



Studi Kinetika Hidrolisis Enzimatik Pati Singkong: Pengaruh Perbandingan Alfa-Amilase dan Glukoamilase Terhadap Gula Reduksi

Hargono^{1*}, Andri Cahyo Kumoro², dan Bakti Jos³

¹⁾Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro
Jl. Prof.Sudharto, Tembalang, Semarang, 50275, Telp./Fax. (024) 7460058/(024) 76480675

*E-mail : hargono_tkundip@yahoo.co.id

Abstract

The kinetic study on enzymatic hydrolysis of cassava starch (*Manihot esculenta*) was studied. This hydrolysis experiment was carried out cassava starch at concentration of 200 g/L, using a test jar, with stirrer and water bath. The cassava starch was hydrolyzed by α -amylase and glucoamylase at 100 rpm, 90°C and pH 4.5. The effect of ratio of two enzymes, α -amylase and glucoamylase (1:1, 1:2, 1:3, 2:1 and 3:1) on the kinetic hydrolysis of cassava starch was studied, Increasing the ratio of α -amylase and glucoamide has an effect on the increase of reducing sugar concentration. The ratio of mass of α -amylase and glucoamide 1: 3, yields the maximum reduction sugar concentration was 93.45 g/L. The larger the mass of glucoamylase, the greater this enzyme in producing reducing sugars. This suggests that glucoamylase activity is more dominant in degrading the cassava starch or α -amylase unable to access the starch granule component, this enzyme can only hydrolyze the α -1,4 glycoside bond, which is far from the end of the chain and branch point, unlike glucoamylase capable hydrolyzes α -1,4 and α -1,6 complete glycoside bonds. Hydrolysis of cassava starch, using a mixture of α -amylase and glucoamylase at a ratio of 1: 1, substrate concentration 200 g/L, at temperature (60-90 °C), and pH 4.5, showed 1st order reaction with reaction rate constant, k is 0.086; 0.106; 0.128 and 0.194 hours⁻¹, respectively, whereas the activation energy, $E_a = 26.28$ J/mol

Keywords: enzymatic hydrolysis, ratio of α -amylase and glucoamylase, cassava starch, 1st order reaction.

Pendahuluan

Hidrolisis enzimatik pati merupakan salah satu reaksi enzimatik yang penting (Presecki *et al.*, 2013). Tahap likuifikasi merupakan proses hidrolisis yang umumnya terjadi melalui dispersi granula pati yang tidak larut dalam air, dilanjutkan dengan hidrolisis parsial pada suhu yang relatif tinggi (85-105⁰C) menggunakan α -amilase, dimana enzim ini akan akan mengkatalis dalam memecah pati (hasil gelatinisasi) menjadi dekstrin (gula kompleks). Sakarifikasi adalah lanjutan proses likuifikasi, yaitu pemecahan dekstrin menjadi gula oleh glukoamilase, berlangsung pada suhu 55-60⁰C (Sriroth *et al.*, 2012). Likuifikasi umumnya melibatkan gelatinasi baik sebelum atau sesudah penambahan α -amilase, sedangkan gelatinisasi disertai pembengkakan dan gangguan granula pati serta melelehnya struktur kristal (Bogracheva, *et al.*, 1998), Mandala dan Bayas (2004). Kedua proses ini dikenal sebagai hidrolisis konvensional. Beberapa faktor yang mempengaruhi likuifikasi pati meliputi sumber dan konsentrasi pati, sumber dan aktivitas α -amilase, penambahan ion kalsium yang berhubungan dengan aktivitas dan kestabilan α -amilase; juga kondisi reaksi, seperti temperatur, pH (Ariff *et al.*, 1997; Baruque *et al.*, 2000; Kheder *et al.*, 2008; Presecki *et al.*, 2013). Hidrolisis konvensional membutuhkan energi yang cukup besar, diperkirakan 30-40 % dari total energi yang dibutuhkan untuk memproduksi etanol dari pati (Robertson *et al.*, 2006).

