

AKTIVITAS AMILASE, LIPASE DAN PROTEASE DARI CACING *Peryonix excavatus*

Ari Asnani, Puji Lestari

Program Studi Kimia, Jurusan MIPA
Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Jenderal Soedirman
Jl. Dr. Soeparno, Karangwangkal, Purwokerto 53123
Telp. (0281)638793; e-mail: asnani@gmail.com

ABSTRACT

The ability of *Peryonix excavatus* to live in extremely dirty area indicates that *P. excavatus* secretes distinctive enzymes which might be useful for industry. Thus, this research were aimed to isolate amylase, lipase and protease from *P. excavatus*, and to characterize the enzymes to know the optimum temperature and pH. The isolation procedure consisted of extraction and ammonium sulphate fractionation. The results showed that crude extract and ammonium sulphate fractions of *P. excavatus* had amylase, lipase, and protease enzymes activities. Among the three enzymes, amylase had the highest enzymatic activity whereas lipase was the least. The optimum temperature of amylase, lipase and protease were 60, 40, and 60 °C, respectively. The optimum pH of amylase, lipase and protease were 7, 7, and 8, respectively.

Keywords : *Peryonix excavatus*, amylase, lipase, protease

PENDAHULUAN

Studi Aktivitas Enzim Amilase, Lipase dan Protease dari Ekstrak Cacing *P. excavatus* merupakan bagian dari Payung Penelitian *P. excavatus* dengan tujuan utama memperoleh ekstrak cacing *P. excavatus* terstandar untuk alternatif alami obat tipus (Asnani, dkk., 2009). Standarisasi ekstrak dimaksudkan untuk menjamin agar ekstrak memenuhi syarat mutu yang telah ditentukan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Ekstrak terstandar juga akan melindungi masyarakat terhadap hal-hal yang dapat mengganggu dan merugikan kesehatan.

Kemampuan cacing *Peryonix* untuk hidup dalam kondisi lingkungan yang kotor/buruk membuka kemungkinan lain, yaitu potensi cacing *P. excavatus* untuk menghasilkan enzim amilase, lipase dan protease. Habitat alami cacing *Peryonix* adalah tumpukan sampah, tanah yang mengandung bahan organik dalam jumlah banyak, atau di bawah batang pisang yang telah roboh dan membusuk

(Affandi, 1996; Sumadinata, 1999). Merujuk pada fenomena tersebut, *Peryonix* diduga mengekskresikan senyawa kimia, semisal enzim yang unik sehingga mampu mempertahankan diri dari keadaan yang buruk.

Enzim adalah biokatalisator yang berfungsi sebagai katalis dalam proses biologis (Lehninger, 1982). Enzim yang dikenal luas penggunaannya adalah enzim amilase, lipase dan protease yang merupakan enzim hidrolitik pemecah senyawa makromolekul karbohidrat, lemak dan protein (Page, 1989). Aplikasi amilase, lipase dan protease dalam bidang industri pangan maupun non-pangan sangat luas berkembang di Indonesia. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan “Studi Aktivitas Enzim Amilase, Lipase dan Protease dari Ekstrak Cacing *Peryonix excavatus*” untuk mempelajari potensi cacing *P. excavatus* sebagai penghasil enzim amilase, lipase dan protease. Disamping itu, siklus kehidupan cacing yang relatif

pendek (2-4 bulan) memungkinkan ketersediaan bahan baku cacing bila dibutuhkan produksi enzim dalam skala besar.

Tujuan dari penelitian ini adalah 1) Mengukur aktivitas enzim amilase, lipase dan protease yang diisolasi dari ekstrak cacing *P.excavatus*, dan 2) Mengetahui suhu optimum dan pH optimum enzim amilase, lipase dan protease yang dihasilkan dari ekstrak cacing *P.excavatus*.

METODE PENELITIAN

Materi utama yang digunakan adalah cacing *P.excavatus* dari wilayah Baturaden, Purwokerto. Bahan kimia yang digunakan meliputi bahan proses ekstraksi dan fraksinasi enzim serta bahan kimia untuk uji aktivitas amilase, uji aktivitas protease, uji aktivitas lipase dan analisis kadar protein.

Parameter yang diuji adalah suhu inkubasi (lima taraf) dan pH inkubasi (lima taraf). Variabel yang diamati meliputi kadar glukosa (uji aktivitas amilase), kadar asam lemak bebas (uji aktivitas lipase), kadar tirosin (uji aktivitas protease), dan kadar protein dengan metode Lowry.

