

## PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI LINAMARASE GADUNG (*Dioscorea hispida* Dennst) UNTUK DETOKSIFIKASI BUBUR UMBI GADUNG

### *Purification and Characterization of Linamarase from Gadung (*Dioscorea hispida* Dennst) for Gadung Slurry Detoxification*

Harijono<sup>1\*</sup>, Siwi N.<sup>2</sup>, Aji Sutrisno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Teknologi Hasil Pertanian – Universitas Brawijaya, Jl. Veteran – Malang

<sup>2</sup>Program *Double Degree* Bioteknologi – Program Pascasarjana Fakultas Pertanian  
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran – Malang

\*Penulis Korespondensi: email harijono\_07@yahoo.com

#### **ABSTRACT**

*The aim of this research was to find out purification of enzyme linamarase from Dioscorea hispida Dennts. Enzyme purification was carried out by amonium sulphate fractionation and Sephadex G-75 gel filtration coloumn chromatography. Protein purify factor achieved was 10.5 times, protein yield was 33.3 % of the crude cell extract protein and specific activity was 2.93 U/mg. The enzyme purity of each purification stage was monitored by SDS-PAGE and resulted one protein band. The optimum temperature and pH of enzyme reaction was 57°C and pH 6.5 with 90 minutes incubation. Using crude linamarin as substrat, linamarase has  $K_m$  0.1564  $\mu\text{mol ml}^{-1}$  and  $V_{max}$  0.2796  $\mu\text{mol/minute}$ . Pure linamarase was added in *Dioscorea* slurry to increase cyanide release.*

*Keywords: purification, characterization, linamarase, detoxification, *Dioscorea hispida* Dennts.*

#### **PENDAHULUAN**

Sebagai sumber karbohidrat alternatif, gadung jarang dikonsumsi sebagai makanan utama karena proses pengolahan yang tidak sempurna bisa menyebabkan keracunan. Tanda-tanda keracunan atau kematian karena mengkonsumsi gadung sama dengan tanda-tanda keracunan hidrosianida (HCN) (Anonymous, 2006). Sianida muncul karena adanya hidrolisis senyawa glukosida siano-genik dalam umbi gadung oleh enzim linamarase endogen. Hidrolisis ini akan menghasilkan glukosa dan aseton sianohidrin (Keresztessy *et al.*, 2001). Menurut Mkpung *et al.*, (1990), aseton sianohidrin akan berdisosiasi secara spontan pada pH >5 atau secara enzimatik oleh hidrosinitril liase membentuk HCN dan aseton.

Perlakuan untuk mengurangi racun sianida dalam gadung adalah dengan merendam gadung yang telah diiris tipis

dengan air yang mengalir selama 3 hari atau air diganti setiap hari. Adapula yang direndam garam 10% selama 6 jam, dilapisi abu atau direbus dalam bentuk umbi utuh (Pambayun, 2000). Semua perlakuan tersebut masih menyisakan senyawa glukosida sianogenik dan residu sianida. Proses yang kurang sempurna tersebut dapat mengakibatkan keracunan dan gangguan kesehatan (Pambayun dan Martini, 2000).

Linamarin dalam tubuh bisa diubah menjadi sianida oleh mikroflora dalam saluran pencernaan. Sianida akan diubah menjadi tiosianat dan dibuang melalui urin. Perubahan ini membutuhkan beberapa mineral dan vitamin sehingga metabolisme sianida dalam tubuh akan menyebabkan tubuh kekurangan riboflavin, vitamin B12, sodium, dan metionin (Anonymous, 2004). Pambayun (2000) juga menjelaskan bahwa mengkonsumsi gadung mengandung asam sianida akan menyebabkan malnutrisi dan timbulnya

penyakit gondok karena tiosianat yang terbentuk mengganggu penyerapan iodium oleh kelenjar tiroid.