Tujuan penelitian ini adalah mengkaji kinerja enzim campuran α -amilase dan glukoamilase pada proses hidrolisis, mencari data kinetika pengaruh suhu dan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi gula reduksi, penentuan tetapan reaksi dan tenaga aktivasi.

Metode Penelitian

Ubi Singkong

Ubi singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang digunakan sebagai sumber pati diperoleh dari desa Pung Wetan, Kecamatan Jatipuro, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Umur ubi 10 bulan. Sifat fisis dan kimia ubi casava adalah sebagai berikut, kandungan air 9,24% (b/b), pati 85,54% (b/b).





Pembuatan pati singkong

Pembuatan pati singkong dilakukan secara konvensional, diawali dengan pengupasan kulit pada ubi singkong, dilanjutkan pencucian dan pamarutan. Hasil parutan ditambah air, selanjutnya dilakukan pemerasan agar pati bisa terekstrak dan terpisah dari ampasnya. Campuran air dan pati dipisahkan menggunakan sentrifuse (alat pemusing) agar diperoleh pati dengan kandungan air yang rendah, selanjutnya pati tersebut dikeringkan dengan sinar matahari selama 3 hari berturut-turut sampai kandungan airnya minimal. Hasil pati singkong, selanjutnya disimpan dalam almari pendingin agar komponen di dalam pati tidak rusak.

Bahan kimia

Potasium sodium tartrat tetrahidrat (Merck), DNS (3,5-dinitrosalicic acid), sodium hidroksida (98%, Merck), sodium sulfat (98,5%, Merck), asam sulfat (98,5%, Merck), larutan buffer 0,01 M sodium fosfat asam sitrat (Merck), glukosa (99,5%, Merck), semua bahan kimia tersebut dibeli dari Sigma-Aldrich Indonesia.

Enzim

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah α -amilase dari *Bacillus licheniformis*, aktivitas 135 KNU/g (KNU), dan *Dextrozyme GA*, *Aspergillus niger* sebagai glukamilase, aktivitas 270 AGU/g, dari Novozyme's, Denmark.

Hidrolisis enzimatik

Reaksi hidrolisis terhadap *slurry* pati singkong pada konsentrasi 200 g/L, dilakukan inkubasi dalam shaker dan dikocok pada kecepatan 100 rpm, selama 10 menit pada pH 4,5. Untuk menjaga pH dikontrol menggunakan larutan buffer 0,01 M sodium phosphate asam sitrat. Selanjutnya untuk proses hidrolisis, *slurry* pati singkong ini dipindahkan ke dalam jar tes (bejana hidrolisis), ditambahkan 1,5% (b/b) campuran α -amilase dan glukamilase 1:1, 1:2, 1:3, 2:1 dan 3:1 (b/b) dan dipanaskan di dalam *water bath* pada suhu, yaitu 90°C, selama 15 jam. Setiap periode waktu 3, 6, 9, 12 dan 15 jam, sampel hasil hidrolisis diambil, dilakukan sentrifugasi selama 4 menit pada putaran 100 Hz. Sampel hasil sentrifugasi yang telah terpisah filtratnya disaring agar diperoleh filtrat yang telah bebas dari padatan, selanjutnya filtrat dianalisis untuk ditentukan konsentrasi gula reduksi menggunakan metoda DNS (3,5-dinitrosalicic acid) (Miller, 1959). Kurve larutan standar dibuat terhadap konsentrasi glukosa 0, 5, 10, 15 dan 20 g/L yang diukur absorbansinya menggunakan spektrophotometer pada panjang gelombang 570 nm. Analisis gula reduksi setiap sampel dilakukan tiga replikasi, dihitung rata-rata konsentrasi gula reduksi dan standar deviasi.

Penentuan tetapan kecepatan reaksi pada Hidrolisis Pati Singkong Manis Menggunakan Campuran Alfa-Amilase dan Glukamilase.

