

PENGEMBANGAN TEKNIK INAKTIVASI ENZIMATIS DAN EKSTRAKSI LINAMARIN DAUN SINGKONG SECARA SIMULTAN MELALUI FOTOBIOEKSTRAKTOR-UV SEBAGAI ANTI KANKER

Mohamad Endy Yulianto^{1*}, Zainal Abidin¹, IndraWaspada², Selvina, Wendi E

¹Jurusan Teknik Kimia Program Diploma, Fakultas Teknik

²Jurusan Informatika, Fakultas MIPA

Jl. Prof Sudarto SH, Pedalangan Tembalang, Semarang 50239

Universitas Diponegoro Semarang

*Email: endy_y@yahoo.com

Abstrak

Riset ini bertujuan untuk mengembangkan skema produksi linamarin dari daun singkong melalui proses inaktivasi enzim linamarase dan dehidrasi osmosis simultan menggunakan teknologi fotobioekstraktor-UV. Parameter-parameter yang diteliti seperti: kecepatan putar pengaduk ditetapkan pada putaran 75 rpm, sedangkan kecepatan putar pisau pencacah sebesar 125 rpm. Jenis drying agent berupa magnesium sulfat, suhu pengering ditetapkan pada 80°C dan voltase sinar UV juga ditetapkan. Variabel bebas berupa rasio pelarut-daun singkong (10:1; 15:1; 20:1; 25:1 % (b/b)), konsentrasi etanol (80; 85; 90; 95%), konsentrasi drying agent (5; 7,5; 10; 12,5 % (b/b)), suhu fotobioekstraktor-UV (25; 30; 35; 40 °C) sebagai fungsi waktu ekstraksi. Setelah proses ekstraksi selesai, ekstrak yang telah terpisah dari padatnya (supernatan) dimurnikan menggunakan karbon aktif. Hasil pemurnian dianalisa kandungan linamarin menggunakan spektrofotometer. Hasil riset menunjukkan semakin besar kecepatan putaran pengaduk, maka fraksi berat linamarin dalam ekstrak semakin tinggi yang berarti semakin banyak linamarin terekstrak. Kenaikan temperatur menyebabkan linamarin yang terekstrak semakin besar. Semakin besar perbandingan pelarut-umpan, linamarin yang terekstrak semakin besar.

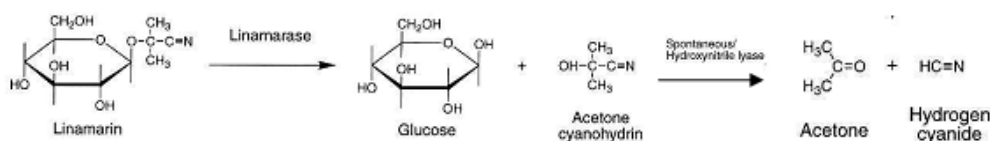
Kata kunci: daun singkong, ekstraksi, fotobioekstraktor-uv, inaktivasi enzim, linamarin

1. PENDAHULUAN

Indonesia sebagai penghasil ubi kayu terbesar ke-3 dunia setelah Brazil dan Thailand dengan luas tanam 1.119.784 hektar dan produktivitas 23.922.075 ton/tahun ubi kayu (BPS, 2012). Potensi pengembangan tanaman singkong di Indonesia sangat prospek. Hal ini disebabkan lahan yang tersedia untuk budidaya ubi kayu cukup luas terutama dalam bentuk lahan di dataran rendah maupun lahan-lahan di dataran tinggi dekat kawasan hutan.

Ubi singkong merupakan tanaman yang memiliki kandungan senyawa cyanogen. Senyawa cyanogen pada singkong berupa senyawa glukosida cyanogen yang terdiri dari linamarin (2-β-D-glucopyranosyloxy-2-methylpropanenitrile) dan lotaustralin ((2R)-2-β-D-glucopyranosyloxy-2-methylbutyronitrile). Linamarin adalah turunan dari valine sedangkan lotaustralin merupakan turunan dari isoleucin (Li, 2010). Rasio linamarin dan lotaustralin pada daun dan ubi singkong sekitar 93:7. Senyawa glukosida cyanogenik pada tanaman singkong sebagian besar terakumulasi pada daun, batang dan kulit ubinya (De Bruijn, 1973).

