

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ubi Jalar (*Ipomoea batatas L.*)

Ubi jalar ditanam terutama untuk dimanfaatkan umbinya. Umbi ubi jalar bisa dimanfaatkan sebagai pengganti bahan makanan pokok, karena cukup banyak mengandung karbohidrat, yang merupakan sumber kalori potensial^[6]. Ubi jalar termasuk dalam suku kangkung-kangkungan (*convolvulaceae*). Jenis ini banyak ditanam melalui umbinya. Batang tanaman berakar banyak dan menjalar di permukaan tanah, berwarna hijau, kuning atau ungu. Daunnya tunggal dan beraneka-ragam baik bentuk maupun ukurannya. Demikian pula halnya bentuk, warna dan rasa umbinya^[6].

Jenis umbi berwarna putih mengandung kadar air yang lebih sedikit daripada ubi jalar merah. Analisa kimia yang terdapat pada kedua jenis ubi jalar tersebut adalah sebagai berikut:

Tabel 2.1. Kandungan Komponen Kimia Ubi Jalar Putih dan Ubi Jalar Merah
tiap 100 g bahan

Komponen	Jumlah (%)	
	Ubi Jalar Putih	Ubi Jalar Merah
Air	64,60	69,59
Abu	0,98	0,52
Pati	28,19	17,06
Protein	2,07	1,89
Gula	0,38	0,43
Serat kasar	2,16	5,24
Beta karoten	60 SI*	7700 SI*

*1 SI adalah aktivitas dari 0,344 µg kristal retinilasetat

Ubi jalar juga merupakan bahan industri yang potensial. Misalnya untuk bahan industri tepung, pembuatan alkohol, sari karoten, bahan perekat dan sirup (gula cair). Sedangkan zat patinya merupakan salah satu bahan dalam proses pembuatan tekstil dan kertas^[6]. Ubi jalar juga merupakan salah satu sumber penghasil enzim α -amilase, yaitu enzim yang dibutuhkan dalam proses pengubahan amilum menjadi glukosa^[5]. Adapun klasifikasi ubi jalar adalah sebagai berikut:^[8]

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Klass : *Dicotyledoneae*
Ordo : *Tubiflorae*
Familia : *Vonvolvulaceae*
Genus : *Ipomoea*
Spesies : *Ipomoea batatas L.*

2.2. Enzim

Enzim adalah suatu biokatalisator protein yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologis. Enzim dapat mempercepat reaksi kimia tetapi enzim sendiri tidak mengalami perubahan. Jumlah enzim sebelum dan sesudah reaksi adalah tetap^[9].

Enzim merupakan katalisator biologik. Suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan mempunyai suatu mekanisme reaksi yang lebih rendah energi pengaktifannya, sehingga reaksi berjalan lebih cepat. Enzim berfungsi dengan

selektivitas atau spesifitas bertingkat luar biasa tinggi terhadap reaktan yang dikerjakan dan jenis reaksi yang dikatalisasikan.

Pemberian nama secara sistematis dari enzim pada akhir-akhir ini didasarkan atas sejumlah peraturan yang dikenal sebagai Komisi Enzim Internasional (*International Enzyme Commission*) atau sistem IEC, yang diterima oleh *International Union of Biochemistry*. Penggolongan didasarkan atas tipe reaksi yang dikatalisis oleh enzim, sehingga dikelompokkan menjadi 6 golongan, yaitu: *oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase*^[10].

2.2.1. Komponen Enzim

Banyak enzim apabila mengalami hidrolisa sempurna, menghasilkan gugus-gugus atau zat-zat lain selain asam amino. Enzim-enzim yang proteinnya terkonjugasi demikian adalah umum. Ukuran suatu protein terkonjugasi diikhtisarkan sebagai berikut:^[10]

$$\begin{array}{l} \text{Bagian protein (tak aktif)} + \text{Bagian bukan protein} = \text{holoenzim (aktif)} \\ \text{(apoenzim)} \qquad \qquad \qquad \text{gugus prostetik;} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{koenzim;} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{kofaktor ion logam} \end{array}$$

Koenzim yang terikat kuat pada apoenzim disebut gugus prostetik. Molekul koenzim yang terletak pada kedudukan dalam struktur tersier enzim dikenal sebagai pusat aktif. Pusat aktif adalah bagian enzim yang mengikat molekul substrat berdasarkan gugus-gugus yang berkedudukan pada pusat aktif,

yang menyebabkan reaksi dikatalisa oleh enzim^[10]. Kofaktor bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian protein akan terdenaturasi oleh pemanasan. Kofaktor juga dapat berupa ion-ion seperti Fe^{2+} , Mn^{2+} atau Zn^{2+} ^[11].

