

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI LINAMARASE HASIL ISOLASI DARI UMBI SINGKONG (*MANIHOT ESCULENTA CRANTZ*)

Askurrahman

Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo

Korespondensi : Jl. Raya Telang PO BOX 2 Kamal-Bangkalan, Email: [s\\_coer@yahoo.com](mailto:s_coer@yahoo.com)

### ABSTRACT

*The purpose of this research was to know the optimum condition of linamarase enzymatic reaction from bitter cassava. These studies are designed in several stages of inter-related. Starting with the determination of cyanide content of cassava tubers, Isolation and characterization linamarase on cassava tuber. The research result showed that linamarase had optimum condition in some activities; pH for about 6, temperature for about 40<sup>o</sup>C, incubation period for about 3 hours, and Km for about 0.012% and Vmaks for about 0.296 unit.*

**Key Words: Isolation, Characterization, Linamarase, Cassava (*Manihot esculenta Crantz*)**

### PENDAHULUAN

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan tanaman yang sangat populer di seluruh dunia, khususnya di negara-negara tropis. Di Indonesia, singkong memiliki arti ekonomi terpenting dibandingkan dengan jenis umbi-umbian yang lain. Singkong (*Manihot esculenta* Grant) merupakan salah satu bahan pangan yang utama. Di Indonesia, singkong merupakan makanan pokok ke tiga setelah padi-padian dan jagung (Chalil, 2003).

Singkong mengandung senyawa glukosida sianogenik, yang tersebar hampir pada semua jaringan tanaman, yang terdiri atas linamarin dan lotastrain dengan perbandingan 10:1 (dimana senyawa ini dapat berubah menjadi sianida yang sangat beracun) (Djazuli dan Bradbury, 1999; Nambisan, 1999). Mkpung *et al.* (1990), mengatakan bahwa hidrolisis linamarin dengan linamarase menghasilkan aseton sianohidrin dan glukosa. Aseton sianohidrin secara spontan pada pH di atas 5 menghasilkan asam sianida (HCN) dan aseton. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yeoh (1997) diketahui bahwa kandungan glukosida sianogenik pada singkong di Indonesia berkisar 20 ppm sampai 200 ppm. Sedangkan menurut FAO/WHO 1991 dalam Iglesias *et al.* (2002), kandungan sianida yang diperbolehkan pada makanan dari singkong maksimal 10 ppm. Maka diperlukan upaya

menurunkan kandungan glukosida sianogenik pada umbi singkong.

Penggunaan singkong sebagai bahan makanan sering dihadapkan dengan permasalahan kesehatan, karena masih tertinggalnya kandungan glukosida sianogenik termasuk linamarin yang tidak terhidrolisis pada saat proses pengolahan (Mkpung *et al.*, 1990). Hidrolisis linamarin oleh linamarase menghasilkan aseton sianohidrin dan glukosa. Oleh sebab itu, penurunan kandungan sianida pada umbi singkong sangat diperlukan untuk keamanan pangan. Umbi singkong menghasilkan linamarase (Mkpung *et al.*, 1990).

Pada proses pengolahan pangan sianida pada singkong dihilangkan dengan merebus dan membuang air perebus. Akan tetapi, proses pemasakan secara tradisional baik dengan cara direbus maupun digoreng tidak dapat menghilangkan sempurna senyawa sianida. Maka diperlukan upaya penurunan kandungan glukosida sianogenik dengan mengoptimalkan proses hidrolisis glukosida sianogenik oleh linamarase.

Linamarase (EC.3.2.1.21) yang diisolasi dari singkong sampai saat ini belum banyak ditentukan karakternya. Linamarase menghidrolisis linamarin menjadi asam sianida, perlu dipelajari kondisi optimum yang dapat mempengaruhi kerja enzim linamarase, misalnya pengaruh suhu, pH substrat, waktu inkubasi dan penentuan karakter Km

(konstanta hubungan antara laju reaksi antara tahap-tahap reaksi enzim dan merupakan jumlah konsentrasi substrat untuk mencapai aktivitas enzim setengah maksimum) dan  $V_{maks}$  (kecepatan aktivitas enzim maksimum).

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut; Mengetahui kandungan sianida pada umbi singkong, Mengetahui kondisi optimum reaksi enzimatis linamarase hasil isolasi dari singkong pahit.