Senyawa glukosida cyanogenik, dengan adanya enzim linamarase (β glukosidase), akan terhidrolisa menjadi cyanohidrin. Cyanohidrin akan terurai menjadi hidrogen cyanida. Diduga mekanisme tersebut digunakan oleh tanaman singkong dan tanaman lain seperti sorghum untuk mengusir predator (Haque, 2003), mengingat hidrogen cyanida bersifat toksik bagi struktur makhluk hidup. Pada beberapa kasus, konsumsi singkong dengan kandungan senyawa cyanida yang relatif tinggi dapat menyebabkan keracunan hingga kematian (Akintonwa, 1994).



Gambar 1. Reaksi pembentukan hidrogen cyanida dari linamarin

Proses hidrolisa linamarin oleh enzim linamarase terutama terjadi akibat proses mekanis (proses persiapan bahan baku) atau akibat aktivitas mikrobial (proses fermentasi). Hidrolisa linamarin (Gambar 1) terdiri dari dua tahap reaksi yang melibatkan pembentukan senyawa intermediet, yaitu acetonecyanohidrin, yang selanjutnya secara spontan atau oleh aksi dari enzim hydroxynitrilelyase akan membentuk *acetone* dan hidrogen cyanida (Yeoh *et al.*, 1998)

Linamarin memiliki sifat-sifat yang dapat menjadikannya sebagai kandidat yang baik sebagai senyawa antineoplastik (antikanker). Linamarin disebut juga sebagai nitrilosida yang memiliki kandungan vitamin B₁₇ yang diharapkan pada proses hidrolisis dapat menghasilkan senyawa cytotoksik yakni HCN. Sel neoplastik (sel kanker) yang kekurangan akan enzim detoksifikasi (rhodenase) tetapi kaya enzim hidrolase akan terpapar terhadap efek lethal dari cyanida yang dilepaskan oleh linamarin.

Saat ini belum ada metode *recovery* linamarin dari tanaman singkong yang efektif. Kesulitan yang dialami dalam proses produksi linamarin adalah selama proses ekstraksi, dengan rusaknya jaringan, maka linamarin akan dengan segera terhidrolisa menjadi komponen-komponen individualnya yaitu acetocyanohidrin dan glukosa. Proses hidrolisa tersebut diyakini dikatalisasi oleh enzim yang terdapat dalam tanaman itu sendiri yaitu linamarase. Untuk mengatasi hal ini, perlu dicari metode untuk mengekstraksi linamarin dari tanaman pada kondisi dimana aktivitas enzim linamarase minimal atau bahkan hilang. Dengan demikian reaksi hidrolisa linamarin menjadi acetocyanohidrin dan glukosa tidak akan terjadi.

Beberapa metode *recovery* linamarin yang pernah dilakukan antara lain, ekstraksi linamarin secara konvensional, yaitu menggunakan pelarut organik (King dan Bradbury, 1995). Penggunaan pelarut organik (aseton) dan proses pemurnian menggunakan evaporator rotary mengakibatkan yield linamarin yang dihasilkan relatif kecil. Diduga hal tersebut dikarenakan pada penggunaan aseton, ada enzim linamarase yang ikut terekstrak. Akibatnya sebagian enzim linamarase akan mengkatalisis reaksi hidrolisa linamarin menjadi acetocyanohidrin dan glukosa. Selain itu, sebagian linamarin ada yang hilang selama proses evaporasi aseton. Metode lain yang lebih sederhana adalah ekstraksi menggunakan air. Proses konvensional tersebut tidak melibatkan pelarut organik maupun proses evaporasi rotary (*rotatory evaporation*). Akan tetapi, proses hidrolisis pada larutan netral masih tetap terjadi (Haque, 2003). Hal ini, dikarenakan enzim linamarase maupun senyawa linamarin keduanya larut dalam air. Namun demikian, larutan linamarin biasa dibuat dengan menggunakan pelarut asam (Bradbury, 1991).