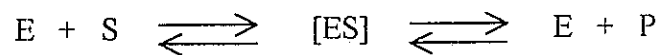
2.2.2. Fungsi dan Mekanisme Kerja Enzim^[2]

Fungsi suatu enzim ialah sebagai suatu katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi $10^8 - 10^{11}$ kali lebih cepat daripada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Seperti juga katalis lainnya, maka enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Reaksi kimia ada yang membutuhkan energi (reaksi endergonik) dan ada pula yang menghasilkan energi (reaksi eksergonik).

Suatu enzim mempunyai sifat spesifik yaitu hanya dapat bereaksi terhadap substrat tertentu pada satu tempat dari bagian enzim (sisi aktif) yang dapat menampung substrat tertentu. Untuk dapat bekerja pada suatu zat atau substrat harus terjadi hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat, karena enzim mempunyai ukuran yang lebih besar daripada substrat. Hanya satu tempat dari bagian enzim (sisi aktif) yang dapat menampung substrat, sehingga tidak seluruh bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat. Apabila substrat mempunyai bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat ditampung pada bagian aktif enzim.

Hubungan antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat, bersifat sementara, dan akan terurai lagi apabila reaksi

yang diinginkan telah terjadi. Mekanisme pembentukan dan peruraian kompleks dapat digambarkan sebagai berikut:



Ada dua teori yang menerangkan mekanisme pengikatan substrat oleh enzim. Pertama, teori kunci dan anak kunci (*lock and key*) yang menyatakan bahwa bentuk ruang dan konformasi bagian aktif enzim adalah khusus sedemikian rupa sehingga molekul substrat dengan bentuk yang khusus akan dapat masuk pada bagian aktif seperti sepasang kunci dan anak kuncinya. Kedua, teori *induced fit* yang menyatakan bahwa perubahan konformasi molekul enzim terjadi untuk menyesuaikan dirinya dengan bentuk molekul substrat. Jadi kompleks yang terjadi disebabkan oleh induksi substrat terhadap konformasi enzim. Dalam hal ini fleksibilitas konformasi enzim merupakan fungsi dari proses katalitik.

2.2.3. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Konsentrasi Enzim^[2]

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim.

Konsentrasi Substrat^[2]

Pada konsentrasi enzim yang tetap, bertambahnya konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar.

Agar dapat terjadi kompleks enzim-substrat perlu adanya kontak antara enzim dengan substrat. Kontak ini terjadi pada suatu tempat atau bagian enzim yang disebut bagian aktif. Pada konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim ini hanya menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan enzim pada bagian aktifnya. Dengan demikian konsentrasi kompleks enzim-substrat makin besar, dan hal ini menyebabkan makin besarnya kecepatan reaksi. Pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif telah dipenuhi oleh substrat atau telah jenuh dengan substrat. Dalam keadaan ini, bertambah besarnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi kompleks enzim-substrat, sehingga jumlah hasil reaksinya juga tidak bertambah besar.

Temperatur¹²¹

Reaksi yang menggunakan katalis enzim juga dipengaruhi oleh temperatur. Pada temperatur rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada temperatur yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Enzim adalah suatu protein, maka kenaikan temperatur dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif enzim akan terganggu sehingga konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya juga akan menurun.

Kenaikan temperatur sebelum terjadinya proses denaturasi dapat meningkatkan kecepatan reaksi. Tetapi kenaikan temperatur pada saat mulai terjadinya proses denaturasi akan mengurangi kecepatan reaksi. Oleh karena ada

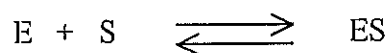
dua pengaruh yang berlawanan, maka akan diperoleh temperatur optimum, yaitu temperatur yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim tertentu.

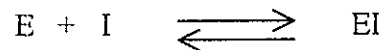
Pengaruh pH^[2]

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungan. Enzim dapat bermuatan positif, negatif, atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat. Pada pH rendah atau pH tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi, dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Suatu pH tertentu yang dapat menyebabkan kecepatan reaksi paling tinggi disebut pH optimum.