## METODE PENELITIAN

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah singkong pahit varietas lokal yang berumur 1 tahun diperoleh dari Desa Kertagena Tengah, Kecamatan Kadur, Kabupaten Pamekasan. Bahan kimia yang digunakan adalah aquades, NaOH 2.5%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , asam pikrat, Kloroform, asam sitrat, kalium dihidrogen fosfat, asam borat, NaOH 0.2 M, PMSF, Ammonium Sulfat, HCl,  $\text{BaCl}_2$ , Metanol (99.5%), KCN, TCA 4%, BSA, Reagen Biuret.

### Penentuan Kadar Sianida

Singkong diparut kemudian ditimbang 20 g singkong, dimasukkan dalam labu Kjedahl, selanjutnya ditambahkan 100 ml aquades. Dimaserasi selama (0, 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 jam). Kemudian distilasi secara *steam distillation*. Distilat ditampung dalam erlenmeyer yang telah diisi dengan 20 ml NaOH 2.5%, dan distilasi dihentikan setelah dipastikan destilat hingga  $\pm 150$  ml. Diambil 5 ml distilat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 ml Natrium Pikrat dan 0.5 ml kloroform. Kemudian dihomogenizer dan didiamkan selama 30 menit dan selanjutnya dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrometri 20.

### Isolasi Linamarase dari Singkong

Singkong diparut, kemudian ditimbang sebanyak 100 g, ditambahkan 100 ml 0,1 M buffer sitrat fosfat pH 7 dan 0.25 ml PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*), di blender pada suhu dingin, disonikator selama kurang lebih 5 menit dan selanjutnya disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam beker, dan disentrifugasi 4.000 rpm selama 10 menit.

Supernatan yang dihasilkan merupakan enzim kasar (*crude enzim*).

Enzim kasar kemudian diendapkan dengan Ammonium Sulfat Jenuh (SAS) 40%. Sebanyak 50 ml larutan ekstrak kasar enzim dimasukkan ke dalam gelas beker 250 ml, ditambah ammonium sulfat 12.15 g. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit disertai pengadukan perlahan-lahan, larutan dipertahankan pada suhu 4-25°C selama 30 menit. Kemudian disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari endapan.

Endapan dilarutkan ke dalam 5 ml larutan buffer sitrat fosfat pH 7. Masing-masing larutan enzim dimasukkan ke dalam kantong selofan, kemudian direndam dalam 300 ml larutan buffer sitrat fosfat 0,05 M pH 7 selama semalam. Dialisis dilakukan sampai garam terpisah. Untuk mengujinya, 5 ml buffer diambil dan dimasukkan tabung reaksi, kemudian ditambah 1 ml HCl 0,1 M dan beberapa tetes  $\text{BaCl}_2$  0,1 M. Apabila tidak terbentuk endapan, maka dialisis dihentikan.

### Penentuan Aktivitas Linamarase

Dicampur 1,25 ml ekstrak kasar linamarin dengan konsentrasi 12%, 1 ml larutan buffer sitrat fosfat pH 7; 1 ml linamarase, 0,01 ml kloroform dan 1 ml larutan natrium pikrat lalu diinkubasi selama 3 jam pada suhu 33°C. Larutan ditambah 2,5 ml larutan TCA 4% (b/v) dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit, untuk pemisahan filtrat dan endapan yang terbentuk. Filtrat diambil 1 ml dan diencerkan sampai 10 ml lalu diukur absorbansinya pada  $\lambda_{maks}$  kompleks sianida. Blangko yang digunakan dibuat dengan terlebih dahulu menambahkan TCA ke dalam larutan enzim, kemudian ditambahkan ekstrak kasar linamarin dan larutan yang lainnya sesuai dengan prosedur penentuan aktivitas enzim. Nilai aktivitas enzim diukur dari kadar sianida yang diperoleh hasil plot terhadap kurva baku kompleks sianida. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai  $\mu\text{mol}$  sianida yang dibebaskan atau dihidrolisis setiap 1 ml volume enzim per menit pada kondisi tertentu. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversi nilai serapan

menjadi konsentrasi kompleks sianida ( $\mu\text{g/mL}$ ) dengan menggunakan kurva baku kompleks sianida.

$$\text{Aktivitas} = \frac{[\text{CN}^-]}{\text{BM CN}} \times \frac{V}{\text{pxq}} \times \text{FP}$$

