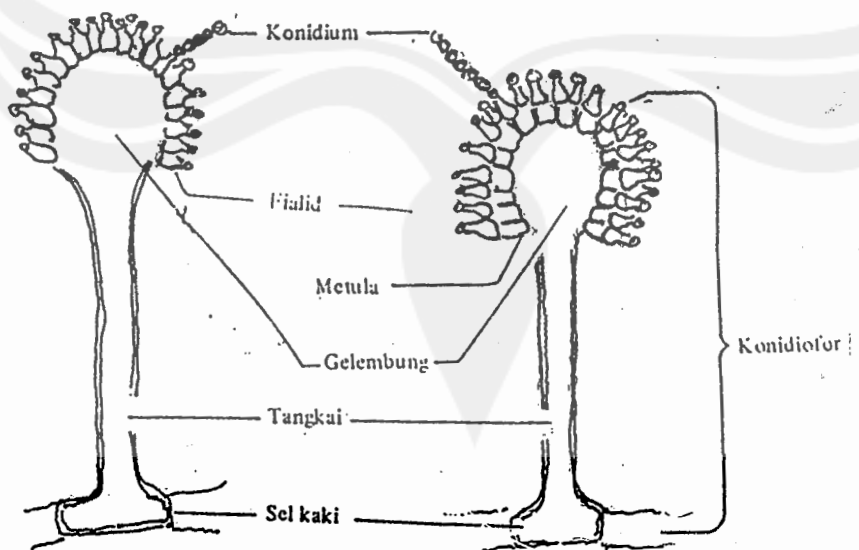
Produksi enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi medium dan lingkungan selama masa inkubasi. Secara umum kondisi optimal untuk produksi enzim adalah : kecukupan aerasi untuk mikrobial aerobik, tersedianya senyawa inducer, tersedianya ion logam sebagai kofaktor enzim, tersedianya senyawa untuk faktor tumbuh, dan konsentrasi optimal sumber karbon yang diperlukan untuk biosintesis enzim (Rahayu, 1991).

*Aspergillus oryzae* dikenal sebagai jamur yang paling banyak menghasilkan enzim. Jamur ini mempunyai kelebihan dibanding mikrobia yang lain, antara lain bahwa enzim yang dihasilkan telah dimanfaatkan secara luas pada proses pengolahan pangan dan telah berstatus GRAS (*Generally Recognized As Safe*) dan enzim yang dihasilkan bersifat ekstraselular (Crus & Park, 1982).

Kedudukan taksonomi jamur ini adalah :

Divisi	:	Amastigomycota
Sub divisi	:	Deuteromycotina
Kelas	:	Hyphomycetidae
Ordo	:	Moniliales
Family	:	Moniliaceae
Genus	:	<i>Aspergillus</i>
Spesies	:	<i>Aspergillus oryzae</i>

(Bender *et al.*, 1984)



Gambar 2. Morfologi *Aspergillus* (Tjitrosoma & Sutami, 1989).



#### **D. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas $\alpha$ -amilase**

Enzim merupakan protein fungsional yang banyak terdapat pada sel hidup. Supaya aktivitas enzim di dalam sel dapat dipertahankan maka diperlukan kondisi tertentu supaya enzim dalam keadaan aktif. Menurut Volk dan Wheeler (1993) faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim diantaranya adalah : pH, suhu dan kadar substrat.

Derajat keasaman (pH) larutan sangat mempengaruhi aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena asam amino yang merupakan pusat aktif enzim harus dalam keadaan ionisasi yang tepat agar menjadi aktif. Untuk setiap enzim dapat ditentukan nilai pH minimum, maksimum, dan optimum. Menurut Way *et al.* (1979), perubahan pH akan mempengaruhi sisi aktif dan konformasi dari enzim tersebut. Nilai pH optimum akan menyebabkan pengaruh yang bersifat reversibel pada kecepatan reaksi maksimum ( $V_{max}$ ), perubahan afinitas substrat atau enzim, dan perubahan stabilitas dari enzim. Hampir semua jenis enzim ekstraseluler termasuk  $\alpha$ -amilase diproduksi pada pH yang hampir sama dengan pH pertumbuhan sel (Rahayu, 1991). Menurut Fogarty dan Kelly (1980), pH optimum  $\alpha$ -amilase berkisar antara 5,5 –8 dan akan tetap stabil pada pH ekstrim jika ada suplai senyawa yang mengandung ion kalsium.

Laju reaksi enzim meningkat sampai suhu optimum kemudian berkurang sampai suhu maksimum tercapai. Meningkatnya suhu di atas optimum yang diikuti menurunnya aktivitas biasanya disebabkan oleh perusakan enzim. Suhu optimum untuk produksi enzim secara ekstraselular lebih rendah dibandingkan

dengan suhu optimal pertumbuhan mikrobia penghasil enzim tersebut (Rahayu, 1991). Menurut Crueger & Crueger (1990), suhu optimal untuk enzim adalah 27 – 30° C, apabila terdapat ion kalsium maka inaktivasi enzim ini dapat dikurangi.

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh adanya kofaktor yang merupakan faktor esensial yang dapat menambah daya katalitik enzim tersebut. Menurut Whitaker (1972), secara umum kofaktor suatu enzim dikelompokkan menjadi 3 yaitu : koenzim, gugus prostetik, dan ion anorganik. Koenzim adalah kofaktor yang berupa senyawa organik kompleks, contohnya: B<sub>12</sub>, ATP, dan pyridin, sedangkan gugus prostetik adalah kofaktor yang terikat secara permanen pada protein enzim, contohnya: flavin dan metal porfirin.