Ekstraksi *P.excavatus*

Cacing *P.excavatus* segar dibersihkan dari kotoran fisik (tanah, debris) dengan cara mencuci cacing di bawah air mengalir, lalu dengan aquades. Ekstraksi dilakukan dengan cara mencampur 200 gram cacing tanah dan 400 mL pelarut 5 mM bufer fosat (PBS) pH 6,8 pada suhu 4 °C. Ekstrak kasar yang dihasilkan diukur aktivitas enzim amilase, lipase dan protease, serta diukur kadar protein.

Fraksinasi *P.excavatus*

Ekstrak cacing dalam 5 mM PBS pH 6,8 dipresipitasi menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 30-80%. Pelet yang dihasilkan

dilarutkan dalam 5 mM PBS pH 6,8 dan didialisis selama 24 jam pada suhu 4 °C. Fraksi-fraksi hasil dialisis diuji aktivitas enzim amilase, lipase dan protease, serta kadar proteinnya.

Uji Aktivitas Amilase

0,5 mL larutan enzim, 0,5 mL NaCl 0,85%, 1 mL Na-wolframat 10% dan 1 mL H₂SO₄ 2/3N dimasukkan ke dalam tabung kontrol. 5 mL substrat amilum 1% dimasukkan ke dalam tabung sampel. Kedua tabung diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 °C. Lalu pada tabung sampel dimasukkan 0,5 mL enzim dan 0,5 mL NaCl 0,85%. Kemudian inkubasi dilanjutkan selama 30 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan 1 mL Na-wolframat 10% dan 1 mL H₂SO₄ 2/3 N. Pada tabung kontrol ditambah 5 mL substrat amilum 1%. Aktivitas amilase ditentukan dengan mengukur terbentuknya gula pereduksi menggunakan metode Somogyi-Nelson.

Uji Aktivitas Protease

Uji aktivitas protease berdasarkan metode Kunitz. 0,5 mL substrat kasein 0,5% dan 1 mL aquades dimasukkan ke dalam tabung sampel dan kontrol, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 35 °C. 4,3 mL TCA 3,5% ditambahkan pada tabung kontrol, dan 0,1 mL larutan enzim ditambahkan pada tabung sampel. Inkubasi dilanjutkan selama 30 menit. Lalu reaksi enzimatik pada tabung sampel dihentikan dengan menambah 4,3 mL TCA 3,5%. Aktivitas enzim ditetapkan dengan mengukur absorbansi produk hasil reaksi pada λ 275 nm.

Uji Aktivitas Lipase

Uji aktivitas lipase dilakukan dengan substrat minyak kelapa dalam bentuk emulsi (25 mL aquades, 50 mL gum arab 10% dan 25 mL minyak kelapa). Sebanyak 5 mL emulsi dimasukkan dalam Erlenmeyer,

diinkubasi selama 5 menit pada suhu 35 °C kemudian ditambah larutan enzim 400 µL. Campuran emulsi dan larutan enzim diinkubasi selama 30 menit pada suhu 35 °C. Asam lemak bebas yang dihasilkan dititrasi dengan NaOH 0,05 N dengan indikator phenolftalein.

Penentuan Suhu Optimum Enzim

Penentuan suhu optimum enzim dilakukan sesuai pada uji aktivitas enzim amilase, lipase dan protease dengan menggunakan lima variasi suhu inkubasi reaksi enzimatik yaitu suhu 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C dan 70 °C.

Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum enzim dilakukan sesuai pada uji aktivitas enzim amilase, lipase dan protease pada suhu optimum dengan menggunakan lima variasi pH yaitu pH 5, 6, 7, 8 dan 9.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Enzim

Sebanyak 500 g cacing dibersihkan dengan air lalu dibedah serta dibersihkan dengan pencucian lagi di bawah air mengalir kemudian ditiriskan. Cacing tersebut lalu ditimbang dan diperoleh rendemen berat bersih 61,86%. Ekstraksi kemudian dilakukan dengan cara mencampur 300 g cacing bersih dengan 600 mL pelarut buffer PBS pH 6,8 pada suhu 4 °C. Penggunaan buffer PBS pH 6,8 karena buffer PBS merupakan cairan yang komposisinya sama dengan komposisi cairan yang terdapat dalam tubuh makhluk hidup. Ekstraksi dilakukan pada suhu 4 °C karena pada suhu tersebut protein tidak akan rusak atau terdenaturasi. Ekstrak kasar (540 mL, kadar protein 2,20 mg/mL) yang diperoleh diukur aktivitas enzim amilase, lipase, protease, dan selanjutnya dilakukan fraksinasi.