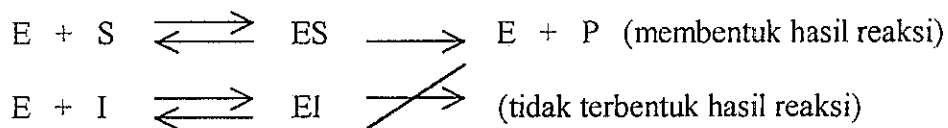
Pengaruh Inhibitor^[2]

Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dapat berupa hambatan tidak reversibel atau hambatan reversibel. Hambatan tidak reversibel pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim. Hambatan reversibel dapat berupa hambatan bersaing atau hambatan tidak bersaing. Hambatan bersaing disebabkan karena ada molekul yang mirip dengan substrat, yang dapat pula membentuk kompleks, yaitu kompleks enzim-inhibitor (EI). Pembentukan kompleks EI ini sama dengan pembentukan kompleks ES, yaitu melalui penggabungan inhibitor dengan enzim pada bagian aktif enzim. Sehingga terjadi persaingan antara inhibitor dengan substrat terhadap bagian aktif enzim melalui reaksi sebagai berikut:



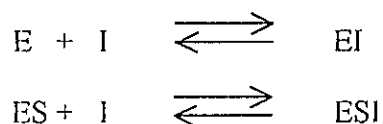


Inhibitor yang menyebabkan hambatan bersaing disebut inhibitor bersaing. Inhibitor bersaing menghalangi terbentuknya kompleks ES dengan cara membentuk kompleks EI. Berbeda dengan kompleks ES, kompleks EI ini tidak dapat membentuk hasil reaksi (P).



Dengan demikian adanya inhibitor bersaing dapat mengurangi peluang bagi terbentuknya kompleks ES dan hal ini menyebabkan berkurangnya kecepatan reaksi. Pengaruh inhibitor bersaing ini tidak tergantung pada konsentrasi inhibitor semata, tetapi juga pada konsentrasi substrat. Pengaruh inhibitor bersaing dapat dihilangkan dengan cara menambahkan konsentrasi substrat, sehingga peluang terbentuknya kompleks ES juga makin besar.

Pada hambatan tidak bersaing (*non competitive inhibition*) tidak dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi substrat, dan inhibitor yang melakukannya disebut inhibitor tidak bersaing. Dalam hal ini inhibitor dapat bergabung dengan enzim pada suatu bagian enzim di luar bagian aktif. Penggabungan antara inhibitor dengan enzim ini terjadi pada enzim bebas, atau pada enzim yang telah mengikat substrat yaitu kompleks enzim-substrat.



Penggabungan inhibitor dengan enzim bebas menghasilkan kompleks EI, sedangkan penggabungan dengan kompleks ES menghasilkan kompleks ESI.

Baik kompleks EI maupun ESI bersifat inaktif. Ini berarti bahwa kedua kompleks tersebut tidak dapat menghasilkan hasil reaksi yang diharapkan.

2.3. Enzim α -Amilase

Enzim α -amilase berdasarkan nomenklatur bernama 1,4- α -glukan-glukanohidrolase, dan mempunyai nomor kode EC 3.2.1.1. Enzim α -amilase terdapat pada tanaman, jaringan mamalia dan mikrobia^[1]. Enzim α -amilase dapat diisolasi dari ubi jalar. Diketahui bahwa ubi jalar berasa manis karena adanya aktivitas enzim yang dapat mengubah amilum menjadi glukosa^[5]. Enzim α -amilase merupakan endoenzim karena memecah pati secara acak dari tengah atau dari bagian dalam molekul^[14].

Cara kerja enzim α -amilase terjadi melalui dua tahap. Pertama degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat pula. Tahap kedua relatif sangat lambat, yaitu pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir tetapi caranya tidak acak. Keduanya merupakan kerja enzim α -amilase pada molekul amilosa saja. Kerja enzim α -amilase pada amilopektin akan menghasilkan glukosa, maltosa dan berbagai jenis limit dekstrin. Berat molekul enzim α -amilase sekitar 50.000. Setiap molekul enzim mengandung 1 ion Ca^{2+} ^[11]. Aktivitas enzim ini optimal pada pH 5 – 7. Harga pH optimum dari enzim yang sama dapat berbeda tergantung dari sumbernya. Enzim ini juga sangat stabil dengan pemanasan sampai pada suhu tertentu. Aktivitas enzim ini maksimum pada temperatur antara 40 – 80°C^[12].

