

**LAPORAN PRAKTIKUM  
REKAYASA BIOPROSES**

# **KINETIKA REAKSI ENZIMATIS**



**KHAIRUL ANAM  
P051090031/BTK**

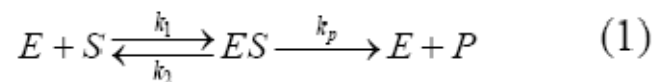
**BIOTEKNOLOGI  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
2010**

## KINETIKA REAKSI ENZIMATIS

### 1. Pendahuluan

Amilase merupakan enzim yang penting dalam bidang pangan dan bioteknologi. Amilase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis pati menjadi gula-gula sederhana. Amilase mengubah karbohidrat yang merupakan polisakarida menjadi maltosa (alfa dan beta) ataupun glukosa (glukoamilase). Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang dan mikroorganisme. Saat ini sejumlah enzim amilase telah diproduksi secara komersial. Penggunaan mikroba dianggap lebih proseptif karena mudah tumbuh, cepat menghasilkan dan kondisi lingkungan dapat dikendalikan (wordpress.com, 2010). Untuk produksi enzim amilase dapat menggunakan berbagai sumber karbon, seperti molase, amilum, tepung jagung, tepung tapioka, dan sebagainya.

Amilase sendiri adalah enzim yang merupakan biokatalisator yang mempercepat jalannya reaksi tanpa ikut bereaksi. Pada umumnya enzim bekerja mengkatalis reaksi satu arah, meskipun ada yang mengkatalis reaksi dua arah. Enzim bekerja secara spesifik, karena sisi aktif enzim setangkup dengan permukaan substrat tertentu. Umumnya enzim tidak dapat bekerja tanpa adanya suatu zat non protein tambahan yang disebut kofaktor. Enzim bersifat thermolabil, mudah rusak bila dipanaskan lebih dari 60°C. Enzim merupakan senyawa protein, sehingga sifat protein masih melekat pada enzim. Enzim dibutuhkan dalam jumlah sedikit, sbg biokatalisator , rekasinya menjadi sangat cepat dan berulang ulang. Enzim dapat bekerja didalam sel (endoenzim) dan diluar sel (ektoenzim). Enzim bekerja dengan membentuk kompleks substrat sebelum membentuk produk. Reaksi enzimatik sintesis glukosa dari substrat amilum dengan enzim amilase diasumsikan mengikuti mekanisme Michaelis-Menten sebagai berikut:



Notasi E dan S adalah enzim dan substrat, P merupakan produk, dan notasi ES merupakan enzim-substrat kompleks.

Untuk mengendalikan aktivitas enzim tersebut dalam kegiatan proses, maka perlu dipahami dasar-dasar kinetika reaksi yang dikatalisis oleh enzim, baik dalam satu substrata tau lebih. Oleh karena itu tujuan praktikum kali ini adalah untuk Mempelajari kinetika reaksi enzimatik enzim alpha-amilase terhadap substrat amilum.

## **2. Bahan dan Metode**

### **2.1. Bahan**

Enzim  $\alpha$ -amilase, substrat (larutan amilum), dengan konsentrasi 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 % buffer fosfat sitrat pH 7.00 50 mM, standar glukosa, pereaksi DNS (garam Na K tartarat +NaOH + akuades + DNS)

### **2.2. Alat**

Water bath (suhu 90-95°C), spektrofotometer, tabung reaksi, gelas ukur, timbangan, vortex, erlenmeyer dan stop watch.

### **2.3. Metode**

#### **2.3.1. Pembuatan Kurva Standar**

Standar glukosa dibuat dengan menyiapkan larutan glukosa murni dengan konsentrasi 0.0-0.35 mg/ml dengan selang 0.05. Sebanyak 1 ml dari masing-masing larutan glukosa murni dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 3 ml pereaksi DNS. Larutan divortex untuk homogenisasi kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama tepat 5 menit (gunakan stop watch). Blanko dibuat dengan mengganti sampel. dengan akuades dan diperlakukan sama. Setelah itu diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 550nm. Kurva standar dibuat dengan memplot data konsentrasi glukosa mural (sumbu X) versus absorbansinya (sumbu Y).

#### **2.3.2. Pengukuran kecepatan reaksi Enzim $\alpha$ -amilase terhadap substrat amilum pada beberapa konsentrasi substrat**

Sebanyak 10 ml substrat amilum dengan konsentrasi 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 % dibuat dengan melarutkan amilum sesuai konsentrasi pada bufer fosfat sitrat pH 7. Substrat tersebut diinkubasi pada suhu 90-95°C . Pada masing-masing tabung substrat tersebut ditambahkan larutan enzim + bufer (0.1 ml enzim ditambah 0.9 ml bufer fosfat sitrat pH 7 50mM, kemudian dipanaskan pada suhu 90-95°C selama 5 menit) Campuran enzim substrat diinkubasi kembali pada suhu 90-95°C dan setiap 5 menit diambil sampel sebanyak 1 ml. Sampel tersebut ditambah 3 ml DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit dan diukur absorbansinya pada  $\lambda$  550 nm.