Pengembangan produksi linamarin pada prinsipnya dilakukan dengan cara menghambat aktivitas enzim hidrolase (Ribnicky dkk., 2006). Oleh karenanya, perlu menela'ah produksi linamarin dari daun singkong melalui teknologi fotobioekstraksi-UV dan dehidrasi osmosis (penambahan *drying agent*) secara simultan untuk inaktivasi enzim linamarase. Modifikasi bioekstraktor berbasis sinar ultra violet berfungsi sebagai inaktivasi enzim linamarase dan pengrusakan sel selular, agar linamarin terekoveri secara maksimal. Pelarut polar akan berfungsi ganda, yaitu inaktivasi enzim sekaligus mengekstrak linamarin. Aktivitas enzim hidrolase diyakini dapat terhambat dengan penambahan senyawa polar seperti etanol (Ribnicky dkk., 2002). Hal ini terjadi karena mekanisme difusi pelarut polar ke dalam daun singkong bertujuan agar enzim linamarase yang berada dalam sitoplasma bepenetrasi dengan etanol, menyebabkan aktivitas enzim linamarase terhambat karena proses *unfolding*. Mekanisme selanjutnya bahwa pelarut etanol akan menyusup menembus dinding membran tonoplast dan terjadi kontak fasa dengan senyawa bioaktif linamarin di zona vakuola. Pelarut polar tersebut kemudian mendifusi ke luar sel daun dengan menyeret linamarin karena perbedaan kelarutan.

Sedangkan penambahan *drying agent* seperti: gelatin, kalsium klorida, dan sodium sulfat berfungsi sebagai pengering secara osmosis, yaitu proses pengambilan air dari suatu bahan yang dilakukan dengan menempatkan bahan pada larutan berkonsentrasi tinggi dimana diantara keduanya terdapat membran semipermeabel. Oleh karenanya akan mereduksi reaksi hidrolisa linamarin menjadi *cyanohidrin*. Hal ini dapat dijelaskan bahwa perpindahan massa air melalui membran semipermeabel dapat berlangsung karena adanya beda potensial kimia antara kedua larutan tersebut, dimana potensial kimia air di larutan encer lebih tinggi daripada potensial kimia air di larutan dengan konsentrasi tinggi. Air dari larutan encer akan mendifusi melalui membran ke larutan yang lebih tinggi konsentrasinya terus menerus hingga tercapai keadaan setimbang. Mengingat sifat membran semipermeabel yang hanya dapat dilewati air dan senyawa dengan berat

molekul kecil maka solut tidak dapat mendifusi melalui membran ke arah sebaliknya. Bilapun ada solut yang mendifusi, perpindahan massa yang terjadi sangat lambat.

Belakangan ini, aplikasi teknologi UV berkembang sangat pesat baik skala rumah tangga maupun skala industri komersial. Sifat oksidator UV yang aman dan tidak toksid, menjadikan UV sebagai desinfektan dalam pengolahan air minum (Gadgil dkk., 1998) dan degradasi komponen organik limbah cair (Moody dkk., 2005), UV juga secara luas digunakan untuk purifikasi dan sterilisasi dalam proses produksi makanan (Sajo dkk., 2008). Penggunaan sinar ultraviolet, juga dikembangkan untuk menginaktivasi enzim dan sekaligus mengekstrak senyawa bioaktif dalam satu ekstraktor (http://www.sineo.cn/en/Products_px.asp?pid=47). Metoda pengrusakan sel secara selular yang diikuti dengan gaya afinitas juga telah dikembangkan secara fisik melalui sinar UV (Penna dan Ishii, 2002). Oleh karenanya, dengan mengembangkan fotobioekstraktor-UV, akan mereduksi reaksi hidrolisis dan meningkatkan perolehan gaultherin, karena sinar UV mampu mendegradasi sel secara selular disamping menginaktivkan enzim.