Dimana  $V$  = Volume total sample percobaan pada tiap tabung (mL)

$p$  = Jumlah enzim (mL)

$q$  = Waktu inkubasi (menit)

FP = Faktor pengenceran

### Karakterisasi Linamarase dari Singkong

#### *Penentuan pH Optimum*

Penentuan pH optimum aktivitas linamarase dilakukan dengan menggunakan range pH 5.0-7.5 dengan selang 0.5, sehingga didapatkan 6 level perlakuan pH. Selanjutnya diamati aktivitas linamarase pada tiap level pH. Salah satu level pH yang menunjukkan aktivitas enzim tertinggi akan dipakai untuk pengujian selanjutnya.

#### *Penentuan Suhu Optimum*

Penentuan suhu optimum aktivitas linamarase dilakukan dengan menggunakan range suhu 30-55°C dengan selang 5°C, sehingga didapatkan 6 level perlakuan suhu. Selanjutnya diamati aktivitas linamarase pada tiap level suhu. Salah satu level suhu yang menunjukkan aktivitas enzim tertinggi akan dipakai untuk pengujian selanjutnya.

#### *Penentuan Waktu Inkubasi Optimum*

Penentuan waktu inkubasi optimum aktivitas linamarase dilakukan dengan menggunakan range waktu 1-6 jam dengan selang 1 jam, sehingga didapatkan 6 level perlakuan suhu. Selanjutnya diamati aktivitas linamarase pada tiap level waktu inkubasi. Salah satu level waktu inkubasi yang menunjukkan aktivitas enzim tertinggi akan dipakai untuk pengujian selanjutnya.

#### *Penentuan Nilai Km dan Vmaks pada Berbagai Konsentrasi Substrat*

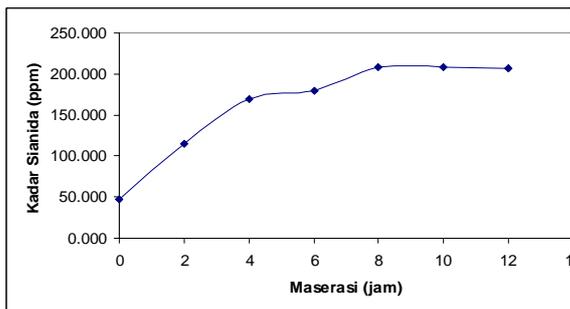
Penentuan nilai Km dan Vmax dihitung pada beberapa level substrat ekstrak kasar linamarin sebanyak 3, 6, 9, 12, 15 dan 18%. Reaksi antara linamarase dan substrat dilakukan pada pH optimum, suhu optimum dan menggunakan waktu inkubasi optimum.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### **Pengaruh Lama Maserasi Terhadap Kadar Sianida Singkong**

Gambar 1. menunjukkan bahwa lama maserasi dari 0-8 jam terjadi peningkatan kadar sianida. Hal ini diduga semakin lama maserasi terjadi hidrolisis prekursor sianida semakin banyak dan dapat mempercepat pelarutan senyawa glukosida siangenik, karena glukosida sianogenik larut dalam air. Menurut Pembayun (2000), proses perendaman menyebabkan air berdifusi ke dalam sel-sel melalui membran sel yang sangat permeabel. Lama maserasi 8 jam merupakan lama maserasi optimum dengan kadar sianida sebesar 208.511 ppm. Hal itu diduga bahwa pada lama maserasi 8 jam pemecahan prekursor sianida yaitu glukosida sianogenik oleh endogenous terjadi secara maksimal. Prekursor sianida (linamarin dan otaustrain) dipecah oleh enzim endogenous yang terdapat dalam umbi singkong. Pada lama maserasi 8-12 jam kadar sianida pada umbi singkong menunjukkan konstan. Hal itu diduga bahwa endogenous yang memecah prekursor sianida yaitu glukosida sianogenik mengalami kejenuhan.

