

AKTIVITAS AMILASE, PROTEASE dan LIPASE DARI MADU LEBAH *Trigona sp*, *Apis mellifera* dan *Apis dorsata*

ACTIVITIES OF AMYLASE, PROTEASE and LIPASE FROM HONEY *Trigona sp*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata*

Hendric Surya Putra*, Winni Astuti dan Rudi Kartika

Program Studi Kimia FMIPA Universitas Mulawarman

Jl. Barong Tongkok No. 4 Gn. Kelua Samarinda. Telp. 0541-749152

*Corresponding Author: hendric.suryaputra14@gmail.com

Submit : 17 Februari 2017 Accepted : 05 Maret 2018

ABSTRACT

Activities of amylase, protease and lipase from honey *Trigona sp*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata*, determination protein concentration and the activity protease done with Bradford method, the determination of the glucose standard and activity amylase done with 3,5-dinitro salicylic acid (DNS) method and activity lipase done with acid-base titration with coconut oil substrate. The honey from *Trigona sp* has value of the activity amylase and lipase respectively by 0,0136 U / mg and 0,359 U/mg, whereas honey *Apis mellifera* has activity of protease, amylase and lipase of each $1,22 \times 10^{-6}$ U/mg; 0,944 U/mg and 0,304 U/mg and then honey *Apis dorsata* has amylase and lipase activity of each of 0,0645 U/mg and 0,287 U/mg.

Keywords: Amylase, protease, lipase, bradford, DNS (3,5-dinitro salicylic acid), honey *Trigona sp*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata*.

PENDAHULUAN

Madu merupakan cairan kental seperti sirup berwarna coklat kuning muda sampai coklat merah yang dikumpulkan dalam indung madu oleh lebah penghasil madu^[1]. Madu umumnya mempunyai rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari bunga tanaman (floral nektar) atau bagian lain dari tanaman (ekstra floral nektar) atau ekskresi serangga^[2].

Madu merupakan salah satu sumber makanan yang baik karena mengandung asam amino, karbohidrat, protein, vitamin serta mineral yang mudah diserap oleh sel-sel tubuh. Madu mengandung sejumlah mineral seperti magnesium, kalium, potasium, sodium, klorin, sulfur, besi, fosfat dan vitamin, seperti vitamin E, vitamin C, vitamin B1, B2 dan B6. Selain itu madu juga mengandung banyak manfaat dan khasiat yang terkandung di dalamnya^[3].

Madu memiliki efek antibakteri dan bermanfaat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang merupakan penyebab keracunan makanan, infeksi kulit, endokarditis, dan meningitis^[4]. Madu mengandung potensi antikanker dan antioksidan^[5]. Madu memiliki pengaruh dalam penurunan gula darah penderita diabetes militus^[6]. Masih banyak penelitian-

penelitian lainnya mengenai madu, namun tampaknya penelitian mengenai potensi kandungan enzim dalam madu belum jauh diungkap.

Madu dari lebah *Trigona sp* dapat menurunkan berat badan, kolesterol total, *low density lipoprotein* (LDL) dan trigliserida pada pasien diabetes^[7]. Pada madu dari lebah *Apis mellifera* mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 30%^[8].

Madu memiliki manfaat bagi kesehatan adalah madu asli yang memiliki kualitas baik. Salah satu kriteria madu kualitas baik adalah adanya aktivitas enzim dalam madu^[2]. Enzim yang terdapat dalam madu adalah enzim invertase, diastase, peroksidase serta protease. Enzim invertase berfungsi untuk memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Sedangkan enzim diastase adalah suatu enzim yang berfungsi mengubah zat pati menjadi dekstrin dan maltosa. Enzim peroksidase berperan mengkatalisis hidrogen dan juga sebagai akseptor ion hidrogen^[9].

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, gelas ukur, corong kaca, neraca analitik, tiang statif, tabung reaksi, pipet volume, pipet tetes, mikropipet 100-1000 μ L, labu

ukur, *waterbath shaker*, *stopwatch*, inkubator, *freezer* dan spektrofotometer visible.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah madu dari lebah *Trigona sp*, *Apis mellifera* dan *Apis dorsata*, pereaksi 3,5-dinitro salicylic acid (DNS), glukosa, pereaksi Bradford, [NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ dan HCl] aquadest, NaOH, gum arab, minyak kelapa, *bovine serum albumin* (BSA).