Fraksinasi ekstrak kasar dilakukan dengan penambahan garam ammonium sulfat 0-30% pada suhu 4 °C sampai

semua garam larut. Penambahan garam menyebabkan larutan enzim mengalami peristiwa *salting out* yaitu daya larut protein berkurang sehingga enzim terpisah sebagai endapan. Proses ini bertujuan untuk memekatkan konsentrasi enzim dan fraksinasi komponen protein berdasarkan sifat ioniknya (Sumarlin, 1998). Endapan hasil fraksinasi ammonium sulfat 0-30% lalu didialisis terhadap akuades pada suhu 4 °C untuk menghilangkan garam ammonium sulfat.

Garam ammonium sulfat dan ion-ion pengganggu pada larutan enzim dapat mempengaruhi kestabilan molekul protein enzim selama penyimpanan. Pada penelitian, kontaminan tersebut dihilangkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan yang bersifat semipermeabel. Mekanisme yang terjadi selama dialisis adalah difusi. Selama proses dialisis konsentrasi ammonium sulfat di dalam kantong dialisis akan keluar dari kantong sampai tercapai kondisi keseimbangan. Dialisis dicek setiap 30 menit sekali dengan Ba(OH)₂ untuk mengetahui masih ada atau tidaknya garam ammonium sulfat. Dialisis yang mengandung garam akan berwarna putih jika direaksikan dengan Ba(OH)₂. Kondisi keseimbangan dicapai dengan penggantian dialisis setiap 30 menit sekali selama 3 jam sehingga diperoleh konsentrasi ammonium sulfat yang sangat rendah.

Proses dialisis tersebut menghasilkan fraksi 0-30% sebanyak 37,5 mL dengan kadar protein 0,73 mg/mL. Supernatan dari fraksi 0-30% kemudian difraksinasi lebih lanjut dengan penambahan garam ammonium sulfat untuk memperoleh fraksi ammonium sulfat 30-70% sebanyak 37 mL dengan kadar protein 0,46 mg/mL. Fraksinasi dilakukan dengan konsentrasi ammonium sulfat 0-30% dan 30-70% karena protein cacing tanah dapat diisolasi dengan jumlah optimal pada kondisi tersebut (Milochau, 1997; Liu, 2004; Waluyo, 2005).

Karakterisasi Enzim Amilase, Lipase dan Protease

Penentuan Suhu Optimum

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga sampel yaitu ekstrak kasar, fraksi 30% dan fraksi 70% mempunyai aktivitas enzim amilase, lipase dan protease pada suhu optimum yang berbeda. Amilase memiliki aktivitas tertinggi untuk ketiga sampel pada suhu optimum yaitu pada suhu 60 °C (Gambar 1). Unit aktivitas enzim amilase pada suhu optimum, 60 °C, dari ekstrak kasar, fraksi 30% dan fraksi 70% berturut-turut adalah 7.470, 15.268, dan 1.785 unit/mL. Ekstrak kasar dan fraksi 30% lipase memiliki aktivitas optimum pada suhu 30 °C, sedangkan fraksi 70% mempunyai aktivitas optimum pada suhu 40 °C (Gambar 2). Unit aktivitas enzim lipase pada suhu optimum dari ekstrak kasar dan fraksi 30% berturut-turut adalah 400 dan 500 unit/mL, sedangkan dari fraksi 70% sebesar 1.000 unit/mL. Protease memiliki aktivitas tertinggi untuk ketiga sampel pada suhu 60 °C (Gambar 3). Unit aktivitas enzim protease pada suhu optimum, 60 °C, dari ekstrak kasar, fraksi 30% dan fraksi 70% berturut-turut adalah 0,73; 0,87; dan 0,61 unit/mL.