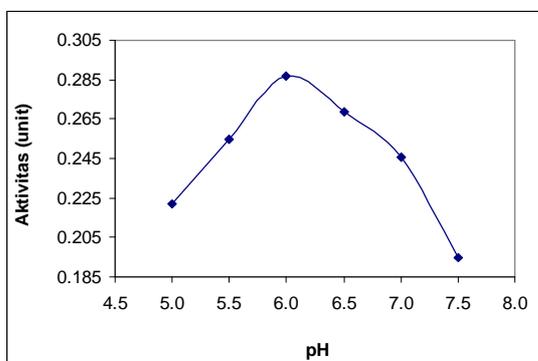
Suryani dan Wesniati (2000), pada umumnya sianida dapat dihilangkan dengan perebusan dan perendaman sebab sianida mempunyai sifat fisik mudah larut dalam air dan mempunyai titik didih 290C. Anwar (2004) juga mengatakan bahwa sianida atau racun pada singkong dapat hilang setelah pencucian, perendaman, pemasakan dan pengeringan selama proses produksi beras singkong semi instan. Wirjatmadi (2005) menambahkan bahwa kadar sianida dapat dihilangkan dengan pencucian, perendaman, perebusan dan penjemuran. Oleh sebab itu, penurunan kandungan sianida pada produk tepung singkong dikarenakan terjadi penguapan sianida bebas saat proses pengeringan dengan menggunakan pengering pada suhu 70°C



Gambar 1. Pengaruh Lama Maserasi terhadap Kadar Sianida Pada Sampel singkong.

### Karakterisasi Linamarase dari Singkong

#### pH Optimum



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Linamarase dari Singkong

Gambar 2 menunjukkan bahwa pH berpengaruh terhadap aktivitas linamarase hasil isolasi dari umbi singkong. Pada pH di bawah 6.0 menunjukkan bahwa aktivitas linamarase lebih kecil. Hal itu disebabkan perubahan pH mengakibatkan perubahan intramolekular linamarase. Disamping itu, pH dibawah 6 diduga terjadi perubahan muatan listrik substrat atau enzim, yaitu perubahan muatan residu asam amino yang mengikat substrat atau katalisis.

Whiteker (1994) menyebutkan pengaruh pH terhadap katalitik enzim terutama disebabkan oleh perubahan ionisasi enzim pada gugus ionik pada sisi aktif atau sisi yang lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif. Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat menjadi produk.

pH optimum linamarase dari singkong berkisar 6 dengan nilai aktivitas sebesar 0.287 unit. Pada pH 6 linamarase diduga

mempunyai stabilitas yang tinggi. Winarno (1996) mengatakan enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH yang disebut pH optimum, dimana enzim pada kondisi ini mempunyai stabilitas yang tinggi. Karlson (1979) menambahkan bahwa struktur ruang tiga dimensi yang stabil yang dimiliki oleh enzim pada kondisi pH optimum.

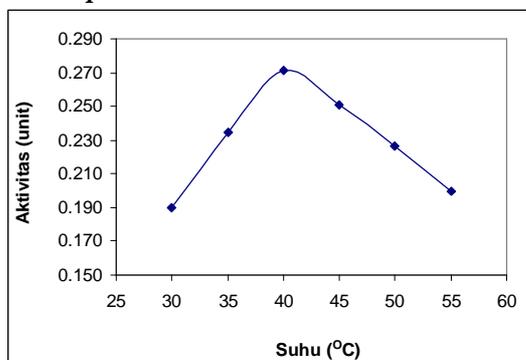
Semakin jauh dari pH optimum menunjukkan aktivitas linamarase hasil isolasi dari umbi singkong semakin tidak stabil sehingga aktivitasnya semakin rendah. Hal ini karena enzim merupakan protein yang tersusun atas asam-asam amino yang memiliki kepekaan terhadap perubahan pH lingkungannya. Saat pH berada di atas pH optimum, aktivitas linamarase mengalami penurunan (Gambar 5.6). Menurut Muhtadi (1992) mengatakan di luar kisaran pH optimum enzim menjadi inaktif. Hal ini, disebabkan perubahan pH mengakibatkan perubahan intramolekuler dari enzim. Apabila perubahan terlalu besar akan mengakibatkan denaturasi enzim sehingga aktivitas enzim akan hilang.

pH di atas pH optimum juga diduga dapat menyebabkan denaturasi protein enzim yang mengubah susunan ruang tiga dimensi molekul protein enzim. Menurut Naz (2002), perubahan keaktifan enzim akibat perubahan lingkungan menyebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim. Wong (1995) menambahkan, pH ekstrim berpengaruh terhadap struktur enzim dan muatan substrat. Kelebihan atau kekurangan ion H<sup>+</sup> menyebabkan perubahan konformasi sisi aktif enzim sehingga substrat tidak lagi berikatan dengan enzim, selanjutnya berakibat pula pada pembentukan produk. Poedjiadi (1994) menambahkan pada pH tinggi selain berpengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH tinggi dapat pula menyebabkan denaturasi yang mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim.