## **3. Hasil dan Pembahasan**

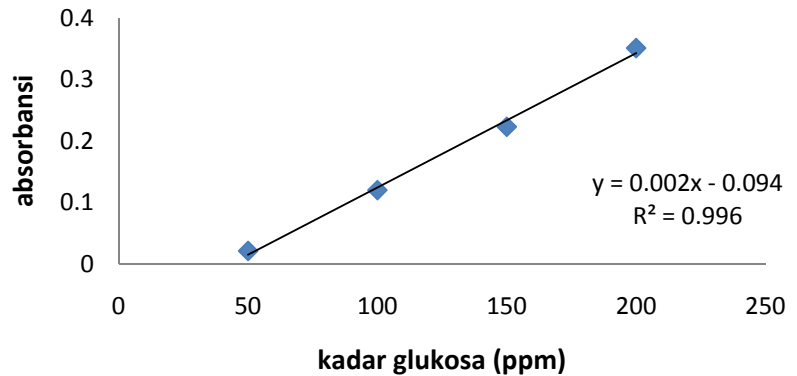
### **3.1. Hasil**

Pada pembuatan kurva standar glukosa diperoleh data seperti yang terlihat pada tabel 1. Kemudian dari data tersebut, diolah menjadi persamaan garis linear sehingga diperoleh persamaan matematis  $x = (y +$

$0.094)/0.002$  dimana  $x$  adalah konsentrasi glukosa dan  $y$  merupakan nilai absorbansi dari glukosa pada panjang gelombang 550 nm. Dari persamaan ini, maka diperoleh perhitungan kadar glukosa sebagai produk dari reaksi reaksi enzim  $\alpha$ -amilase terhadap substrat amilum pada beberapa konsentrasi substrat dengan menggunakan data hasil pengamatan nilai absorbansi dari tiap sampel seperti pada tabel 2. Data perhitungan kadar glukosa dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 1.** Nilai absorbansi standar maltosa

ppm	absorbansi
50	0.021
100	0.120
150	0.223
200	0.351



**Gambar 1.** Kurva standar maltosa

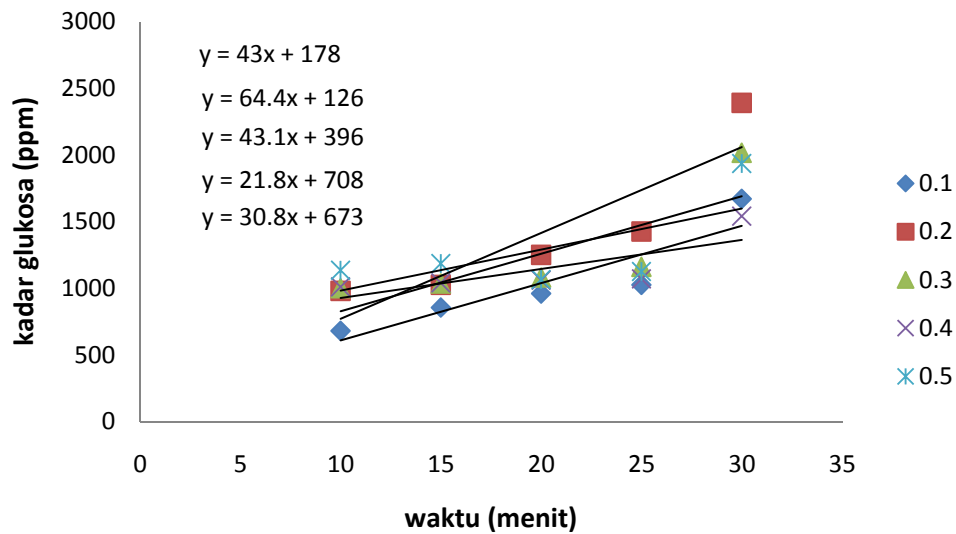
**Tabel 2.** Nilai absorbansi dari sampel amilum yang telah ditambahkan dengan enzim pada beberapa konsentrasi substrat dari menit ke 10 hingga menit ke 30 pada panjang gelombang 550 nm

Waktu (menit)	konsentrasi amilum sebagai substrat (%)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
10	0.042	0.102	0.106	0.108	0.133
15	0.077	0.111	0.113	0.114	0.143
20	0.098	0.156	0.122	0.118	0.119
25	0.111	0.191	0.138	0.120	0.131
30	0.240	0.384	0.309	0.214	0.293