Adapun struktur enzim α -amilase sebagai berikut:

	↓	<- β 1->	<	
Pyr fu	MNIKKLTPLLLTLLFFIVLAS---	PVSAAKYLE-----	LEEGGVIMQAFYWDVPGGGI 50	
Pyr sp	M--KKFVALLITMFFVVSMAVAQ	PASAAYSE-----	LEEGGVIMQAFYWDVPAGGI 51	
Thchy	MARKVLVALLVFLVVLV--VSAV	PAKAET-----	LEGGVIMQAFYWDVPGGGI 47	
Thcpr	MGIRKTAAVLIVLVALGISA	VPAAGAA--K'YSS-----	LEDGGVIMQAFYWDVPGGGI 51	
Thcsp	MSAKLLALLFVLAVLVGVA	IPARVGIAPVSAGATSRPS	LEEGGVIMQAFYWDVPAGGI 60	
	*	*	* * * * * * * * * * * * *	
	<--- α 1----->	<--- β 2-->		
Pyr fu	WWDHIRSKIPEWYEAGISAI	WLPPPSKMGSGGYSMGYD	PYDFDLGEYYQKGTVETRFGS 110	
Pyr sp	WWDTIRSKIPEWYEAGISAI	WPPASKMGGAYSMGYD	PYDFDLGEYNQKGTVETRFGS 111	
Thchy	WWDTIAQKIPDASAGISAI	WPPASKMGSGGYSMGYD	PYDFDLGEYYQKGSVETRFGS 107	
Thcpr	WWDTIRSKIPEWYDAGISAI	WPPASKMGSGNSSMGYD	PYDFDLGEYYQKGTVETRFGS 111	
Thcsp	WWDTIRSKI PDASAGISAI	WPPASKMGSGAYSMGYD	PYDFDLGEYYQKGTVETRFGS 120	
	* * * *	* * * * *	* * * * * * * * * * * * *	
	<--- α 2----->	<--- β 3----->		
Pyr fu	KEELVRLIQTAHAYGIKVI	ADVVINHRAGGDLEWNP	PFVGDYTWDFSKVASGKYTANYLD 170	
Pyr sp	KQELINMINTAHAYGIKVI	ADIVINHRAGGDLEWNP	PFVGDYTWDFSKVASGKYTANYLD 171	
Thchy	KEELVMINTAHAHNMKVI	ADIVINHRAGGDLEWNP	FTNSYTWDFSKVASGKYTANYLD 167	
Thcpr	KQELVDMINTAHSYGIKVI	ADIVINHRAGGDLEWNP	FTNSYTWDFSKVASGKYTANYED 171	
Thcsp	KQELINMINTAHSYGIKVI	ADIVINHRAGGDLEWNP	FTNSYTWDFSKVASGKYTANYLD 180	
	* * *	* * * * *	* * * * * * * * * * * * *	
	loop3	<- α 3->	<--- β 4-->	
Pyr fu	FHPNELHCCDEGTFGGF	PDIAHEKEWDQHWLWAS	DESYAAYLRSIGVDARFQYVKGYGA 230	
Pyr sp	FHPNEVKCCDEGTFGGF	PDIAHEKEWDQHWLWAS	DESYAAYLRSIGVDARFQYVKGYGA 231	
Thchy	FHPNELHAGDSGTFGGY	PDICHKSWDQHWLWAS	NESYAAYLRSIGIDARFQYVKGYAP 227	
Thcpr	FHPNEVKCCDEGTFGGF	PDIAHEKSWDQHWLWAS	DESYAAYLRSIGVDARFQYVKGYGA 231	
Thcsp	FHPNEVKCCDEGTFGGF	PDIAHEKSWDQHWLWAS	QKSYAAYLRSIGIDARFQYVKGYGA 240	
	* * * *	* * * * *	* * * * * * * * * * * * *	