pH optimum aktivitas linamarase yang dihasilkan, sama dengan pH optimum linamarase hasil isolasi dari *Leuconostoc Mesenteroides* (Gliegen *et al.*, 1997), Linamarase hasil isolasi dari yeast *Endomyces fibuliger* (Brimer, *et al.*, 1998) dan linamarase hasil isolasi dari singkong (Ampe dan Brauman, 1995) yaitu memiliki pH optimum

6. Sedangkan hasil penelitian Mkpong (1990) menyebutkan linamarase yang diisolasi dari daun singkong mempunyai pH optimum 7 dan linamarase yang diisolasi dari kacang koro mempunyai pH optimum 5.6.

#### Suhu Optimum



Gambar 3. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Linamarase dari Singkong

Gambar 3. menunjukkan bahwa suhu berpengaruh terhadap aktivitas linarase hasil isolasi dari umbi singkong. Pada suhu 30-40°C menunjukkan peningkatan aktivitas linamarase. Hal itu disebabkan karena semakin meningkatnya suhu kecepatan reaksi yang dikatalisis linamarase naik. Disamping itu, kenaikan kecepatan dibawah suhu optimum disebabkan oleh kenaikan energi kinetika molekul-molekul yang bereaksi.

Kecepatan suatu reaksi enzimatik, seperti kebanyakan reaksi kimia, meningkat dengan naiknya suhu. Meningkatnya suhu dapat mempengaruhi meningkatnya afinitas enzim terhadap katalisator dan aktivator sehingga mempercepat reaksi. Disamping itu, peningkatan suhu akan menyebabkan bertambahnya energi kinetik dari enzim maupun substrat, sehingga akan terjadi peningkatan kecepatan gerakan enzim dan substrat, dan hal ini akan mengakibatkan peningkatan peluang terjadinya tumbukan antar keduanya. Makin besar frekuensi tumbukan molekul enzim dengan substrat, maka makin besar peluang terjadinya interaksi antara enzim dengan substrat dan makin besar pula peluang terbentuknya produk.

Pada suhu optimum dicapai aktivitas enzim yang optimum dan dihasilkan produk secara optimum pula. Menurut Robyt and White (1987) kenaikan kecepatan dibawah

suhu optimum terjadi karena kenaikan energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi.

Menurut Arteaga and Nakai (1990), pada suhu tinggi di atas suhu optimal akan terjadi kerusakan protein yang disebut denaturasi, sehingga terjadi penurunan aktivitas. Robyt and White (1987) menambahkan apabila suhu dinaikkan terus-menerus, energi kinetik kolekul enzim menjadi besar sehingga mencapai energi aktifasi untuk memecah ikatan sekunder dan tersier yang mempertahankan enzim dalam keadaan asli atau keadaan katalitik aktif sehingga mengakibatkan hilangnya aktivitas katalitik.

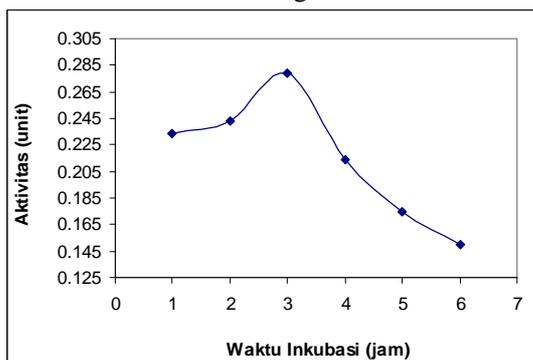
Pada suhu yang lebih tinggi dari pada suhu optimum, aktivitas linamarase menurun. Enzim dan substrat dapat mengalami perubahan konformasi pada suhu yang terlalu tinggi, sehingga gugus reaktif keduanya menjadi tidak bersesuaian dan menyebabkan tidak terjadi interaksi. Bila suhu terus ditingkatkan maka enzim bisa terdenaturasi, sehingga peluang terbentuknya produk menurun. Menurut Siegel (1975) mengatakan laju reaksi berkatalisis enzim akan meningkat bila suhu dinaikkan, akan tetapi kenaikan ini terbatas, oleh karena itu pada suhu tertentu kenaikan itu akan mengakibatkan penurunan aktivitas enzim yang disebabkan denaturasi enzim. Whitaker (1994) menambahkan bahwa perubahan suhu dapat mempengaruhi konformasi enzim, karena terjadinya kenaikan suhu menyebabkan peningkatan energi yang akan mempengaruhi ikatan ion, hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim. Perubahan konformasi akan mempengaruhi lokasi aktif dari enzim, akibatnya aktivitas enzim menjadi berkurang (menurun).