Cara yang bisa dilakukan untuk mengurangi atau menghilangkan semua prekursor sianida dalam gadung adalah dengan menambahkan enzim linamarase yang secara alami terdapat dalam gadung. Linamarase gadung akan terbantu dalam menghidrolisis semua senyawa glukosida sianogenik. Hidrosianida yang terbentuk dari aseton sianohidrin akan bisa dihilangkan dengan cara yang telah dikenal masyarakat seperti perendaman dalam air yang mengalir, pelapisan dengan abu atau perebusan umbi utuh.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan meliputi umbi gadung, amonium sulfat, buffer sitrat fosfat pH 7, gel Shepadex G-65 (Sigma), SDS (Merck), TEMED (Sigma), amonium persulfat (Sigma), akrilamid (Sigma), bis akrilamid (Sigma), asam asetat, *comassie blue*, glisin (Sigma), natrium pikrat, *protein marker* (Sigma), dan pereaksi biuret.

### Alat

Sonikator, kolom kromatografi, pH meter, inkubator, penangas air, perangkat elektroforesis, peralatan gelas, spektrofotometer.

### Jalan Penelitian

Penelitian ini dibagi ke dalam tiga tahap yaitu isolasi dan pemurnian linamarase dari umbi gadung; karakterisasi linamarase; dan aplikasi linamarase hasil isolasi pada bubur umbi gadung.

### Isolasi dan pemurnian linamarase

Isolasi dilakukan dengan menggunakan sonikator dan buffer sitrat fosfat pH 7 pada kondisi dingin (Gueguen *et al.*, 1995). Pemurnian dilakukan dengan pengendapan amonium sulfat bertingkat sebanyak 20%, 40%, 60% dan 80%.

Linamarase yang mempunyai aktivitas tertinggi dimurnikan menggunakan kolom kromatografi berisi gel Sephadex G-75. Setiap fraksi hasil elusi diuji aktivitas enzim (Yeoh *et al.*, 1997; Mkpong *et al.*, 1990; Iglesias *et al.*, 2002) dan kadar proteinnya (metode biuret). Fraksi yang mempunyai aktivitas tertinggi dikarakterisasi.

### Karakterisasi linamarase

Linamarase diuji aktivitasnya pada kisaran pH 5-pH 7.5, suhu kisaran 50-75°C, kisaran waktu inkubasi 30-180 menit, dan konsentrasi substrat 3, 6, 9, 12, 15, dan 18 ppm serta dihitung nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ . Selain itu digunakan elektroforesis SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul linamarase.

### Aplikasi linamarase untuk detoksifikasi bubur gadung

Untuk mengetahui pengaruh penambahan linamarase terhadap kandungan sianida pada bubur gadung, linamarase ditambahkan pada bubur gadung dengan perlakuan lama inkubasi 0, 2, 4, 6, dan 8 jam dan penambahan linamarase sebanyak 0, 0,078, 0,156, 0,234, 0,390, 0,468 mg, setelah itu diukur kandungan sianida bebasnya (metode spektrofotometri).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan Pemurnian Linamarase

Untuk mendapatkan enzim linamarase yang bebas dari molekul lainnya, dilakukan pengendapan protein menggunakan amonium sulfat dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Sebagai pembandingan, ekstrak kasar juga dihitung aktivitasnya.

Aktivitas spesifik merupakan perbandingan aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Aktivitas spesifik linamarase akibat pengaruh penambahan garam amonium sulfat terus meningkat sampai pengendapan garam 40%. Peningkatan ini sehubungan dengan meningkatnya aktivitas enzim dan rendahnya kadar

protein. Setelah itu terjadi penurunan pada konsentrasi garam 60%. Hal ini berarti penambahan amonium sulfat sebesar 60% sudah tidak efektif untuk mengendapkan protein. Berdasarkan hasil yang diperoleh diketahui bahwa konsentrasi amonium sulfat yang paling sesuai untuk pengendapan enzim linamarase adalah 40% dengan aktivitas spesifik sebesar 0,572 U/mg.