	<--- α 4->	<--- β 5-->	<--- α 5-->	
Pyr fu	WVVRDNLNWWGGWAVG	BYWDTNVDALLSWAY	ESGAKVFDFPLYKMD	EAFDNNNIPALVY 290
Pyr sp	WVVKDNLNWWGGWAVG	BYWDTNVDALLNWAY	SSGAKVFDFPLYKMD	EAFDNTNIPALVI 291
Thchy	WVVKDNLNWWGGWAVG	BYWDTNVDALLSWAY	DSGAKVFDFPLYKMD	EAFDNNNIPALVI 287
Thcpr	WVVKDNLNWWGGWAVG	BYWDTNVDALLSWAY	DSNARVFDFPLYKMD	EAFDNNNIPALVI 291
Thcsp	WVVKDNLNWWGGWAVG	BYWDTNVDALLNWAY	SSGAKVFDFPLYKMD	EAFDNNNIPALVS 300
	* * *	* * * * *	* * * * * * * * * * * * *	
	>	<- β 7->	<--- α 7->	
Pyr fu	ALQNGQTVVSRDPFKAVT	FVANHTDI IWNKY	PAYAFILTYEGQPVI FYRDEE	EWLNKDK 350
Pyr sp	ALQNGGTVVSRDPFKAVT	FVANHTDI IWNKY	PAYAFILTYEGQPVI FYRDEE	EWLNKDK 351
Thchy	ALKNGGTVVSRDPFKAVT	FVANHTNI IWNKY	PAYAFILTYEGQPAI FYRDEE	EWLNKDK 347
Thcpr	ALQNGQTVVSRDPFKAVT	FVANHTDI IWNKY	PAYAFILTYEGQPVI FYRDEE	EWLNKDK 351
Thcsp	ALQNGQTVVSRDPFKAVT	FVANHTDI IWNKY	PAYAFILTYEGQPVI FYRDEE	EWLNKDK 360
	* * *	* * * * *	* * * * * * * * * * * * *	
	$\beta\beta\beta\beta$	$\beta\beta\beta\beta$	$\beta\beta\beta\beta\beta\beta$	
Pyr fu	LINLIWIHDHLAGGSTT	I VVYDND	ELI FVRNGDSRRPGLITY	INLSPNWVGRWVYVPKFA 410
Pyr sp	LNNLIWIHDHLAGGSTS	I VVYDSD	ELI FVRNGDSKRPGLITY	INLGSSKVGWVYVPKFA 411
Thchy	LRNLIWIHDHLAGGSTD	I IYDSD	ELI FVRNGYGDKPLITY	INLGSSKAGRWVYVPKFA 407
Thcpr	LNNLIWIHEHLAGGSTK	I LYDSD	ELDIRKRGLRRTGPH---	NIYQS---WKYRLD--- 402
Thcsp	LKNLIWIHNHLAGGSTS	I VVYDND	ELI FVRNGYGNKPLITY	INLGSSKVGWVYVPKFA 420
	* * * * *	* * * * *	* * * * * * * * * * * * *	
	$\beta\beta\beta$	$\beta\beta\beta\beta$		
Pyr fu	GACIHEYTGNLGGWVDK	RVDSSGWVYLEAPHPD	PANGYY--GYSVWSY	CGVG- 460
Pyr sp	GACIHEYTGNLGGWDR	YVSSGWVYLEAPAYD	PASGQY--GYTVWSY	CGVGG 462
Thchy	GSCIHEYTGNLGGWID	KWVDSSGRVYLEAPAH	DPANGQY--GYSVWSY	CGVG- 457
Thcpr	-----	-----	-----	----- 402
Thcsp	GSCIHEYTGNLGGWDR	YVGSNGWVYLEAPAH	DPAKGQYFTGYSVWSY	CGVG- 472