Orde reaksi dapat ditentukan melalui hubungan antara $-\ln(C_A/C_{A0})$ versus waktu, dengan C_A adalah konsentrasi gula reduksi yang terbentuk setiap waktu dan C_{A0} adalah konsentrasi substrat awal. Hidrolisis pati singkong manis, pada konsentrasi 200 g/L menggunakan campuran α -amilase dan glukamilase pada perbandingan 1:1, dan pH 4,5 dilakukan pada suhu 60-90°C. Tetapan reaksi ditentukan melalui grafik hubungan antara $-\ln(C_A/C_{A0})$ versus waktu. Apabila kurve grafik menunjukkan linier, maka reaksi yang terjadi merupakan orde pertama. Nilai tetapan reaksi, k ditentukan dari kemiringan garis lurus tersebut.

Perhitungan Tenaga Aktivasi

Perhitungan energi aktivasi, E_a dan A dengan menggunakan plot persamaan Arrhenius,

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2,3 R T} \quad (1)$$

dengan A adalah tetapan Arrhenius; R adalah konstanta gas ideal (8.314 J.mol⁻¹.K⁻¹).

Nilai k yang didapat dari berbagai suhu diplot dengan 1/T, akan didapat kurve garis lurus, sehingga dari kemiringan kurve tersebut didapat E_a , sedangkan tetapan Arrhenius, A didapat dari intersep.

Metoda analisis

Kandungan pati dalam pati casava ditentukan dengan metoda AOAC (AOAC, 1995), kandungan air dalam pati ditentukan dengan metoda pengeringan bahan dalam oven pada suhu 115°C, selama 16 jam sampai massa bahan konstan (AACC, 2005). Penentuan konsentrasi gula reduksi dilakukan dengan metoda *dinitrosalicic acid* (DNS) (Miller, 1959), reagen terdiri dari larutan 1% 3,5-dinitrosalicic acid, 0,05% sodium sulfat, 20% sodium-potasium tartrat dan 1% sodium hidroksid ditambahkan pada rasio 3:1 kedalam sampel dalam tabung reaksi, dikocok dan diinkubasi menggunakan air mendidih selama 8 menit, selanjutnya sampel didinginkan menggunakan air es selama 5 menit, sebelumnya mengukur absorbansi pada 540 nm pada spektrophotometer *UV/visible* (UV-160A, SHIMADZU, Kyoto, Japan). Glukosa murni 0 sampai 10 g/L digunakan sebagai larutan standar, oleh sebab itu

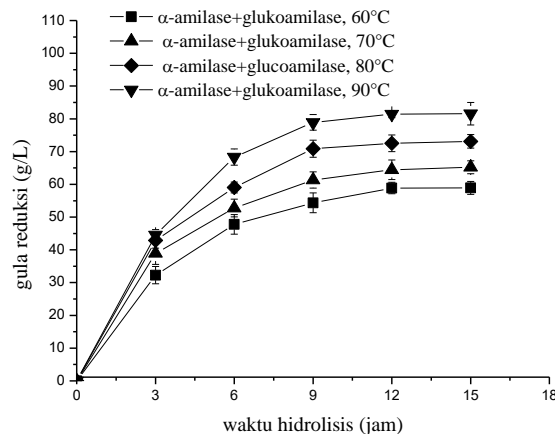


pengukuran gula reduksi ditulis dalam satuan g/L. . Setiap analisis gula reduksi dilakukan 3 replikasi, standar deviasi dibawah 5%.

Hasil dan Pembahasan

Hidrolisis Enzimatik Pati Singkong Manis Menggunakan Campuran α -Amilase dan Glukoamilase Pengaruh Suhu terhadap Gula Reduksi

Pengaruh suhu terhadap gula reduksi dipelajari. Suhu operasi adalah 60, 70, 80 dan 90°C, menggunakan campuran alfa-amilase dan glucoamilase 1:1 (b/b) pada konsentrasi pati singkong 200 g/L, pH 4,5, seperti ditunjukkan pada Gambar 1.