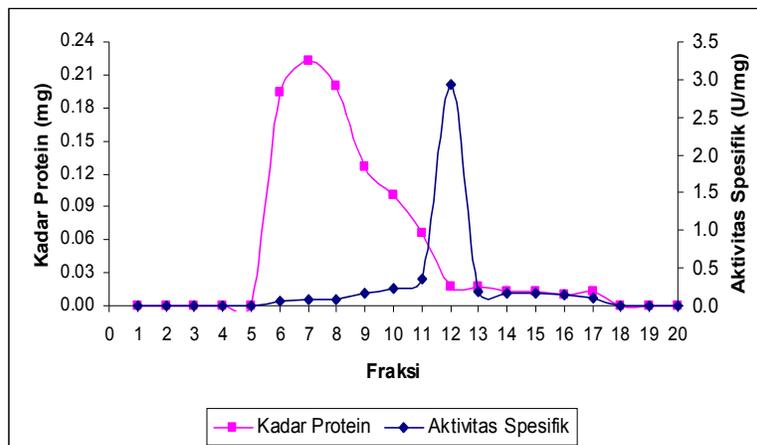
Pemurnian linamarase lebih lanjut dilakukan dengan mengelusi hasil presipitasi amonium sulfat 40% melalui kolom kromatografi filtrasi gel Sephadex G-75 yang sebelumnya telah disetimbangkan dengan buffer fosfat-sitrat pH 7. Elusi dilakukan dengan kecepatan alir 0.5 mL/menit dan tiap 3 mL eluen dikumpulkan menjadi fraksi-fraksi yang terpisah untuk diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Profil elusi linamarase gadung menunjukkan bahwa aktivitas spesifik linamarase mencapai puncak pada fraksi ke-4, 5, dan 6 yang berturut-turut sebesar 0,5833 U/mg, 0,7639 U/mg, dan 0,5500 U/ml. Fraksi ini yang dikumpulkan untuk dikarakterisasi lebih lanjut sedangkan fraksi selanjutnya menunjukkan penu-

runan aktivitas spesifik sampai fraksi ke-15. Fraksi yang mengandung protein tetapi tidak mengandung aktivitas linamarase menunjukkan protein yang tertera bukanlah protein enzim linamarase.

Untuk mendapatkan profil enzim linamarase yang lebih baik pada elektroforegram, maka sebanyak 2 mL enzim dari gabungan fraksi 4, 5, dan 6 dielusi kembali dengan kecepatan alir 0,3 mL/menit dan eluat ditampung setiap 2 mL tiap fraksi. Profil tiap fraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Terlihat pada Gambar 1 bahwa fraksi aktif dimulai pada fraksi 6 sampai fraksi 17 walaupun dengan aktivitas yang rendah. Kadar protein tertinggi pada fraksi ke-7 tetapi menunjukkan aktivitas yang rendah. Setelah itu kadar protein menurun seiring dengan terelusnya protein-protein pada fraksi-fraksi sebelumnya. Aktivitas spesifik enzim linamarase yang tinggi ditampilkan pada Gambar 1 yaitu pada fraksi ke-12 dengan aktivitas sebesar 2,933 U/mg dan kadar protein sebesar 0,0167 Unit. Fraksi ini selanjutnya dielektroforesis SDS-PAGE untuk dilihat profil pita proteinnya dan dihitung berat molekulnya.



Gambar 1. Profil elusi linamarase gadung fraksi gabungan 4, 5, dan 6 setelah melalui kolom kromatografi gel filtrasi Sephadex G-75 dengan kecepatan elusi 0,3 mL/menit

Tabel 1. Hasil pemurnian enzim linamarase gadung

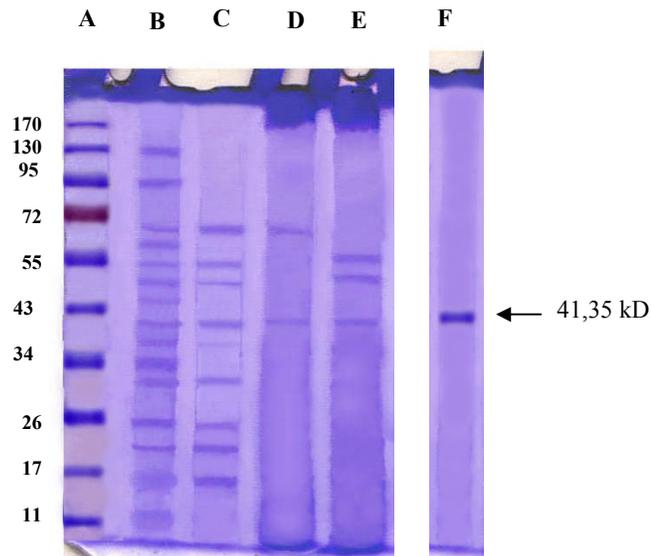
Metode Pemurnian Enzim	Aktivitas Enzim (Unit)	Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian <sup>a</sup>	Rendemen <sup>b</sup> (%)
Ekstrak kasar	0.147	0.533	0.278	1	100
SAS 40%	0.132	0.400	0.336	1.2	89.7
Sephadex G-75. Kecepatan elusi 0,5 mL/menit; jumlah eluen 3 mL/menit	0.074	0.078	0.965	3.4	50.3
Sephadex G-75. Kecepatan elusi 0,3 mL/menit; jumlah eluen 2 mL/menit	0.049	0.0167	2.933	10.5	33.3