Suhu optimum adalah 40°C dengan jumlah aktivitas linamarase sebesar 0.271 unit. Sedangkan di atas dan di bawah 40°C aktivitas linamarase mengalami penurunan. Suhu optimum aktivitas linamarase hasil isolasi dari umbi singkong adalah 40°C. Suhu tersebut sama dengan suhu optimum aktivitas linamarase yang diisolasi dari mikroorganisme *Mucor circirellodes* LU M40 yaitu suhu 40°C (Petruccoli *et al.*, 1999). Sedangkan pada hasil penelitian Mkpong (1990) mengatakan linamarase yang diisolasi dari daun singkong memiliki suhu optimum

55°C dan linamarase yang diisolasi dari kacang koro meliki suhu optimum 62°C.

**Waktu Inkubasi Optimum**

Semakin lama waktu reaksi enzimatik (pada waktu inkubasi 1-3 jam) maka semakin tinggi aktivitas linamarase. Hal itu disebabkan karena terjadi pembentukan produk hasil hidrolisis semakin meningkat.



Gambar 4. Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Linamarase dari Singkong

Pada reaksi enzimatik kurang dari 180 menit, aktivitas linamarase belum maksimal. Hal itu diduga karena terlalu singkatnya waktu yang berikatan antara linamarase dengan substrat, sehingga produknya pula belum optimal pada saat reaksi dihentikan.

Semakin lama waktu reaksi enzimatik maka semakin banyak produk yang terbentuk, yang juga berarti aktivitas linamarase semakin besar. Aktivitas linamarase terus meningkat hingga dicapai waktu reaksi enzimatik optimum. Waktu reaksi enzimatik optimum linamarase adalah 180 menit.

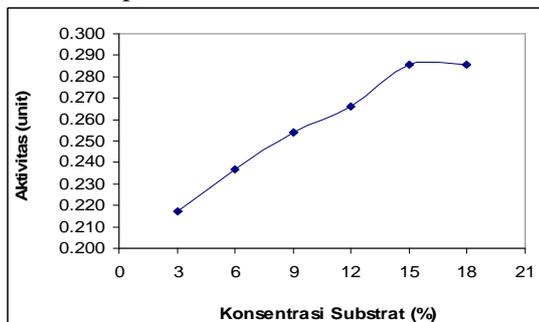
Setelah 180 menit, linamarase telah jenuh berikatan dengan substrat, sehingga pertambahan reaksi enzimatik tidak akan menambah pembentukan produk dan akibatnya aktivitas linamarase menurun. Penurunan nilai aktivitas enzim karena melibatkan waktu inkubasi sebagai faktor pembagi, sehingga bila faktor pembaginya semakin besar, maka aktivitas yang dihasilkan akan semakin kecil. Menurut Aulani'am (2005), waktu yang digunakan enzim berikatan dengan substrat secara tetap disebut reaksi enzimatik. Dimana waktu reaksi

enzimatis sebanding dengan produk yang dihasilkan.

Waktu inkubasi optimum adalah 180 menit (3 jam) dengan jumlah aktivitas linamarase sebesar 0.2791unit. Sedangkan di atas dan di bawah waktu inkubasi 180 menit (3 jam) aktivitas linamarase mengalami penurunan.