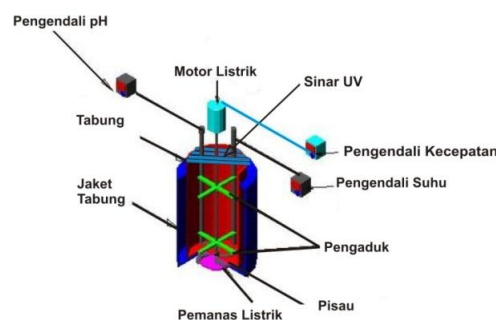
Secara teoritis pengembangan fotobioekstraksi-UV dan *drying agent* secara simultan sangat mungkin untuk diterapkan. Hal ini dikarenakan teknologi ini mampu meringkas tiga tahapan proses sekaligus dalam satu tahap, yaitu: proses inaktivasi enzim linamarase, proses ekstraksi, dan proses dehidrasi osmosis. Untuk itu, skema proses fotobioekstraksi-UV ini diharapkan dapat memberikan sedikitnya lima keuntungan, yaitu (i) enzim linamarase mengalami *unfolding*, akibatnya akan mereduksi reaksi hidrolisa linamarin menjadi *cyanohidrin* yang dikatalisis enzim linamarase, (ii) yield linamarin meningkat, karena degradasi sel selular oleh sinar UV, (iii) kebutuhan energi untuk inaktivasi enzim dan pengambilan linamarin lebih sedikit, (iv) beban pemurnian produk lebih ringan, dan (v) jumlah limbah sedikit. Semua keuntungan ini akan mereduksi biaya produksi. Akan tetapi, permasalahannya adalah bagaimana mengkondisikan supaya laju difusi etanol ke dalam sitoplasma (enzim linamarase) seoptimal mungkin, sehingga dapat memperluas penetrasi pelarut ke sisi aktif enzim disamping mereduksi terseratnya fasa diluen ke fasa kontinyu.

2. METODOLOGI

2.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong diperoleh dari daerah pertanian di Kecamatan Gunungpati Semarang. Bahan lain yang diperlukan seperti pelarut, pH buffer, dan bahan untuk keperluan analisa kadar linamarin diperoleh dari CV. Aneka Kurnia Semarang.

Peralatan utama yang dipakai pada penelitian ini adalah fotobioekstraktor-UV, alat filtrasi, *centrifuge*, *shaker* dan corong pemisah vakum. Alat lain yang diperlukan adalah alat penentuan kadar linamarin berupa spektrofotometer dan GC.



Gambar 2. Alat fotobioekstraktor-UV

2.2 Variabel Proses

Kecepatan putar pengaduk ditetapkan pada putaran 75 rpm, sedangkan kecepatan putar pisau pencacah sebesar 125 rpm. Jenis *drying agent* berupa magnesium sulfat, suhu pengering ditetapkan pada 80°C dan voltase sinar UV juga ditetapkan. Variabel bebas berupa rasio pelarut-daun singkong (10:1; 15:1; 20:1; 25:1 % (b/b)), konsentrasi etanol (80; 85; 90; 95%), konsentrasi *drying agent* (5; 7,5; 10; 12,5 % (b/b)), suhu fotobioekstraktor-UV (25; 30; 35; 40 °C) sebagai fungsi waktu ekstraksi.