<sup>a</sup>berdasarkan aktivitas spesifik yang diperoleh sesudah pemurnian dibandingkan dengan aktivitas spesifik sebelum pemurnian

<sup>b</sup>berdasarkan aktivitas enzim yang diperoleh sesudah pemurnian dibandingkan dengan aktivitas enzim sebelum pemurnian x 100%

Tabel 1 menunjukkan peningkatan kemurnian dari ekstrak kasar, pengendapan amonium sulfat 40%, dan kromatografi filtrasi gel. Ekstrak kasar yang mempunyai aktivitas spesifik sebesar 0,278 U/mg setelah diendapkan dengan amonium sulfat 40% meningkat menjadi

0,336 U/mg. Setelah melalui kolom kromatografi, aktivitas spesifik meningkat 3,4 kali ekstrak kasarnya menjadi 0.965 U/mg. Fraksi 4, 5, dan 6 yang dielusi kembali juga menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik sebesar 10,5 kali dari ekstrak kasar yaitu sebesar 2,933 U/mg.



Keterangan:

A. *Marker*

B. Ekstrak kasar

C. Setelah pengendapan amonium sulfat 40%

D. Setelah filtrasi gel Sephadex G-75 kecepatan elusi 0.5 ml/menit (koleksi fraksi ke-3, 7 dan 8)

E. Setelah filtrasi gel Sephadex G-75 kecepatan elusi 0.5 ml/menit (koleksi fraksi ke-4, 5 dan 6)

F. Setelah filtrasi gel Sephadex G-75 kecepatan elusi 0.3 ml/menit (koleksi fraksi ke-12)

Gambar 2. Elektrofogram enzim linamarase pada SDS-PAGE

Rendemen yang dihasilkan untuk mendapatkan enzim dengan tingkat kemurnian ini sebesar 33,3% dari ekstrak kasarnya. Peningkatan aktivitas spesifik menunjukkan enzim semakin murni. Hasil SDS-PAGE menunjukkan pita protein tunggal dengan berat molekul 41,35 kDa.

### Karakterisasi Linamarase

Aktivitas linamarase dipengaruhi oleh faktor suhu, pH, waktu inkubasi serta konsentrasi substrat. Berdasarkan karakterisasi yang dilakukan, linamarase hasil isolasi optimum pada pH 6,5. Hal ini menunjukkan bahwa pada pH ini enzim membentuk konformasi sisi aktif yang paling tepat untuk mengikat substrat sehingga terbentuk kompleks enzim substrat yang tepat pula dengan menghasilkan produk yang optimum. Setelah diperlakukan dengan berbagai variasi suhu, linamarase aktif pada suhu 57°C dengan aktivitas sebesar 0,135 Unit. Waktu inkubasi yang paling optimum adalah 90 menit.

Dengan menggunakan substrat linamarin yang diisolasi dari umbi gadung berdasarkan metode Petruccioli *et al.* (1999), didapat bahwa konsentrasi linamarin sebesar 12% (v/v) menghasilkan aktivitas optimum sebesar 0,299 Unit.