**Pengaruh Konsentrasi Substrat**

Kecepatan reaksi, akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Akan tetapi penambahan substrat yang terus-menerus akan meningkatkan kecepatan reaksi dengan laju yang semakin kecil. Pada akhirnya akan tercapai titik batas dimana kecepatan reaksi tidak lagi bertambah dengan bertambahnya substrat. Kondisi seperti di atas dapat terjadi dengan asumsi faktor-faktor lain seperti suhu, pH dan lain-lain dalam keadaan konstan. Menurut Reed (1966) mengatakan kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Semakin tinggi konsentrasi substrat, kecepatan reaksinya semakin tinggi. Sampai batas tertentu kecepatan reaksi akan konstan dengan naiknya konsentrasi substrat (pada konsentrasi enzim tetap).



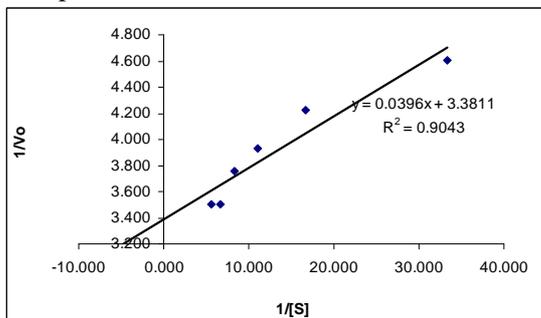
Gambar 5. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Linamarase dari Singkong.

Gambar 5. menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat maka semakin tinggi pula aktivitas linamarase sampai pada titik konstan. Meningkatnya aktivitas linamarase ditunjukkan pada konsentrasi 3% sampai 15%, sedangkan pada konsentrasi 18% aktivitas linamarase terjadi titik konstan. Konsnterasi substrat Optimum yaitu pada konsentrasi 15% dengan aktivitas 0.286 unit.

Whitaker (1994) mengatakan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi substrat maka semakin meningkat pula aktivitas enzim sampai pada titik konstan. Pada konsentrasi substrat yang rendah, tidak semua molekul-molekul enzim akan berkombinasi dengan substrat. Jika konsentrasi ditingkatkan, molekul-molekul enzim akan lebih banyak yang berkombinasi dengan substrat sampai terjadi kondisi enzim jenuh dengan substrat. Peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak akan meningkatkan laju reaksi.

Penentuan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  linamarase dari umbi singkong diawali dengan menghitung nilai  $V_o$  (kecepatan awal linamarase dalam memecah substrat linamarin). Linamarase dari umbi singkong diinkubasikan pada berbagai level konsentrasi linamarin (3%, 6%, 9%, 12%, 15% dan 18%) dengan pH 6, suhu 40°C selama 180 menit.

Nilai  $V$  awal dari masing-masing konsentrasi substrat tersebut kemudian diplotkan dalam bentuk kurva Michaelis-Menten. Kurva Michaelis-Menten selanjutnya dijadikan dasar untuk membentuk kurva Lineweaver-Burk (Gambar 6) untuk memperoleh nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ .



Gambar 6. Plotting Data Konsentrasi Substrat dan Kecepatan Awal Reaksi dengan Metode Lineweaver-Burk

Berdasarkan grafik hubungan antara  $1/[S]$  dengan  $1/V_o$  menurut metode Lineweaver-Burk, maka  $V_{maks}$  dan  $K_m$  enzim dihitung (Whittaker, 1994). Berdasarkan perhitungan tersebut dapat diketahui bahwa nilai  $V_{maks}$  yang diperoleh sebesar 0.296 Unit dan  $K_m$  sebesar 0.012 %.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan