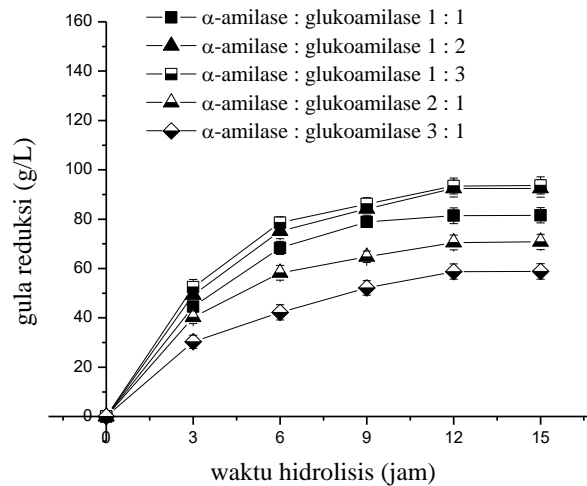


Gambar 1. Pengaruh suhu terhadap gula reduksi pada konsentrasi pati singkong manis 200 g/L, menggunakan perbandingan massa antara α -amilase dan glucoamilase 1:1, pada konsentrasi 1,5% dan pH 4,5. Setiap analisis gula reduksi dilakukan 3 replikasi, standar deviasi dibawah 5%.

Selama hidrolisis 15 jam, pada berbagai variasi suhu operasi 60,70, 80 dan 90°C, gula reduksi yang dihasilkan hampir secara keseluruhan mencapai maksimum pada saat 12 jam, yaitu masing-masing 58,86 g/L (pada operasi suhu 60°C), 64,56 g/L (70°C), 72,54 g/L (80°C) dan 81,42 g/L (90°C). Suhu operasi 90°C menunjukkan suhu tertinggi yang menghasilkan gula reduksi tertinggi. Fujii, *et al.* (1998), melaporkan hasil penelitian tentang pengaruh suhu (30, 37, 45 dan 55°C) terhadap gula reduksi pada pati sagu, konsentrasi 150 g/L, konsentrasi enzim 1,5% (b/v), menggunakan α -amilase yang berasal dari spesies *Bacillus* (90U/mg) dan glucoamilase yang berasal dari spesies *Aspergillus* (73.8U/mg), rasio α -amilase : glucoamilase 50%:50%, selama 10 jam, gula reduksi dihasilkan pada operasi suhu 55°C, yaitu 380 g/L. Ruiz *et al.* (2011) melaporkan hasil penelitian hidrolisis casava, menggunakan Liquozyme® SC DS sebagai α -amilase dan Spirizyme sebagai glucoamilase. mereka menyatakan bahwa temperatur optimal bervariasi, tergantung tipe enzim. Umumnya kecepatan hidrolisis awal meningkat dengan meningkatnya temperatur, yaitu 70 dan 80°C. Suhu yang lebih tinggi akan mempercepat kecepatan reaksi atau mempercepat konversi pati menjadi gula reduksi atau secara kuantitatif konsentrasi gula reduksi bertambah. Agu and Palmer (1996) melaporkan pengaruh suhu terhadap keaktifan α -amilase akan naik dari 10U/g (pada suhu 20°C) menjadi 25U/g (pada suhu 25°C).

Pengaruh Perbandingan Massa α -amilase dan Massa Glukoamilase

Pengaruh perbandingan massa α -amilase dan massa glucoamilase terhadap gula reduksi pada konsentrasi pati singkong manis 200 g/L, suhu 90°C dan pH 4,5, konsentrasi enzim 1,5% (b/b), ditunjukkan pada Gambar 2. Selama hidrolisis sampai 15 jam, untuk semua perbandingan massa alfa-amilase dan massa glucoamilase, waktu optimum dicapai pada 12 jam, seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Perbandingan massa alfa-amilase dan glucoamilase 1:3, menghasilkan konsentrasi gula reduksi maksimum, yaitu 93,45 g/L, dibandingkan dengan perbandingan alfa-amilase dan glucoamilase yang lain, yaitu pada 1:1 (81,42 g/L), 1:2 (92,42 g/L), 2:1 (71,56 g/L) dan 3:1 (58,76 g/L).