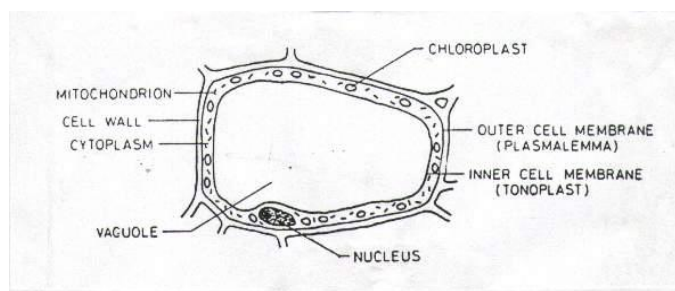
2.3 Prosedur Percobaan

Ekstraksi dilakukan dalam fotobioekstraktor-UV inaktivasi enzim dengan etanol sebagai pelarut. Fotobioekstraktor-UV dilengkapi *blade* atau pisau pencacah dibagian bawah dan dilengkapi sinar UV pada

bagian atas. Umpan (berupa daun singkong) dan pelarut (etanol) yang telah dikondisikan pada temperatur tertentu, dengan perbandingan dan konsentrasi tertentu pula, dimasukkan ke dalam alat fotobioekstraktor-UV. Sebelum umpan dan pelarut dimasukkan ke dalam alat fotobioekstraktor-UV, alat tersebut juga dikondisikan pada temperatur yang diinginkan. pH larutan dalam proses ekstraksi inaktivasi enzimatis dikondisikan dengan penambahan buffer fosfat. Perhitungan waktu ekstraksi ($t = 0$) dimulai ketika pengaduk dan pisau pencacah (dengan putaran tertentu) mulai dijalankan. Proses fotobioekstraktor-UV dilangsungkan dalam jangka waktu sesuai variabel proses. Selama tempuhan, pengambilan sampel dilakukan tiap 3 menit sekali dan ekstraksi dihentikan pada menit ke 30. Setelah proses ekstraksi selesai, padatan kemudian dipisahkan dari ekstrak menggunakan filter atau sentrifugasi. Ekstrak yang telah terpisah dari padatannya (supernatan) dimurnikan menggunakan karbon aktif. Hasil pemurnian dianalisa kandungan linamarin menggunakan spektrofotometer.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

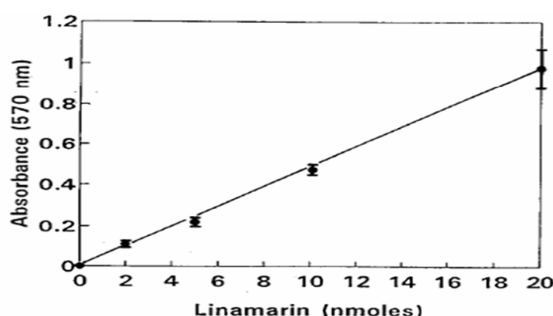
Ekstraksi daun singkong menggunakan senyawa polar berupa etanol berfungsi ganda, yaitu menginaktivkan enzim linamarase dan mengekstrak senyawa aktif linamarin. Difusi etanol ke dalam sel daun singkong (Gambar 3) bertujuan agar enzim linamarase yang berada dalam sitoplasma bepenetrasi dengan pelarut, sehingga menyebabkan aktivitas enzim terhambat. Pernyataan ini juga diungkapkan oleh Poley *et al* (2003) bahwa aktivitas linamarase terhambat dengan penambahan senyawa polar. Mekanisme selanjutnya bahwa pelarut etanol akan menyusup menembus dinding membran tonoplast dan terjadi kontak fasa dengan senyawa aktif linamarin. Pelarut polar tersebut akan mendifusi ke luar sel daun dengan membawa linamarin. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kelarutan.



Gambar 3. Sel daun singkong

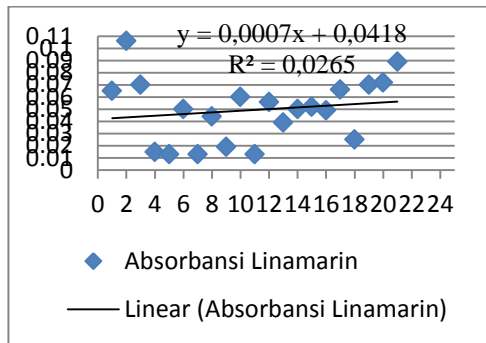
3.1 Penentuan Konsentrasi Linamarin Berdasarkan pendekatan kurva

Gambar 4 menyajikan perolehan senyawa aktif linamarin yang dilakukan oleh Hock- Hin Yeoh, dkk 1994. Hasil ekstraksi dianalisa dengan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 570 nm. Oleh karenanya dengan menggunakan grafik pendekatan pada panjang gelombang 570 nm dari Hock- Hin Yeoh, dkk 1993 sebagai analisa pendekatan empiris, dan yang ditunjang dari data-data analisa laboratorium.