bahwa Kadar sianida pada umbi singkong dengan perlakuan lama maserasi 8 jam adalah sebesar 208.511 ppm dan Linamarase memiliki kondisi optimum untuk aktivitasnya sebagai berikut; pH sekitar 6, suhu sekitar 40°C, waktu Inkubasi sekitar 3 jam dan  $K_m$  sebesar 0.012% serta  $V_{maks}$  sebesar 0.296 unit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anwar F. 2004. Beras Singkong Semi Instan. Laboratorium Manajemen Pangan, Fakultas Pertanian. IPB. Bogor.
- Arteaga GE. and S. Nakai. 1990. Tetrathionate Protect Proteolytic Activity of Simultane Papaya Latex and Crude Papain. *J. Food Sci.* 55(6): 1728-1734.
- Aulanni'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang
- Brimer L, MJR. Nout and G. Tuncel. 1998.  $\beta$ -Glucosidase (amygdalase and Linamarase) from *Endomyces fibuliger* (LU677): formation and crude enzyme properties. *J. Appl Microbiol Biotechnol.* 49:182-188
- Chalil, D. 2003. Agribisnis Ubi Kayu di Propinsi Sumatera Utara. Jurusan Sosial Ekonomi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Djazuli M. dan H. Bradbury. 1999. Cyanogen Content of Cassava Roots and Flour In Indonesia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 65: 523-535.
- Eksittikul T dan M. Chulavatnatol. 1988. Characterization of Cyanogenic  $\beta$ -Glucosidase (Linamarase) from Cassava (*Manihot esculenta Crantz*). *J. Archives of Biochemistry and Biophysics.* 266 (1): 263-269.
- Franzl S, I. Ackermann and A. Nasrstedt. 1989. Purification and Characterization of a  $\beta$ -glukosidase (Linamarase) from the haemolymph of *Zygaena trifolii* Esper, 1783 (Insecta, Lepidoptera). Experientia, Birkhauser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland.
- Gliegou Y, P. Chemardin, P. Labrot, A. Amaud and P. Galzy. 1997. Purification and Characterization of an Intracellular  $\beta$ -Glucosidase from a New Strain of

- Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Cassava. *Journal of Applied Microbiology*. **82**:469-476.
- Iglesias CA, T. Sanchez, and HH. Yeoh. 2002. Cyanogens and Linamarase Activities in Storage Roots of Cassava Plant from Breeding Program. *Journal of Food Composition and Analysis*. **15**: 3379-387.
- Karlson P. 1979. Introduction to Modern Biochemistry (Edisi ke-3), New York:: Academic Press.
- Mkpong OE, H. Yan, G. Chism and R.T. Sayre. 1990. Purification, Characterization, and Localization of Linamarase in Cassava. *J. Plant Physiol*. **93**: 176-181
- Muhtadi D. 1992. Enzim dalam Industri Pangan dan Gizi. IPB. Bogor. Hal. 31-37.
- Nambisan B. 1999. Cassava Latex and Source as Linamarase for Determination of Linamarin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**: 372-373.
- Naz S. 2002. Enzymes and Food. Oxford University Press. Pakistan.
- Pembayun R. 2000. Hydro Cyanic Acid and Organoleptic Test on Gattung Instant Rice from Various Methods of Detoxification. Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan CO-13:97-107.
- Petrucchioli M, L. Brimer, AR. Cicalini and F. Federici. 1999. The Linamarase of *Mucor circinelloides* LU M40 and its Detoxifying Activity on Cassava. *J. App. Microbiology*. **86**: 302-310
- Poedjiadi, 1994. Dasar-dasar Biokimia. Jakarta: UI Press..
- Reed RSD. 1966. Principles of Biochemistry. Boston: Holgton Mifflin Co.
- Robyt JF and BS. White. 1987. Biochemical Technic Theory and Practical. New York: Klower Academic Publisher.
- Seidman L. and J. Mowery. 2006. Salting Out: Ammonium Sulfate Precipitation. The Biotechnology Project. Illinois State University.
- Siegel IH. 1975. Enzyme Kinetics Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium Steady State Enzyme Systems. New York: John Willey and Sons.
- Suryani CL. dan N. Westiani. 2000. Studi Pembuatan Tepung Kara Benguk. Prosiding Seminar Teknologi Pertanian Spesifik Lokasi dalam Upaya Peningkatan Kesejahteraan Petani dan Pelestarian Lingkungan. Yogyakarta.
- Whitaker JR. 1994. Principle of Enzymology for The Food Science. Second Edition. New York :Marcel Decker.
- Widyasaputra AF. 1992. Sifat Fisik dan Kimia Tepung Ubi Jalar Kajian Suhu Pemanasan dan Varietas. [Tesis yang tidak dipublikasikan Program Studi Ilmu Tanaman, Program Pasca Sarjana. Unibraw. Malang]
- Winarno FG. 1996. Enzim Pangan. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Wirjatmadi B. 2005. Pengaruh Beberapa Perlakuan Terhadap Penurunan Kadar HCN pada Ubi Kayu (*Manihol esculenta* Crantz). Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wong DWS. 1995. Food Enzymes: Structure and Mechanism. New York: Chapman and Hall.
- Yeoh HH and SV. Egan. 1997. An enzyme-based Dip-stick for The estimation of Cyanogenic Potential of Cassava Flour. *Food Chem*. **60**, 119-122.