PROSEDUR PENELITIAN

1. Uji Aktivitas Protease

Penentuan aktivitas protease, terlebih dahulu dibuat kurva standar protein dari larutan stok 100µg/mL dalam berbagai konsentrasi dari 0-24 µg/mL. Tiap konsentrasi sebanyak 500 µL direaksikan dengan 500 µL reagen Bradford, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit dan diukur absorbansinya pada $\lambda \pm 595$ nm. Ditentukan pula konsentrasi protein dengan mereaksikan 100 µL enzim hasil pengenceran terhadap 500 µL reagen bradford, diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit dan diukur absorbansi nya pada $\lambda \pm 595$ nm. Uji aktivitas protease ditentukan melalui metode Bradford (1976), sebanyak 100 µl larutan BSA 2 mg/mL dicampur dengan buffer pH 7 800µl dan 100 µl enzim. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Sebanyak 500 µl campuran yang telah diinkubasi selanjutnya ditambah 500 µl reagen Bradford, diinkubasi 5 menit dan dibaca absorbansinya pada $\lambda \pm 595$ nm melalui spektrofotometer-vis.

2. Uji Aktivitas Amilase

Sebelum uji aktivitas amilase dilakukan, terlebih dahulu membuat kurva standar glukosa. 50 µL larutan glukosa dalam berbagai konsentrasi dari 2,0-5,0 mM. Tiap konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung mikro masing-masing 50 µL kemudian ditambahkan reagen DNS 50 µL dan dimasukkan tabung ke dalam penangas air mendidih selama 10

menit, lalu didinginkan pada suhu ruang dan disentrifugasi selama 1 menit. Ditambahkan 900 µL akuades, dihomogenkan hingga tercampur, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda \pm 540$ nm. Uji amilase dilakukan dengan menambahkan amilum 1% sebanyak 50 µL pada 25µL enzim, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan 50 µL DNS, campuran reaksi dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit, kemudian didinginkan hingga suhu kamar dan ditambahkan akuades 900 µL. Aktivitas amilase ditentukan dengan mengukur absorbansi melalui spektrofotometer pada $\lambda \pm 540$ nm.

3. 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 1 mL. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu 35 °C. Asam lemak bebas yang dihasilkan dititrasi dengan NaOH 0,05 M dengan indikator phenolftalein. Untuk blanko dimasukkan 5 mL emulsi tanpa penambahan larutan enzim.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Kurva Standar Protein

Kurva standar Protein dilakukan dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai protein standar. Persamaan garis regresi linear kurva standar BSA adalah $y = 0,013x + 0,022$.

Penentuan Konsentrasi Protein

Hasil analisis kadar protein masing-masing madu dari lebah *Trigona sp*, *Apis mellifera* dan *Apis dorsata* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Konsentrasi protein

No.	Jenis madu	Konsentrasi Protein (µg/mL)
1	Madu lebah <i>Trigona sp</i>	42,69
2	Madu lebah <i>Apis mellifera</i>	25,00
3	Madu lebah <i>Apis dorsata</i>	40,31

Pada tabel diatas menunjukkan hasil kandungan protein tertinggi adalah madu dari lebah *Trigona sp* dibanding madu lainnya. Hal ini diduga bahwa tingginya kadar protein pada madu dari lebah *Trigona sp* dipengaruhi oleh sumber pakan yang dikonsumsi lebah. Pollen merupakan salah satu bahan makanan yang dikonsumsi lebah yang memiliki kandungan protein. Pollen terdapat pada kepala putik bunga dalam bentuk butir-butir atau serbuk halus^[10]. Pollen memiliki gizi yang sangat tinggi yaitu berupa protein (20,1%), lemak (3,3%), air (23,9%) dan sisanya berupa vitamin dan mineral yang sangat diperlukan untuk pembentukan

jaringan tubuh^[11]. Kebutuhan total protein dari suatu koloni lebah madu dapat terpenuhi dengan mengkonsumsi pollen^[11]. Hal ini dapat diduga bahwa tingginya kadar protein di dalam madu lebah *Trigona sp* adalah lebah *Trigona sp* mengonsumsi pollen sebagai bahan makanan dalam jumlah besar.