Gambar 4. Grafik linamarin dengan absorbansi dengan pendekatan empiris

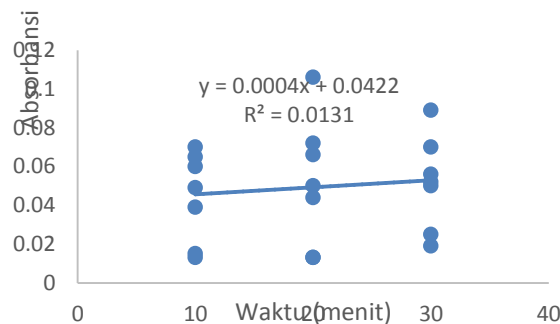
Gambar 5 menyajikan grafik hasil riset hubungan antara absorbansi dan perolehan linamarin. Plot grafik diperoleh dari data-data analisa absorbansi dengan spektrofotometer.



Gambar 5. Grafik hubungan antara Absorbansi 570 nm dengan linamarin

3.2 Pengaruh Kondisi Operasi Terhadap Hasil Ekstraksi

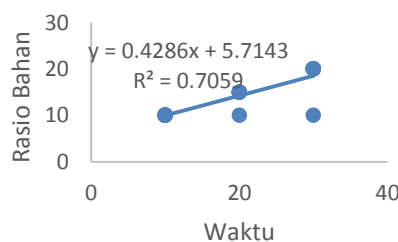
Semakin besar kecepatan putaran pengaduk, maka fraksi berat linamarin dalam ekstrak semakin tinggi yang menunjukkan semakin banyak linamarin terekstrak. Hal ini terjadi karena semakin besar laju putaran pengaduk, semakin kecil ukuran butiran fasa terdispersi, sehingga luas permukaan pindah fasa semakin besar. Disamping itu, semakin besar laju putaran pengaduk, menyebabkan semakin tipis lapisan tahanan perpindahan massa, sehingga koefisien perpindahan massa semakin besar.



Gambar 6. Grafik hubungan antara absorbansi terhadap waktu

Kenaikan temperatur menyebabkan linamarin yang terekstrak semakin besar. Hal ini terjadi karena semakin besar temperatur, difusivitas linamarin semakin besar sehingga koefisien perpindahan massa semakin besar. Hasil penelitian ini sesuai dengan ungkapan Wilke dan Chang (Laddha, 1976), yaitu hubungan difusi terhadap temperatur.

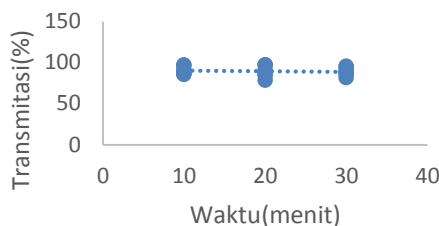
$$D_v = \frac{(117,3 \cdot 10^{-18})(\Phi \cdot M)^{0,5} \cdot T}{\mu \cdot \rho^{0,6}} \tag{1}$$