Gambar 2.1. Komposisi asam amino penyusun enzim α -amilase

Keterangan gambar: ^[15]

Sumber enzim α -amilase disingkat sebagai berikut: Pyr_{fu}, *Pyrococcus furiosus* strain DSM3638; Pyr_{sp}, *Pyrococcus* species strain KOD1; Thc_{hy}, *Thermococcus hydrothermalis* strain AL662; Thc_{pr}, *Thermococcus profundus* strain JCM9378; dan Thc_{sp}, *Thermococcus* species strain Rt3.

A = Alanin	C = Sistein
D = Aspartat	E = Glutamat
F = Fenilalanin	G = Glisin
H = Histidin	I = Isoleusin
K = Lisin	L = Leusin
M = Metionin	N = Asparagin
P = Prolin	Q = Glutamin
R = Arginin	S = Serin
T = Treonin	V = Valin
W = Triptofan	Y = Tirosin

2.4. Penentuan Aktivitas Enzim α -Amilase

Menurut perjanjian internasional, satu unit aktivitas enzim adalah aktivitas enzim yang dapat menghasilkan sejumlah produk atau menurunkan sejumlah substrat pada keadaan optimal dari sistem tersebut. Aktivitas spesifik merupakan jumlah unit aktivitas enzim per miligram protein enzim tersebut ^[11].

Pada penelitian ini, aktivitas enzim α -amilase dihitung berdasarkan satuan waktu inkubasi optimum, sehingga 1 unit aktivitas enzim α -amilase merupakan

1 μmol produk glukosa yang terbentuk dari substratnya amilum per satuan waktu inkubasi dalam keadaan optimal sistem tersebut^[9]. Karena produk yang terbentuk adalah glukosa, maka banyaknya μmol produk yang terbentuk dihitung berdasarkan rumus kurva standar larutan glukosa. Metode yang digunakan untuk menganalisa glukosa yang terbentuk adalah metode Nelson–Somougyi. Serapan sinarnya diukur dengan alat Spektrofotometri UV–VIS Shimadzu, sehingga diperoleh absorbansinya. Penggunaan alat spektrofotometer UV–VIS ini sesuai dengan hukum Lambert –Beer, yaitu:

$$-\log T = A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Di mana: T = transmitansi

A = absorbansi

ϵ = koefisien ekstingsi molar produk ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)

b = tebal cuvet (cm)

c = konsentrasi (M)

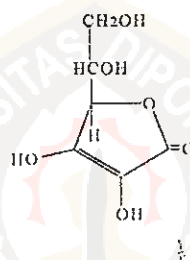
Pada pengukuran ini ϵ dan b dianggap konstan, dan penentuan absorbansi atau transmitansi dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi yang belum diketahui^[13]

Kemudian dibuat kurva standar larutan glukosa, sehingga dapat diperoleh suatu persamaan. Dari persamaan itu dapat dihitung aktivitas enzim α -amilase pada panjang gelombang optimumnya. Kadar protein enzim juga harus ditentukan agar dapat menghitung aktivitas spesifik enzim α -amilase tersebut. Metode yang digunakan untuk menganalisis kadar protein enzim adalah metode Lowry. Serapan sinarnya diukur dengan alat spektrofotometer UV–VIS Shimadzu,

sehingga diperoleh nilai absorbansinya. Kurva standar larutan protein dibuat dengan mengukur larutan standar kasein melalui variasi konsentrasi pada panjang gelombang optimumnya. Diperoleh suatu persamaan, dan dari persamaan itu dapat dihitung kadar protein enzim α -amilase. Aktivitas spesifik enzim α -amilase dapat ditentukan dengan membandingkan jumlah unit aktivitas enzim α -amilase terhadap mg protein enzim α -amilase.

2.5. Asam Askorbat

Rumus kimia asam askorbat adalah sebagai berikut:



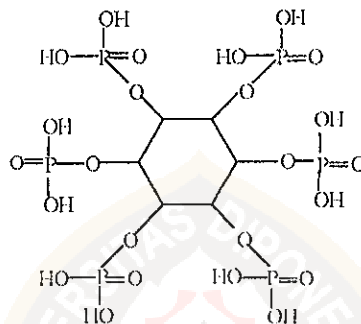
Gambar 2.2. Struktur Asam Askorbat

Dalam larutan air, asam askorbat mudah dioksidasi, terutama apabila dipanaskan. Oksidasi dipercepat apabila ada tembaga atau suasana alkalis. Bentuk teroksidasinya adalah asam dehidroaskorbat. Dengan demikian asam askorbat juga berperan menghambat reaksi-reaksi oksidasi dalam tubuh yang berlebihan dengan bertindak sebagai inhibitor^[2].