Contoh beberapa ion anorganik adalah kation bervalensi ganda seperti Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, dan Ni<sup>2+</sup>. Secara umum bentuk kation mempunyai peran spesifik dalam reaksi sedangkan bentuk anion mempunyai peran yang lebih umum dalam proses modulasi aktivitas dari enzim. Fungsi kation dalam proses katalisis enzim menurut Whitaker (1972), dapat dikelompokkan ke dalam 4 kategori :

1. Kation berfungsi sebagai komponen esensial dari sisi aktif enzim.
2. Kation menjadi bagian dalam kofaktor esensial yang lain, contohnya klorofil, kofaktor heme, dan koenzim B<sub>12</sub>
3. Kation penting dalam pemeliharaan konformasi dari sisi aktif enzim.
4. Kation dapat menjadi bagian dari substrat yang akan dirombak enzim.

Contoh dari fungsi-fungsi di atas diantaranya adalah :

- a. Kation  $Zn^{2+}$  yang penting dalam aktivitas karboksipeptidase pada saat transformasi substrat menjadi produk.
- b. Kation  $Ca^{2+}$  yang berfungsi untuk menjaga keutuhan struktur sisi aktif dari enzim  $\alpha$ -amilase.
- c. Enzim golongan kinase memerlukan kation  $Mg^{2+}$  yang akan bereaksi dengan ATP membentuk kompleks  $MgATP^{2-}$  yang merupakan substrat bagi enzim.

Anion secara umum berperan dalam menjaga kestabilan struktur enzim. Contohnya adalah ion  $Cl^-$  yang berpengaruh pada pH optimum enzim dalam aktivitasnya, jika ada ion  $Cl^-$  pH optimumnya adalah 6 sedangkan jika tidak ada ion  $Cl^-$  pH optimumnya adalah 7.

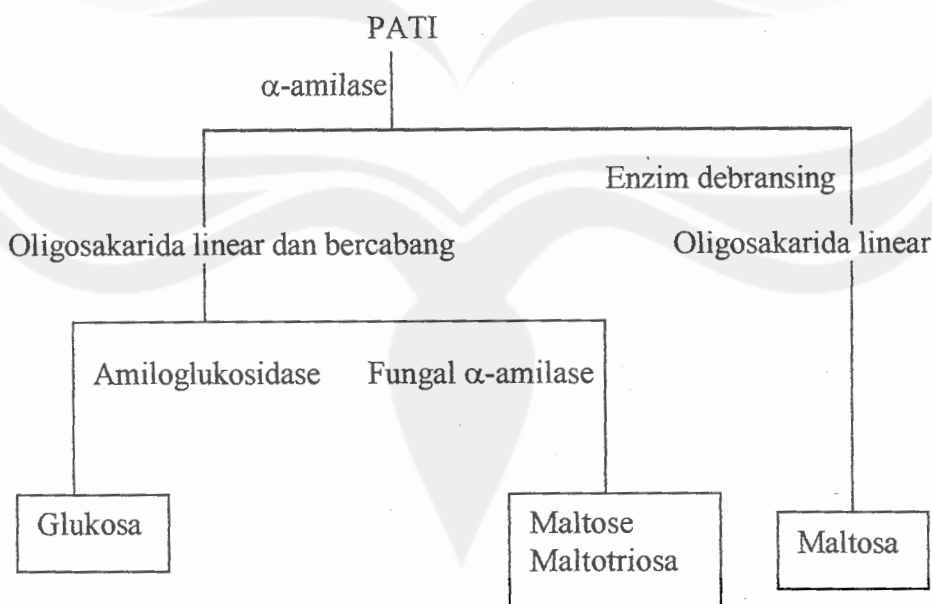
Menurut Bender *et al.*(1984), adanya ion logam dalam enzim akan berperan dalam mensubstitusi proton dalam reaksi. Reaksi-reaksi yang terjadi biasanya menyangkut transfer proton secara simultan antara substrat dan enzim. Hal ini tidak lepas dari sifat sisi aktif enzim yang dapat memberikan gugus R residu asam amino spesifik yang merupakan pemberi dan penerima proton yang baik (Lehninger, 1990).

#### **D. Pemanfaatan $\alpha$ -amilase**

Aktivitas biologi enzim telah lama dimanfaatkan oleh para peneliti dan teknologian. Produksi enzim secara besar-besaran terbukti cukup memberikan

keuntungan ekonomis. Berdasarkan data yang sudah diperoleh, produksi  $\alpha$ -amilase di dunia mencapai 320 ton per tahun dengan penjualan 12 juta pertahun (Eveleigh, 1981)

Salah satu manfaat  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan oleh *A. oryzae* adalah dalam pembuatan roti dan pembuatan pasta sayur Cina yang dinamakan *chiang* (Raper & Fennel, 1977) dalam skala industri. Manfaat penting lainnya adalah dalam proses sakarifikasi untuk membuat sirup maltosa, pembuatan alkohol dan sirup coklat (Fogarty & Kelly, 1980). Pengubahan pati menjadi gula, sirup, dan dekstrin merupakan bagian yang terbesar dalam industri (Fogarty & Kelly, 1980). Proses hidrolisis pati menjadi produk akhir berupa glukosa, maltosa, dan maltotriosa dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram alir proses hidrolisis pati (Fogarty & Kelly, 1980)

## F. Hipotesis

Parameter pH, suhu, dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase. Kation dan anion yang ditambahkan dalam bentuk garamnya ke dalam reaksi enzimatik akan berpengaruh terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae*.