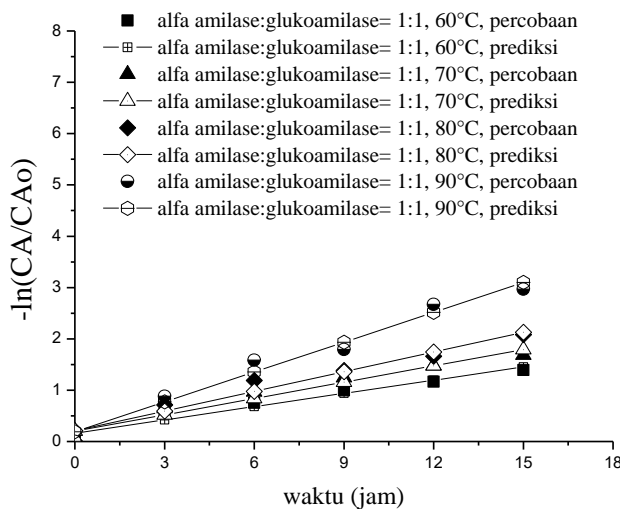


Gambar 2. Pengaruh perbandingan massa α -amilase dan glucoamilase terhadap gula reduksi pada konsentrasi pati singkong 200 g/L, suhu 90°C dan pH 4,5. Setiap analisis gula reduksi dilakukan 3 replikasi, standar deviasi dibawah 5%.

Semakin besar massa glucoamilase, semakin besar pula dalam menghasilkan gula reduksi. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas glucoamilase lebih dominan dalam mendegradasi pati singkong manis, atau dapat diartikan bahwa alfa-amilase tidak mampu mengakses komponen granula pati. Enzim ini hanya dapat menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosida, yang jauh dari ujung rantai dan titik cabang, tidak seperti glucoamilase yang mampu menghidrolisis α -1,4 dan α -1,6 ikatan glikosida secara lengkap (Sakano *et al.*, 1983).

Penentuan Tetapan Kecepatan Reaksi, Orde Reaksi, Hidrolisis Pati Singkong Manis (*Manihot esculenta*) Menggunakan Campuran α -Amilase dan Glukoamilase (1:1) Pada Berbagai Suhu

Orde reaksi dapat ditentukan dengan hubungan antara $-\ln(C_A/C_{A0})$ versus waktu. Hubungan antara $-\ln(C_A/C_{A0})$ versus waktu pada berbagai suhu pada hidrolisis pati singkong manis (*Manihot esculenta*) menggunakan campuran α -amilase dan glucoamilase (perbandingan 1:1), konsentrasi substrat 200 g/L, pada pH 4, ditunjukkan pada Gambar 3, sedangkan nilai tetapan kecepatan reaksi ditunjukkan pada Tabel 1.



Gambar 3. Hubungan antara $-\ln(C_A/C_{A0})$ dengan waktu, pada hidrolisis pati singkong manis menggunakan campuran α -amilase dan glucoamilase (perbandingan 1:1), konsentrasi substrat 200 g/L, pada berbagai suhu, pH 4,5