2.6. Asam Fitat

Fitat menyusun kira-kira 1–2% berat dari sereal dan biji-bijian penghasil minyak. Asam fitat dalam biji berfungsi sebagai sumber energi untuk proses

perkecambahan. Asam fitat dapat berfungsi sebagai sumber fosfor dalam tanaman. Besarnya kandungan asam fitat yang terdapat dalam biji gandum dapat mencapai 53%. Asam fitat dapat berikatan dengan protein membentuk senyawa yang tidak larut. Asam fitat dapat berikatan secara kuat dengan protein di bawah titik isoelektriknya. Bentuk ikatan tersebut merupakan ikatan elektrostatik antara gugus fosfat anionik dari asam fitat dengan gugus kationik dari protein. Struktur dari asam fitat sebagai berikut: ^[15]

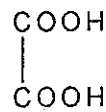


Gambar 2.3. Struktur Asam Fitat

Di dalam biji dan bahan makanan dari biji-bijian, selama proses pengolahan asam fitat dapat berikatan dengan ion logam, misalnya Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} dan Ca^{2+} , membentuk senyawa yang tidak larut atau senyawa yang disebut fitin. Asam fitat dapat membentuk garam yang tidak larut apabila asam fitat berikatan dengan kalsium atau mineral yang lain, sehingga mineral tersebut tidak dapat diserap oleh dinding usus. ^[15]

2.7. Asam Oksalat

Asam oksalat adalah asam dikarboksilat yang hanya terdiri dari dua atom C pada masing-masing molekul, oleh karena itu dua gugus karboksilat berada berdampingan. Strukturnya sebagai berikut:



Gambar 2.4. Struktur Asam Oksalat

Asam oksalat dalam keadaan murni berupa senyawa kristal, larut dalam air (8% pada 10°C) dan larut dalam alkohol. Asam oksalat membentuk garam netral dengan logam alkali (Na, K), yang larut dalam air (5-25%), sementara itu dengan logam dari alkali tanah, termasuk Mg atau dengan logam berat, mempunyai kelarutan yang sangat kecil dalam air. Jadi kalsium oksalat secara praktis tidak larut dalam air. Berdasarkan sifat tersebut asam oksalat digunakan untuk menentukan jumlah kalsium^[16].

2.8. Presipitasi

Pada umumnya metode pemurnian enzim tidak berbeda dengan prinsip untuk pemurnian protein, karena enzim mengandung protein. Metode tersebut salah satunya dengan pengendapan / presipitasi. Jadi tujuan dari presipitasi adalah untuk mendapatkan enzim yang murni melalui proses pengendapan secara bertingkat dalam berbagai fraksi dengan penambahan garam. Pengendapan protein dengan cara penambahan garam ini didasarkan pada pengaruh yang berbeda-beda dari penambahan garam tersebut pada kelarutan protein. Proses ini dipengaruhi oleh konsentrasi dan jumlah muatan pada tiap ion dalam larutan. Dalam proses ini garam divalen seperti: MgCl₂, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄, lebih efektif daripada garam monovalen seperti: NaCl, NH₄Cl, dan KCl. Bila konsentrasi garam netral yang ditambahkan tersebut dinaikkan terus, maka kelarutan protein menjadi berkurang,

sampai pada konsentrasi tertentu protein akan mengalami pengendapan, efek ini disebut *salting out*. Cara *salting out* ini dapat dipakai untuk pemisahan protein dalam campuran, karena tiap jenis protein mempunyai respon yang berbeda pula terhadap konsentrasi garam netral^[11].

2.9. Dialisis

Salah satu cara yang dapat dilaksanakan untuk pemurnian suatu biomolekul adalah dialisis. Dialisis digunakan untuk memisahkan molekul besar dan kecil menggunakan membran semipermeabel (yang dapat dilewati molekul kecil tetapi menahan molekul besar). Membran yang digunakan biasanya berupa selofan atau kantong dialisis. Suatu campuran molekul besar dan kecil ditempatkan dalam sebuah kantong dialisis yang dimasukkan pada suatu pelarut dengan konsentrasi sangat rendah dibandingkan dengan konsentrasi larutan bufer di dalam selofan. Molekul kecil dapat melewati membran menuju cairan di luarnya (bufer) hingga kesetimbangan tercapai. Kecepatan dialisis tergantung pada beberapa faktor yaitu membran, preparasi, pelarut, larutan makromolekul dan lain-lain^[17].

Selama proses dialisis temperatur diatur sedemikian rupa sehingga adanya pengadukan dengan magnetik stirer yang berlangsung selama 8–10 jam tidak menaikkan temperatur. Temperatur yang meningkat dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein. Untuk mencegah peningkatan temperatur maka proses dialisis dilakukan pada temperatur dingin^[17].