Aktivitas Protease

Pengukuran aktivitas protease dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode bradford. Data hasil pengukuran aktivitas protease ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2 Aktivitas Protease

Sampel	Aktivitas protease (μmol/menit)	Aktivitas spesifik (U/mg)
Madu <i>Trigona sp</i>	-7,65.10 ⁻⁸	-1,79.10 ⁻⁷
Madu <i>Apis mellifera</i>	3,05.10 ⁻⁷	1,22.10 ⁻⁶
Madu <i>Apis dorsata</i>	-8,03.10 ⁻⁷	-1,99.10 ⁻⁶

Hasil pengukuran aktivitas protease yang tertinggi didapat pada madu lebah *Apis mellifera* sebesar 1,22 x 10⁻⁶ U/mg, sedangkan pada madu lainnya diduga tidak terdapat aktivitas protease. Protein madu dapat berasal dari nektar dan serbuk sari bunga. Salah satu sumber pakan lebah yaitu pollen yang memiliki kandungan protein tinggi (20,1%)^[12]. Tepung sari (pollen) merupakan satu-satunya sumber protein bagi lebah yang tersedia secara alami yang mana dapat mempengaruhi tingkat perkembangbiakan dan masa hidup lebah^[3]. Pada lebah *Apis mellifera* memiliki aktivitas protease tertinggi diantara madu lainnya, hal ini diduga oleh pengaruh sumber pakan yang dikonsumsi berupa pollen oleh koloni lebah pekerja

dalam jumlah yang besar sehingga jumlah protease yang dihasilkan besar pula.

Penentuan Kurva standar Glukosa

Penentuan kurva standar glukosa dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode 3,5-dinitro salicylic acid (DNS) dengan menggunakan glukosa sebagai standar. Persamaan garis regresi linear kurva standar glukosa adalah $y = 0,022x - 0,004$.

Aktivitas Amilase

Aktivitas amilase ditentukan dengan menghitung konsentrasi glukosa dalam sampel (madu *Apis mellifera*, *Trigona sp* dan *Apis dorsata*). Data hasil pengukuran aktivitas amilase ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3 Aktivitas Amilase

Sampel	Aktivitas amilase (μmol/menit)	Aktivitas spesifik (U/mg)
Madu <i>Trigona sp</i>	0,015	0,0136
Madu <i>Apis Mellifera</i>	0,059	0,944
Madu <i>Apis dorsata</i>	0,065	0,0645

Karbohidrat dalam bentuk gula merupakan komponen utama madu dan jumlahnya sekitar 80%. Levulosa (Fruktosa) dan desktrosa (glukosa) mencakup 85-90% dari gula yang terdapat dalam madu^[13]. Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa nilai aktivitas amilase terdapat pada tiap-tiap madu dari lebah *Trigona sp*, *Apis melifera* dan *Apis dorsata* berturut-turut yaitu sebesar (0,0136; 0,944; 0,0645) U/mg. Madu dari lebah *Apis mellifera* merupakan madu yang memiliki nilai aktivitas amilase tertinggi dibanding madu lainnya.

Serbuk sari dan nektar merupakan bahan makanan yang penting untuk lebah. Nektar kaya akan berbagai karbohidrat dalam bentuk gula seperti sukrosa, fruktosa dan glukosa. Selain karbohidrat, nektar juga mengandung sedikit senyawa-senyawa nitrogen seperti asam amino, amida, asam organik, vitamin dan senyawa aromatik^[14]. Lebah madu juga dapat memperoleh karbohidrat dari nambur madu atau *honeydew*, yaitu cairan gula yang disekresikan tanaman melalui perantaraan sejenis kutu (*plantsucking insects*).

Karbohidrat yang terkandung pada nambur madu tersebut sekitar 90-95%. Nambur madu dikumpulkan oleh lebah kemudian diubah menjadi madu dan dapat menjadi sumber madu utama^[14].

Hal ini dapat diduga bahwa madu dari lebah *Apis mellifera* memperoleh karbohidrat dalam bentuk gula dari nambur madu atau nektar dalam jumlah besar yang terdapat didalam madu. Selain itu lebah *Apis mellifera* merupakan jenis lebah yang memproduksi madu jumlah yang banyak di banding jenis lebah lainnya^[15], sehingga dimungkinkan, dengan jumlah produksi madu yang berlimpah dan sumber pakan berupa nektar atau nambur madu yang dikonsumsi oleh lebah mempengaruhi jumlah nilai aktivitas amilase yang dihasilkan madu tersebut.