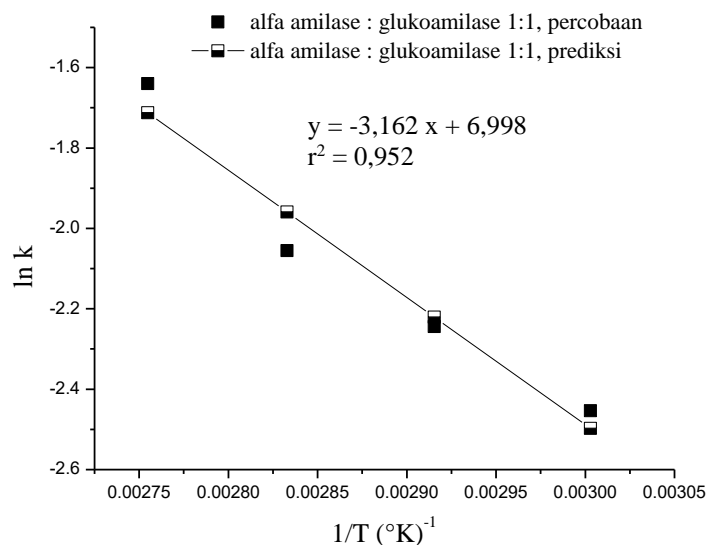
Tabel 1. Tetapan Kecepatan Reaksi (k), Koefisien Korelasi (R^2) dan Persamaan Regresi Orde Satu pada Hidrolisis Pati Singkong Manis, Menggunakan Campuran α -amilase dan glukoamilase (perbandingan 1:1), Konsentrasi Substrat 200 g/L, pada Berbagai Suhu, dan pH 4,5

Temperatur, °C	k, jam ⁻¹	R^2	Persamaan garis
60	0,086	0,952	$y = 0,086 x + 0,164$
70	0,106	0,951	$y = 0,106 x + 0,202$
80	0,128	0,958	$y = 0,128 x + 0,210$
90	0,194	0,973	$y = 0,194 x + 0,190$

Hasil hidrolisis enzimatis pati singkong manis menggunakan campuran α -amilase dan glukoamilase (perbandingan 1:1), konsentrasi substrat 200 g/L, pada berbagai suhu (60-80°C), pH 4,5, menunjukkan bahwa kurve hubungan antara $-\ln(C_s/C_{s0})$ dengan waktu untuk setiap suhu cenderung lurus yang menandakan bahwa reaksi hidrolisis ini adalah orde 1, dengan nilai tetapan kecepatan reaksi untuk masing-masing suhu (60-90°C), ditunjukkan pada Tabel 1.

Penentuan Energi aktivasi pada Hidrolisis Pati Singkong Manis (*Manihot esculenta*) Menggunakan Campuran α -Amilase dan Glukoamilase (1:1) Pada Berbagai Suhu dan pH 4,5

Penentuan tenaga aktivasi (E_a), menggunakan persamaan Arrhenius, $k = A e^{-E_a/RT}$ atau $\ln k = \ln A - E_a/R T$. Plotting $\ln k$ versus ($1/T$) akan menghasilkan kurve yang cenderung lurus dengan kemiringan negatif, seperti ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan antara $\ln k$ dengan $1/T$ pada hidrolisis menggunakan campuran α -amilase dan glukoamilase (1:1) pada berbagai suhu (60-90 °C), pH 4,5

Diperoleh kemiringan/slope = $-E_a/R = -3.162$. Bila tetapan gas ideal, $R = 8,314 \text{ J/mol K}$, maka diperoleh $E_a = 26,28 \text{ J/mol}$. Energi aktivasi, E_a yang diperoleh adalah konsisten dengan energi aktivasi reaksi umumnya yang dikatalisis oleh enzim, yang harganya 6-84 $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Shuler dan Kargi, 1992).

Kesimpulan

Perbandingan massa alfa-amilase dan glukoamilase 1:3, menghasilkan konsentrasi gula reduksi maksimum, Hidrolisis pati singkong manis, menggunakan campuran α -amilase dan glukoamilase pada perbandingan 1:1, konsentrasi substrat 200 g/L, pada suhu (60-90°C), dan pH 4,5, menunjukkan reaksi orde 1, dengan tetapan kecepatan reaksi, k sebagai fungsi suhu, masing-masing adalah 0,086; 0,106; 0,128 dan 0,194 jam^{-1} , sedangkan $E_a = 26,28 \text{ J/mol}$.