**Tabel 3.** Nilai kadar glukosa dari sampel amilum yang telah ditambahkan dengan enzim pada beberapa konsentrasi substrat dari menit ke 10 hingga menit ke 30 pada panjang gelombang 550 nm

Waktu (menit)	kadar glukosa (ppm) pada beberapa konsentrasi amilum sebagai substrat				
	0.1 %	0.2 %	0.3 %	0.4 %	0.5 %
10	680	980	1000	1010	1135
15	855	1025	1035	1040	1185
20	960	1250	1080	1060	1065
25	1025	1425	1160	1070	1125
30	1670	2390	2015	1540	1935

Dari data kadar glukosa sampel, maka dapat dibuat persamaan garis pada masing-masing kadar substrat berdasarkan daripada waktu inkubasi dari enzim amilase yang dapat dilihat pada gambar 2.



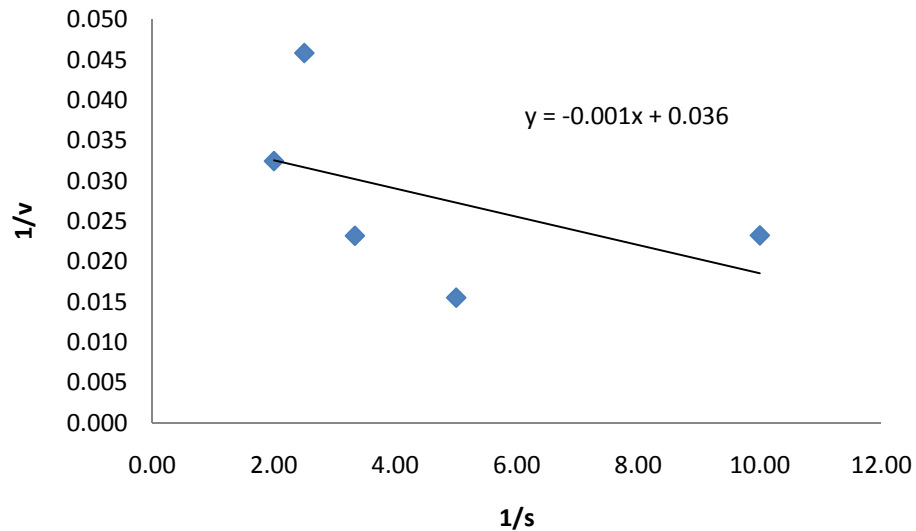
**Gambar 2.** Kurva konsentrasi glukosa pada beberapa konsentrasi substrat terhadap waktu inkubasi

Dari persamaan yang diperoleh dari perhitungan kadar glukosa di beberapa titik waktu pada beberapa konsentrasi substrat, dapat dinyatakan bahwa  $y = a + bx$ , dimana  $b$  adalah slope dan dapat dinyatakan sebagai kecepatan reaksi dari masing-masing konsentrasi substrat. Apabila  $s$  adalah substrat ( $s$ ) dan  $b$  adalah kecepatan reaksi ( $v$ ) dan dengan pengalihan persamaan Michelis-Menten, maka dapat diperoleh data seperti yang dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4.** Nilai kadar substrat amilum ( $s$ ) terhadap kecepatan reaksi enzimatik ( $v$ ) dan pengalihan persamaan Michelis-Menten ( $1/s$  dan  $1/v$ )

$s$ (%)	$v$ (ppm/mnt)	$1/s$	$1/v$
0.1	43.0	10.00	0.023
0.2	64.4	5.00	0.016
0.3	43.1	3.33	0.023
0.4	21.8	2.50	0.046
0.5	30.8	2.00	0.032

Dari data pengalihan persamaan yaitu dengan menggunakan nilai  $1/s$  dan  $1/v$ , dibuat lagi persamaan untuk mendapatkan nilai  $K_m$  dan  $V_m$  dari proses reaksi enzimatik  $\alpha$ -amilase terhadap substrat amilum sehingga diperoleh kurva seperti yang terlihat pada gambar 3.



**Gambar 3.** Kurva perbandingan antara nilai 1/s dan 1/v

Dari gambar 3. diperoleh persamaan yaitu  $y = -0.001x + 0.036$  dimana nilai  $a = 0.036$  dan nilai  $b = -0.001$ . Dari pengalihan persamaan Michaelis-Menten ( $1/v = [(K_m/V_{max})(1/s)] + 1/V_{max}$ ) dapat diketahui bahwa nilai  $a = 1/V_{max}$  dan nilai  $b = K_m/V_{max}$ . Sehingga dari persamaan tersebut dapat diperoleh bahwasanya nilai  $V_{max}$  adalah  $1/a$  dimana nilai  $a$  adalah  $0.036$ , maka nilai  **$V_{max} = 27.78$  ppm/menit**, sedangkan nilai  $K_m$  dapat diketahui dengan metode substitusi nilai  $V_{max}$  ke persamaan nilai  $b = K_m/V_{max}$ , sehingga  $K_m = b * V_{max}$ , maka nilai  **$K_m$  adalah  $-0.0278$** .