Gambar 7. Grafik hubungan antara rasio bahan terhadap waktu

Semakin besar perbandingan pelarut-umpan, linamarin yang terekstrak semakin besar. Hal ini terjadi karena memperbesar pelarut berarti memperbesar fasa kontinu, akibatnya fraksi yang terdispersi semakin kecil dan diameter partikel juga mengecil. Dengan mengecilnya diameter partikel, maka akan memperluas kontak antar fasa yang disebabkan semakin meningkatnya solut yang terseret dalam fasa pelarut. Hal ini sesuai dengan korelasi yang diusulkan oleh Mlynek dan Resnick's (1972), yaitu:

$$\frac{d_{32}}{d_1} = 0,058 \cdot (1 + 5,4 \cdot \phi) \cdot Nwe^{-0,6} \tag{2}$$



Gambar 8. Grafik hubungan antara transmitansi terhadap waktu

4. KESIMPULAN

Hasil riset menunjukkan semakin besar kecepatan putaran pengaduk, maka fraksi berat linamarin dalam ekstrak semakin tinggi yang berarti semakin banyak linamarin terekstrak. Kenaikan temperatur menyebabkan linamarin yang terekstrak semakin besar. Semakin besar perbandingan pelarut-umpan, linamarin yang terekstrak semakin besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Akintonwa A, Tunwashe O, Onifade A. 1994. Fatal and nonfatal acute poisoning attributed to cassava-based meal. *Acta Hort.* 375: 285–288.
- BPS. 2012. Indonesia Penghasil Ubi Kayu Terbesar ke-3 Dunia. BPS, Indonesia.
- Bradbury JH, Egan SV, and Lynch MJ. 1991. Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides. *Journal of Science Food and Agriculture.* 55: 277-290.
- De Bruijn GH. 1973. A study of cyanogenic character of cassava. In: B. Nestel and R. MacIntyre Ed., chronic cassava toxicity, proceedings of an interdisciplinary workshop. 29-30 January London. IDRC. Ottawa IDRC-OIOe: 43-48.
- Gadgil A and Garud V. 1998. UV water disinfectant. U.S. Patent No. 5,780,860.
- Haque MR. 2004. Preparation of Linamarin From Cassava leaves for Use in Cassava Cyanide Kit. *Food Chemistry.* 85: 27-29.
- http://www.sineo.cn/en/Products_px.asp?pid=47.
- King NLR, and Bradbury JH. 1995. Bitterness of cassava: identification of a new apiosylglucoside and other compounds that affect its bitter taste. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 68: 223–230.
- Laddha GS, dan Degaleesan TE. 1976. *Transport Phenomena in Liquid Extraction.* Tata Mc Graw Hill Publishing. Tokyo.
- Li J, Li H, Zhu L, Song W, Li R, Wanga D, Dou K. 2010. The adenovirus-mediated linamarase/linamarin suicide system: A potential strategy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 289: 217–227.
- Mlynek Y, and Resnick's W. 1972. Drop sizes in an agitated liquid-liquid system. *AIChE Journal.* 18 (1):122–127.
- Moody KW and Dally JL. 2005. UV wastewater treatment device U.S. Patent No. 7,279,092.
- Poulev, J. M. O'Neal, S. Logendra, R. B. Pouleva, V. Timeva, A. S. Garvey, D. Gleba, I. S. Jenkins, B. T. Halpern, R. Kneer, G. M. Cragg, and I. Raskin. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem.,* Vol. 46, 2542 - 2547.
- Ribnicky, David, Poulev, Alexander, Raskin, and Ilya. 2002. Recovery of gaultherin from plants. U.S. Patents No. 2002/0031562 A1.
- Ribnicky, David, Poulev, Alexander, Raskin, and Ilya. 2006. Methods of administering gaultherin-containing compositions. U.S. Patent No. 7.033.618.
- Sajo G and Toth K. 2008. Germicidal UV reactor and UV lamp. U.S. Patent No. 7,391,041.
- Yeoh HH, and Truong VD. 1993. Quantitative analysis of linamarin in cassava using cassava - glucosidase electrode. *Journal of Food and Chemistry.,* 47: 295-298.
- Yeoh HH, Tatsuma T, and Oyama N. 1998. Monitoring the cyanogenic potential of cassava: the trend towards biosensor development. *Trend in Analytical Chemistry.* 17: 234-240.