Hasil penelitian mengindikasikan bahwa enzim amilase dan protease merupakan enzim termofil. Menurut Nofiana (2002), umumnya enzim termofil aktif pada daerah suhu 60-125 °C. Aktivitas enzim pada suhu di bawah suhu optimum relatif rendah dan meningkat aktivitasnya seiring dengan bertambahnya suhu. Peningkatan aktivitas terjadi karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat sehingga meningkatkan kecepatan reaksi enzim. Penurunan aktivitas enzim setelah suhu optimum terjadi karena pada suhu yang lebih tinggi dari suhu optimum, protein dapat terdenaturasi, selain itu substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi

sehingga dalam memasuki sisi aktif tidak seleluasa seperti pada keadaan suhu optimumnya dan menyebabkan aktivitas enzim berkurang atau bahkan hilang (Suhartono, 1998; Lehninger, 1982).

Penentuan pH Optimum

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga sampel yaitu ekstrak kasar, fraksi 30% dan fraksi 70% mempunyai aktivitas enzim amilase, lipase dan protease pada pH optimum yang berbeda-beda. Aktivitas enzim amilase untuk ketiga sampel mencapai puncaknya pada pH optimum 7 (Gambar 1). Unit aktivitas enzim amilase pada pH optimum 7 dari ekstrak kasar, fraksi 30% dan fraksi 70% berturut-turut adalah 6.835, 8.292, dan 10.335 unit/mL. Aktivitas enzim lipase untuk ketiga sampel bervariasi pH optimumnya, yaitu untuk ekstrak kasar aktivitas tertinggi pada pH optimum 6, fraksi 30% mempunyai pH optimum 5 dan fraksi 70% mempunyai pH optimum 7 (Gambar 2). Unit aktivitas enzim lipase pada masing-masing pH optimumnya adalah 75 unit/mL (ekstrak kasar), 175 unit/mL (fraksi 30%) dan 1.050 unit/mL (Fraksi 70%). Aktivitas enzim protease untuk ketiga sampel mencapai puncaknya pada pH optimum 8 (Gambar 3). Unit aktivitas enzim protease pada pH optimum 8 dari ekstrak kasar, fraksi 30% dan fraksi 70% berturut-turut adalah 1,46; 1,69; dan 1,734 unit/mL.

Enzim amilase pada ketiga sampel mempunyai pH optimum 7, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim amilase tersebut merupakan enzim yang bersifat netral yaitu enzim yang aktivitasnya tinggi pada pH netral (pH 7). Hasil penelitian untuk enzim protease terhadap pengaruh pH menunjukkan bahwa enzim protease dari ketiga sampel merupakan enzim protease alkali, yaitu enzim yang aktivitasnya tinggi pada pH basa. Variasi pH optimum dan suhu optimum pada enzim lipase, dua puncak

kurva pada enzim protease dan lipase, serta aktivitas yang negatif pada enzim lipase, diduga disebabkan enzim yang diperoleh masih berupa enzim campuran, sehingga diperoleh aktivitas untuk tiap-tiap enzim pada masing-masing sampel.

Rendahnya aktivitas enzim pada kedua sisi pH optimum menurut Rustam (1988) disebabkan oleh dua hal. Pertama, protein enzim dapat mengalami perubahan struktur sekunder dan tersier (denaturasi) pada pH ekstrim tinggi atau rendah. Protein dengan struktur sekunder dan tersier ini dipertahankan oleh muatan pada rantai samping yang terdapat pada residu asam amino yang menyusun protein, misalnya residu glutamat, lisin dan arginin. Berbagai rantai samping tersebut bermuatan sedemikian rupa sehingga membentuk struktur tiga dimensi yang merupakan pusat katalitik. Apabila pH lingkungan berubah secara ekstrim, interaksi berbagai rantai samping akan terganggu, sehingga struktur tiga dimensi tersebut berubah. Akibatnya pusat katalitik terganggu bentuknya sehingga tidak dapat mengikat substrat. Hal ini menyebabkan reaksi enzimatik berkurang.