Daftar Pustaka

- Agu, R.C. and Palmer, G.H. Enzymic breakdown of endosperm proteins of sorghum at different malting temperatures. *J I Brewing* (1996); **102 (6)**: 415-418.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 16th ed. Method 991.43. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (1995)
- Ariff, A. B., Asbi, B. A., Azudin, M. N. and Kennedy, J. F. Effect of mixing on enzymatic liquefaction of sage starch. *Carbohydr Polym.* (1997); **33(2-3)**: 101-108.
- Baruque, E. A., Baruque, M. D. A. and Sant'Anna, G. L. Babassu coconut starch liquefaction: an industrial scale approach to improve conversion yield. *Bioresource Technol.* (2000); **75(1)**: 49-55.
- Bogacheva, T. Y., Morris, V. J., Ring, S. G. and Hedley, C. L. The Granular structure of c-type pea starch and its role in gelatinization. *Biopoly.* (1998); 45(4):323-332.
- Fujii, M., Homma, T. and Taniguchi, M. Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. *Biotechnol. Bioeng.* (1998); **32**: 910-915
- Mandala, I. G. and Bayas, E. Xanthan effect on swelling, solubility and viscosity of wheat starch dispersions. *Food Hydrocolloid.* (2004); **18(2)**: 191-201.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid for determining reducing sugar, *Anal Chem.*, (1959); **31**: 426-428.
- Presecki, A. V., Blazevic, Z. F. and Vasic-Racki, E. Mathematical modeling of maize starch liquefaction catalyzed by alpha-amylases from bacillus licheniformis: effect of calcium, ph and temperature. *Bioproc and Biosyst Eng.* (2013); **36(1)**: 117-126.
- Robertson, G. H., Wong D.W.S., Lee, C.C., Wagschal, K., Smith, M. R. and Orts, W. J. Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. *J Agric Food Chem.* (2006); **54**:353-365.
- Ruiz, M.I., Sanchez, C.I., Torres, R.G., and D. R. Molina, D.R. *J Brazil Chem Soc.* (2011); **12**: 2337-2343.
- Sakano, Y., Fukushima, J., Kobayashi. (1983). Hydrolysis of α -1,4 and α -1,6 glucosidic linkages in Trisaccharides by the Thermoactinomyces vulgaris α -amylase. *Agric Biol Chem.* (1983); **10**: 2211-2216.
- Shuler, M.L. and Kargi, F. Bioprocess engineering: basic concepts. Prentice Hall. (1992).
- Sriroth, K., Wanlapatit, S., & Piyachomkwan, K. Cassava Bioethanol. *Bioethanol.* (2012) 290. Retrieved from http://cdn.intechopen.com/pdfs/27348/InTech-Cassava_bioethanol.pdf





Lembar Tanya Jawab

Moderator : Firman Kurniawansyah (ITS Surabaya)
Notulen : Belinda Purboningrum (UPN "Veteran" Yogyakarta)

I

1. Penanya : Mira Aulia (TK Politeknik Negeri Bandung)
Pertanyaan : Apakah enzim alfa-amilase dan glucoamilase dicampur?
Jawaban : Pada percobaan ini alfa-amilase dan glucoamilase dicampur dengan perbandingan 1:1; 1:2; 1:3; 3:1; 2:1
2. Penanya : Ade Febriana (Teknik Kimia Unila)
Pertanyaan : Mengapa suhu operasi bukan (95-105°C) dan (55-60°C)
Jawaban : Agar dihindari metode hidrolisis konvensional (menghemat energi).
3. Penanya : Pia Sabrina (Teknik Kimia Unila)
Pertanyaan : Bagaimana apabila hidrolisis ini dilanjutkan sampai terbentuk etanol (fermentasi), apakah enzim tidak berpengaruh?
Jawaban : Enzim tidak akan mempengaruhi proses fermentasi.