Aktivitas Lipase

Pengukuran aktivitas lipase dilakukan dengan substrat minyak kelapa dalam bentuk emulsi. Data hasil pengukuran aktivitas lipase ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel.4 Aktivitas Lipase

Sampel	Aktivitas lipase ($\mu\text{mol}/\text{menit}$)	Aktivitas spesifik (U/mg)
Madu <i>Trigona sp</i>	0,153	0,359
Madu <i>Apis Mellifera</i>	0,076	0,304
Madu <i>Apis dorsata</i>	0,116	0,287

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa nilai aktivitas lipase terdapat pada tiap-tiap madu dari lebah *Trigona sp*, *Apis mellifera* dan *Apis dorsata* berturut-turut yaitu sebesar (0,359; 0,304; 0,287) U/mg. Pada madu dari lebah *Trigona sp* memiliki nilai aktivitas lipase tertinggi dibanding madu lainnya. Kandungan lemak di dalam madu sangat kecil yaitu $\pm 0,1$ gr dari komposisi 100 gr madu^[9]. Lebah dewasa memerlukan lemak sebagai peran fungsional selama perkembangan evolusi serangga yang dibutuhkan semenjak lebah bermetamorfosis hingga bertelur kembali, lebah memperoleh lemak dari berbagai sumber pakan seperti pollen, nektar, atau nambur madu^[16].

Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa madu dari lebah *Trigona sp* memiliki nilai aktivitas lipase yang tinggi diantara madu lainnya hal ini dapat diduga disekitar sarang lebah *Trigona sp* memiliki sumber pakan berupa pollen yang mempunyai kaya kandungan gizi diantaranya

lemak sebesar 3,3 % sehingga dimungkinkan, dengan jumlah sumber pakan yang tersedia berupa pollen berlimpah yang dikonsumsi oleh lebah mempengaruhi jumlah nilai aktivitas lipase yang dihasilkan madu tersebut.

KESIMPULAN

Madu dari lebah *Trigona sp* memiliki nilai aktivitas amilase dan lipase masing-masing sebesar 0,0136 U/mg dan 0,359 U/mg, sedangkan pada madu dari lebah *Apis mellifera* memiliki aktivitas protease, amilase dan lipase masing-masing sebesar yaitu $1,22 \times 10^{-6}$ U/mg; 0,944 U/mg dan 0,304 U/mg kemudian pada madu dari lebah *Apis dorsata* memiliki aktivitas amilase dan lipase masing-masing sebesar 0,0645 U/mg dan 0,287 U/mg.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Gunawan D. 2004. *Ilmu Obat Alam Jilid I*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- [2] Badan Standarisasi Nasional Indonesia. 01-3545-1994.
- [3] Sarwono B. 2001. *Kiat Mengatasi Permasalahan Praktis Lebah Madu*. Cetakan Pertama. PT. Agro Media Pustaka, Jakarta.
- [4] Nadhilla N.F. 2014. "The Activity Of Antibacterial Agent Of Honey Against Staphylococcus aureus". *Journal majority*, Volume 3 No.7.
- [5] Surmalin L.O, Anna M., Prita W., Masitoh. 2014. "Aktivitas Antikanker dan Antioksidan Madu di Pasaran Lokal Indonesia". *Tesis*, Program Studi Kimia, Universitas Islam Negeri Syariff Hidayatullah, Jakarta.
- [6] Widyawati, Nurhaedar J., Citrakesumasari. 2013. "Pengaruh Pemberian Madu Terhadap Gula Darah Puasa Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Dengan Terapi Glibenklamid atau Metformin". *Tesis*, program pasca sarjana Universitas Hasanudin, Makassar.
- [7] Mohsen. 2009. "Effects of Natural Honey Consumption in Diabetic Patients : an 8-week randomized clinical trial". *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; 60 (7): 618 – 626.
- [8] Nadhilla N.F. 2014. "The Activity Of Antibacterial Agent Of Honey Against Staphylococcus aureus". *Journal majority*, Volume 3 No.7.
- [9] Suranto A. 2004. *Khasiat dan Manfaat Madu Herbal*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- [10] Pavord, A.V. 1975. *Bees and Beekeeping*. Redwood Burn Limited. London
- [11] Gojmerac, W, L., 1983. *Bee, Beekeeping honey And Pollonation*. Avi Publishing Company. Inc Westport Connecticut.
- [12] Gunawan D. 2004. *Ilmu Obat Alam Jilid I*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- [13] Krell, R. 1996. "Value Added Products from Beekeeping." *FAO Agricultural Services Bulletin*. No. 124. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- [14] Kuntadi. 2008. "Perkembangan Koloni Apis Mellifera L. Yang Diberi Tiga Formula Kedelai Sebagai Pakan Buatan Pengganti Serbuk Sari". *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*. 5(4):367-397.
- [15] Mahani, R.A. Karim dan N. Nurjanah. 2011. *Keajaiban Propolis*. Pustaka Bunda. Jakarta
- [16] David. 2008. *A Practical Manual of Beekeeping*. Spring Hill: United Kingdom