Penyebab kedua turunnya aktivitas enzim adalah perubahan muatan enzim beserta substratnya. Substrat dapat memperoleh atau kehilangan proton dan reaktif hanya dalam satu muatan. Perubahan muatan pada enzim dapat mempengaruhi aktivitas enzim, misalnya suatu enzim yang bermuatan negatif (Enz^-) bereaksi dengan suatu substrat yang bermuatan positif (SH^+):

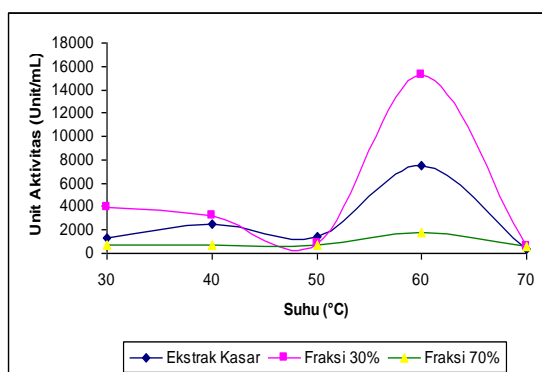


Enz^- pada pH rendah akan berprotonasi dan kehilangan muatan negatifnya:

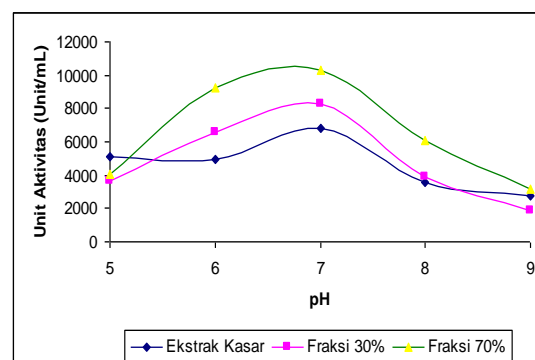


Akibatnya enzim tidak dapat lagi mengikat S^+ , sehingga tidak terbentuk P. SH^+ pada pH sangat tinggi akan terionisasi dan kehilangan muatan positifnya.

Kemurnian suatu protein enzim akan meningkat seiring dengan bertambahnya proses fraksinasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin bertambah proses fraksinasi dari ekstrak kasar hingga fraksi 0-30% dan 30-70%, maka kemurnian suatu enzim amilase, lipase dan protease pada suhu dan pH optimum akan meningkat.

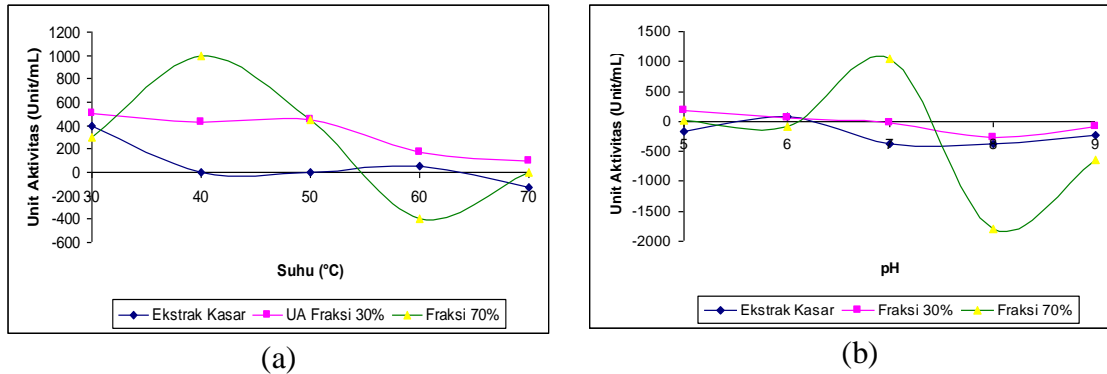


(a)

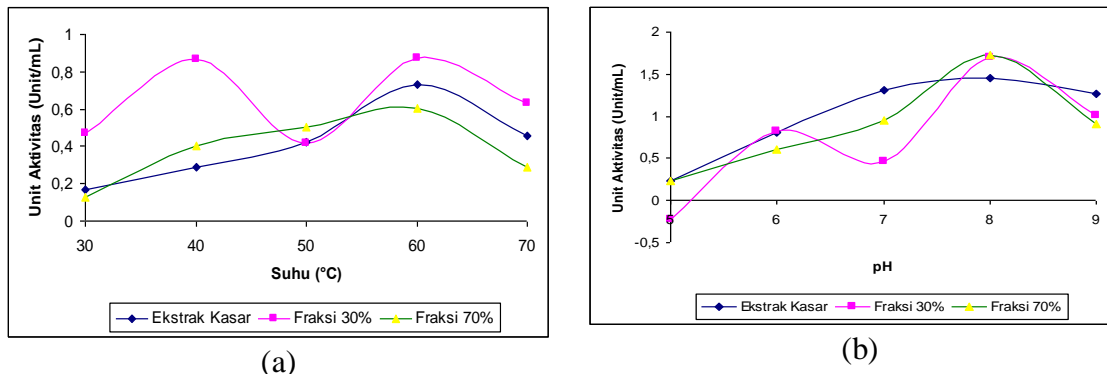


(b)