### 3.2. Pembahasan

Seperti reaksi kimia pada umumnya, maka reaksi enzimatik dipengaruhi oleh suhu. Kenaikan suhu sampai optimum akan diikuti pula oleh kenaikan kecepatan reaksi enzimatik. Kepekaan enzim terhadap suhu pada keadaan suhu melebihi optimum disebabkan terjadinya perubahan fisikokimia protein penyusun enzim. Umumnya enzim mengalami kerusakan (denaturasi) pada suhu diatas  $50^{\circ}\text{C}$ . Walaupun demikian ada beberapa enzim yang tahan terhadap suhu tinggi. Pada praktikum kali ini, inkubasi dilakukan pada suhu  $90-95^{\circ}\text{C}$ , mungkin diharapkan enzim yang ditambahkan pada praktikum kali ini adalah enzim amilase yang termostabil atau tahan panas yang dapat bereaksi dengan substrat pada suhu tinggi.

Protein adalah bagian utama enzim yang dihasilkan sel, maka semua hal yang dapat mempengaruhi protein dan sel akan berpengaruh terhadap reaksi enzimatik. Kecepatan reaksi enzimatik umumnya dipengaruhi kadar substrat. Penambahan kadar substrat sampai jumlah tertentu dengan jumlah enzim yang tetap, akan mempercepat reaksi enzimatik sampai mencapai maksimum.

Penambahan substrat selanjutnya tidak akan menambah kecepatan reaksi. Kecepatan reaksi enzimatik juga dipengaruhi kadar enzim, jumlah enzim yang terikat substrat (ES) dan konstanta Michaelis (Km). Km menggambarkan kesetimbangan disosiasi kompleks ES menjadi enzim dan substrat. Nilai Km kecil berarti enzim mempunyai afinitas tinggi terhadap substrat maka kompleks ES sangat mantap, sehingga kesetimbangan reaksi kearah kompleks ES. Apabila nilai Km besar berarti enzim mempunyai afinitas rendah terhadap substrat, sehingga kesetimbangan reaksi kearah E + S. nilai Km yang diperoleh pada praktikum kali ini adalah -0.0278. nilai ini bisa dikatakan sangat kecil sehingga enzim amilase pada praktikum kali ini mempunyai afinitas yang tinggi terhadap substrat amilum sehingga kesetimbangan reaksi lebih kearah pembentukan kompleks substrat enzim sehingga produk yang diperoleh mempunyai *yield* yang tinggi.

Dari data yang diperoleh bahwa pada menit ke 30, kadar glukosa pada beberapa tingkatan substrat meningkat secara signifikan dan mencapai produk tertinggi. Mungkin hal ini dikarenakan waktu optimum yang dibutuhkan oleh enzim amilase adalah pada menit ke 30 untuk membentuk produk dengan *yield* yang lebih besar.

Vmax atau kecepatan maksimum dari reaksi enzimatik ini diperoleh dengan nilai 27.78 ppm/menit yang artinya pada kondisi optimum, enzim amilase dapat mengubah substrat amilum menjadi glukosa sebesar 27.28 ppm tiap menitnya. Akan tetapi perlu diingat, peningkatan konsentrasi substrat belum tentu meningkatkan kecepatan laju reaksi, karena ada saatnya semua enzim telah terjenuhi oleh substrat sehingga kecepatan enzim menjadi tetap.

#### **4. Kesimpulan**

1. enzim amilase pada praktikum kali ini adalah enzim yang termostabil karena dapat bereaksi dengan substrat pada suhu inkubasi 90-95°C
2. Km enzim amilase pada praktikum kali ini kecil (-0.0278) sehingga afinitas dari enzim amilase dapat dikatakan tinggi.
3. Vmax enzim amilase pada praktikum kali ini adalah 27.28 ppm/menit

#### **Daftar Pustaka**

1. <http://ptp2007.wordpress.com/2008/05/15/amilase/>. Diunduh pada tanggal 8 April 2010
2. Mangunwidjaja, D. dan Suryani, A., 1994, *Teknologi Bioproses*, Jakarta: Penebar Swadaya.

3. Heri Hermansyah, Rita Arbianti, Aji Nur Widyanto, Anondho Wijanarko. 2008. *Kinetika Sintesis Biodiesel Menggunakan Biokatalis Novozyme 435*. JURNAL TEKNOLOGI, Edisi No. 3 Tahun XXII, September 2008, 109 - 114 ISSN 0215-1685
4. <http://sumarsih07.files.wordpress.com/2008/11/iv-enzim-mikroba.pdf>. Diunduh pada tanggal 11 April 2010