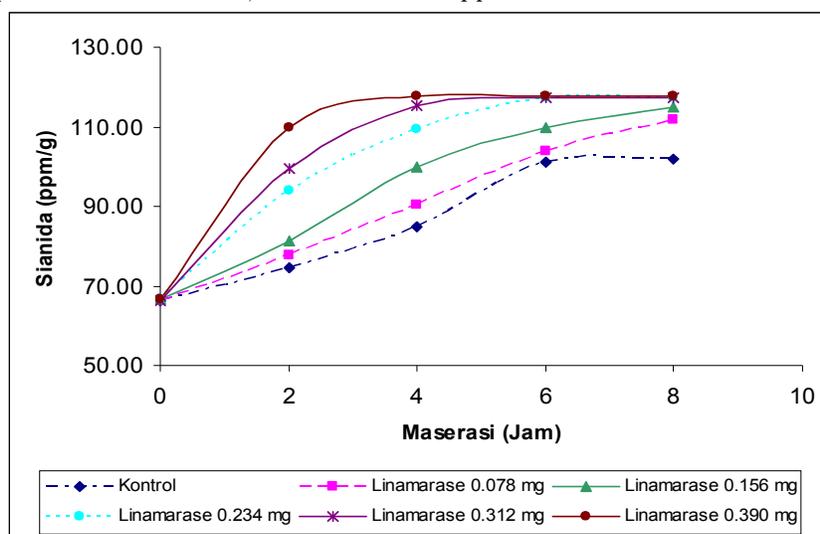
Berdasarkan metode Lineweaver-Burk nilai  $K_m$  didapat 0,1564  $\mu\text{mol/mL}$  sebesar dan  $V_{maks}$  sebesar 0,2796  $\mu\text{mol menit}^{-1}$ .

### Detoksifikasi Sianida pada Bubur Gadung

Kurva kadar sianida pada bubur gadung setelah penambahan enzim linamarase dibandingkan dengan kadar sianida bubur gadung tanpa penambahan enzim linamarase dapat dilihat pada Gambar 2.

Proses pengolahan gadung pada umumnya masih meninggalkan residu sianida dan prekursor sianida yaitu linamarin. Saat mengalami metabolisme linamarin ini masih bisa membebaskan sianida dalam saluran pencernaan sehingga tetap membahayakan kesehatan. Oleh karena itu diperlukan tambahan linamarase eksojenus agar pemecahan terhadap linamarin lebih efektif dan maksimum, tidak meninggalkan residu senyawa nitril atau glu-kosida itu sendiri Gueguen *et al.* (1997).

Pada kontrol atau tanpa penambahan enzim linamarase menunjukkan linamarase endogen gadung mampu bekerja memecah linamarin menjadi sianida. Pada lama maserasi 2 jam terjadi peningkatan kadar sianida dari gadung segar yaitu dari 66.346 ppm menjadi 74.423 ppm.



Gambar 3. Pengaruh penambahan enzim dan lama maserasi terhadap kadar sianida bubur gadung

Pada maserasi 4 dan 6 jam, kandungan sianida masih meningkat menjadi 84,81 ppm kemudian menjadi 100,96 ppm. Penambahan waktu maserasi 2 jam menjadi 8 jam tidak menambah kadar sianida secara signifikan, yaitu 102,89 ppm. Maserasi optimum bagi kerja linamarase endogen serta terekstraknya sianida pada pelarut yaitu 6 jam.

Penambahan linamarase sebanyak 0,078 mg, menunjukkan terjadi peningkatan kadar sianida yang dibebaskan seiring dengan lama maserasi. Akan tetapi pada lama maserasi 8 jam peningkatan kadar sianida yang dihasilkan sebesar 110 ppm, yang menunjukkan bahwa lama maserasi belum cukup untuk membebaskan sianida total dalam bubur gadung. Hal ini tampak dari grafik yang terus naik. Ini menunjukkan bahwa perlu menambah waktu maserasi agar linamarase endogen dan linamarase dengan konsentrasi 0,078 mg bekerja optimum memecah semua linamarin. Fenomena yang sama terjadi sampai penambahan enzim sebesar 0,156 mg.

Terlihat pada Gambar 3 bahwa kadar sianida tampak stabil pada maserasi 4 jam sampai akhir maserasi dengan penambahan linamarase sebanyak 0,390 mg. Ini berarti semua sianida berhasil dibebaskan dari linamarin oleh linamarase endogen dengan bantuan linamarase sebanyak 0,390 mg dalam kurun waktu kurang dari 4 jam. Semakin banyak sianida yang dibebaskan dari glukosida sianogenik maka sianida yang tersisa akan semakin sedikit atau tidak ada sama sekali sehingga gadung yang dikonsumsi lebih aman, bebas dari sianida dan prekursor sianida. Dalam hal ini linamarin sebagai substrat telah habis dihidrolisis. Penelitian Yeoh *et al* (1997) menunjukkan bahwa linamarase hasil isolasi dari daun ubi kayu yang ditambahkan pada tepung ubi kayu mampu menghidrolisis sempurna linamarin pada tepung ubi kayu.