Gambar 1. Aktivitas Enzim Amilase: a) variasi suhu, b) variasi pH



Gambar 2. Aktivitas Enzim Lipase: a) variasi suhu, b) variasi pH



Gambar 3. Aktivitas Enzim Protease: a) variasi suhu, b) variasi pH

SIMPULAN

Ekstrak kasar dan fraksi ammonium sulfat cacing *P.excavatus* mempunyai aktivitas enzim amilase, lipase dan protease. Suhu dan pH optimum pada enzim amilase adalah 60 °C (fraksi 30%; 15.268 unit/mL) dan pH 7 (fraksi 70%; 10.335 unit/mL); pada enzim lipase adalah suhu 40 °C (fraksi 70%; 1.000 unit/mL) dan pH 7 (fraksi 70%; 1.050 unit/mL); dan pada enzim protease adalah suhu 60 °C (fraksi 30%; 0,87 unit/mL) dan pH 8 (fraksi 70%; 1,73 unit/mL). Perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut terhadap enzim amilase, lipase dan protease dari cacing *P. excavatus* dan ditentukan karakteristik biokimiawinya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian dilaksanakan atas biaya DIPA UNSOED Tahun Anggaran 2009, No. Kontrak 1004.01/H23.6/PL/2009 tanggal 16 Maret 2009. Ucapan terima

kasih juga ditujukan pada Arif Nur Rokhman (HIA005003), Joharatul Laela (HIA005039) dan Shania Ulfach (HIA005010), mahasiswa Prodi Kimia UNSOED yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Affandi. 1996. *Pengaruh Penggunaan Media Sampah Rumah Tangga dengan Berbagai Tingkat Umur Pengomposan dan Waktu Pemeliharaan Terhadap Biota Cacing Tanah Jenis Lumbricus robellus*. Skripsi Jurusan Biologi Fakultas matematika dan Ilmu pengetahuan Alam. Universitas Padjajaran, Bandung.
- Asnani, A., P. Lestari, J. Maryanto. 2008. *Isolasi Dan Karakterisasi Protein Antibakteri dari Cacing Peryonix*

- Excavatus* Yang Mampu Menekan Pertumbuhan *Salmonella typhi* murium. Laporan Hasil Penelitian, Fakultas Sains & Teknik, Unsoed, Purwokerto.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Erlangga, Jakarta.
- Liu, Y. Q., Z. J. Sun, C. Wang, S. J. Li, and Y. Z. Liu. 2004. Purification of A Novel Antibacterial Short Peptide In Earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochim Biophys*. Vol. 36, pp. 297.
- Milochau, A, M. Lassegues, and P. Valembois. 1997. Purification, Characterization and Activities of Two Hemolytic and Antibacterial Proteins from Coelomic Fluid of The Annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim Biophys Acta*, Vol 1337, pp. 123.
- Nofiana, R. 2002. *Kloning Gen PDI-Like dari Bakteri Termofilik B. acidocaldarius RP 1*. Tesis Program Pasca Sarjana ITB, Bandung.
- Page, D. S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia (Terjemahan)*. Erlangga, Jakarta.
- Rustam, A. 1988. Isolasi Enzim Peroksidase dari Lobak (*Raphanus sativus* L.) dengan Metode Keilin. FMIPA UI, Jakarta (Tidak Dipublikasikan).
- Suhartono, M. T. 1998. *Enzim dan Bioteknologi*. ITB, Bogor.
- Sumadinata. 1999. *Budidaya Cacing Tanah*. Buletin Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bandung.
- Sumarlin, L. O. 1998. *Aktivitas Protease dari Bacillus circulans pada Berbagai Tahap Pemurnian*. Laporan Penelitian Jurusan Kimia Fakultas MIPA IPB, Bogor.
- Waluyo, J. 2005. *Purifikasi dan Karakterisasi Protein Antibakteri dari Cacing Tanah*. Ringkasan Thesis S3, Universitas Airlangga, Surabaya.