Penambahan linamarase eksogen untuk meningkatkan efektifitas pemecah-

an linamarin pada ubi kayu telah dilakukan oleh Gueguen *et al.*, (1997) menggunakan linamarase *Leuconostoc mesenteroides*. Wedhastri (1991) menambahkan bahwa *Aspergillus* dan *Rhizopus* pada fermentasi koro benguk (*Mucuna pruriens*) dapat menurunkan kadar glukosida sianogenik. Lebih lanjut Gireud *et al.* (1992) menyatakan bahwa penambahan bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* A6 lebih efektif dalam menghidrolisis linamarin dalam jus ubi kayu daripada hanya menambahkan linamarase saja. Petruccioli *et al.* (1999) juga menyebutkan bahwa penambahan *Mucor circinelloides* pada fermentasi ubi kayu akan meningkatkan dan mempersingkat proses detoksifikasi.

## KESIMPULAN

Linamarase dapat diisolasi dari umbi gadung dengan menggunakan pengendapan ammonium sulfat dan filtrasi gel. Aktivitas enzim linamarase gadung optimum pada pH 6,5, suhu 57°C dengan waktu inkubasi 90 menit dan konsentrasi substrat 12%. Nilai  $V_{maks}$  sebesar 0,2796  $\mu\text{mol menit}^{-1}$  dan  $K_m$  sebesar 0,1564  $\mu\text{mol/mL}$ . Berat molekul enzim adalah 41,35 kD. Linamarase yang diisolasi dari umbi gadung dapat digunakan untuk detoksifikasi bubur umbi gadung.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2004. Hydrogen Cyanide and Cyanides: Human Health Aspect. WHO. [www.inchem.org](http://www.inchem.org).
- Anonymous. 2006. Evaluation of Two New Class 1 Substances *Diocorea bulbifera*. Permitted Ingredient List Project Office of Complementary Medicine (TGA) and Medsafe. IJEACCM. New Zealand
- Gireud, E., L. Gosselin, and M. Raimbault. 1992. Degradation of cassava linamarin by lactic acid bacteria. Biotechnology Letters 14(7): 593-598

- Gueguen, P., P. Chemardin, P. Labrot, A. Arnaud, 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, C.A., T. Sanchez, and H.H. Yeoh. 2002. *Cyanogen and linamarase activity in storage roots of cassava plants from breeding program*. Journal Food Composition and Analysis. 15:379-387
- Keresztessy, Z., K. Brown, M.A. Dunn, and M.A. Hughes. 2001. *Identification of essential active-site residue in the cyanogenic  $\beta$ -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-direct mutagenesis*. J. Biochem. 353:199-205
- Mkpong, O.E., H. Yuan, G. Chism, and R.T. Sayre. 1990. *Purification, characterization and localization of linamarase in cassava*. Plant Physiol 93:176-181
- Pambayun, R. dan H. Martini. 2000. *Detoksifikasi HCN pada pengolahan keripik gadung dengan berbagai metoda dan lama pemanasan*. Prosiding Seminar Nasional Makanan Tradisional, Malang
- Pambayun, R. 2000. *Hydrocyanid acid and organoleptic tests on gadung instant rice from various methods of detoxification*. Seminar Nasional Industri Pangan. Jakarta
- Petruccioli, M., L. Brimer, A.R. Cicalini and F. Federici. 1999. *The Linamarase of *Mucor circinelloides* LU M40 and its detoxifying activity on cassava*. Journal of Applied Microbiology 86: 302-310
- Yeoh, H.H., J.H. Bradbury, and S.V. Egan. 1997. *A simple rapid method for isolating cassava leaf linamarase suitable for cassava cyanide determination*. J. Sci Food Agriculture 75: 258-262
- Wedhastri, S. 1991. *Perilaku *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *Rhizopus oligosporus* dan *R. oryzae* pada kadar glukosida sianogenik biji koro benguk (*Mucuna pruriens*, D.C.)*. Tesis. Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta