

Analisis Penambahan Ion Na dan Ca pada Hidrolisis Pati Singkong (*Manihot esculanta*) untuk Meningkatkan Aktivitas Enzim: Studi Kinetika Hidrolisis

Hargono Hargono*, Bakti Jos, Hantoro Satriadi, Muhammad Fahmi Zakaria

*Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro,
Jl. Prof. Soedarto, SH, Kampus UNDIPTembalang, Semarang, Indonesia 50275*

Abstrak

Singkong manis (Manihot esculanta) merupakan ubi-ubian dengan kandungan pati yang tinggi sehingga dapat diolah untuk menghasilkan gula reduksi melalui proses hidrolisis. Salah satu jenis proses hidrolisis adalah hidrolisis enzimatis. Penambahan ion logam pada hidrolisis enzimatis dapat meningkatkan aktivitas enzim sehingga berpengaruh pada peningkatan konsentrasi gula reduksi. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis penambahan ion Na dan ion Ca terhadap konsentrasi gula reduksi sekaligus mempelajari kinetika hidrolisis. Percobaan dilakukan pada berbagai konsentrasi substrat pati (100, 200, dan 300 g/L), konsentrasi enzim (1 dan 1,5% (b/b)), penambahan ion Na dan Ca masing-masing 60 ppm. Metode hidrolisis yang digunakan pada suhu rendah yaitu 30°C dengan enzim Stargen™ 002 pada pH 4, selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi pati 100-200 g/L mampu meningkatkan produksi gula reduksi secara signifikan pada konsentrasi enzim 1,5% (b/b). Penambahan ion Ca meningkatkan konsentrasi gula reduksi 64% sedangkan penambahan ion Na meningkatkan konsentrasi gula reduksi 18,9%. Konsentrasi gula reduksi terbaik (68,79 g/L) diperoleh pada kondisi konsentrasi pati 200 g/L dan konsentrasi enzim 1,5% (b/b) dengan penambahan ion Ca. Studi kinetika menunjukkan fenomena hidrolisis ini mengikuti persamaan Michaelis-Menten dengan nilai Km 99,183 g/L dan nilai Vmaks berturut-turut 6,053; 8,881; 15,106 g/L.jam sehingga penambahan ion Na dan Ca mampu meningkatkan aktivitas enzim.

Kata kunci: *singkong; hidrolisis enzimatis; penambahan ion Na; penambahan ion Ca; studi kinetika*

Abstract

[Title: The Analysis of Na and Ca Ions Addition on Cassava Hydrolysis on Reducing Sugar Concentration to Increase Enzyme Activity: Hydrolysis Kinetics Study] *Sweet cassava is tuber that contains large amount of starch so that it can produce reducing sugars. The addition of metal ions can increase enzyme activity. The purpose was to study the addition of Na and Ca ions on reducing sugars concentration and to study the hydrolysis kinetics. Experiments were carried out at various concentrations of substrates (100, 200, and 300 g/L), enzyme concentrations (1 and 1.5% (w/w)), addition of Na and Ca ions of 60 ppm. The hydrolysis method was conducted at temperature of 30°C with the enzyme Stargen™ 002 at pH 4, for 24 hours. The results showed that starch concentrations of 100-200 g/L were able to significantly increase the reducing sugars at enzyme concentration of 1.5% (w/w). The addition of Ca ions increased the concentration of reducing sugar by 64% while the addition of Na ions increased it by 18.9%. The best reducing sugar concentration (68.79 g/L) was obtained at starch concentration of 200 g/L and enzyme concentration of 1.5% (w/w) with the of Ca ions. Kinetic studies show that phenomenon follows Michaelis-Menten equation with V_{max} valued of 6.053; 8.881; 15.106 g/L.hour, respectively. So that, addition of Na and Ca ion can increase the enzyme activity.*

*Penulis Korespondensi.

E-mail: hargono@che.undip.ac.id

Keywords: *cassava; enzymatic hydrolysis; addition of Na ions; addition of Ca ions; kinetic studies*

1. Pendahuluan

Hidrolisis pati dapat dilakukan menggunakan metode hidrolisis asam ataupun hidrolisis enzimatis. Hidrolisis enzimatis menunjukkan bahwa produk lebih spesifik dan tidak memerlukan proses lanjutan seperti netralisasi (Bednarska, 2015). Saat ini industri pati menggunakan hidrolisis enzimatis secara konvensional yaitu menggunakan α -amilase dan glukoamilase untuk memperoleh hasil glukosa 95% lebih banyak daripada hidrolisis asam (Hua & Yang, 2016). Hidrolisis secara konvensional memerlukan suhu yang lebih tinggi pada proses likuifikasi (90-125°C) dan pada proses sakarifikasi (55-65°C) (Hargono dkk., 2015). Hal ini mengakibatkan industri harus menambah biaya untuk energi pada proses hidrolisis.

Hidrolisis enzimatis pada suhu rendah dinilai mampu menekan biaya energi pada proses hidrolisis. Proses ini dilakukan menggunakan *granular starch hydrolyzing enzyme* (GSHE) yang tidak memerlukan proses pemanasan (Bialas dkk., 2010). Beberapa peneliti telah melakukan hidrolisis pati menggunakan *granular starch hydrolyzing enzyme* (GSHE) (Szymanowska dkk., 2014). Metode ini menawarkan beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan metode konvensional. Pertama GSHE dapat mengkatalisis dan menghidrolisis polimer pati pada suhu sub-gelatinasi dan tidak membutuhkan aktivator apapun seperti yang biasanya digunakan pada hidrolisis enzim konvensional (Szymanowska dkk., 2014). GSHE menyederhanakan proses produksi gula reduksi dan menghemat konsumsi energi hingga 10-20% (Robertson dkk., 2016). Kedua, metode ini dapat mencegah peningkatan viskositas *slurry* karena proses terjadi pada suhu sub-gelatinasi sehingga kontak antar molekul pati dan air dapat terjadi dengan lebih baik (Robertson dkk., 2016; Uthumporn dkk., 2010; Foerster, 2010; Szymanowska dkk., 2014). Pada proses hidrolisis enzimatis perlu adanya proses *pre-treatment* untuk memaksimalkan aktivitas enzim, aktivitas inhibitor, maupun kinetika hidrolisis.

Metode *pre-treatment* pada hidrolisis enzimatis telah dikembangkan oleh beberapa peneliti terdahulu. Anggraini dkk. (2020) melakukan penelitian parameter kinetika hidrolisis dengan penambahan ion Mg^{2+} pada aktivitas enzim pektinase. Pada konsentrasi enzim 2 - 4 mm, penambahan ion Mg^{2+} bertindak sebagai aktivator. Wang dkk. (2018) melakukan penelitian penambahan ion logam Na, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , dan Co^{2+} pada hidrolisis jerami gandum. Penambahan ion Fe^{3+} memberikan hasil produk terbaik dalam hidrolisis tersebut. $MgSO_4$, $FeSO_4$, dan bahan ion lain dapat meningkatkan konsentrasi gula reduksi pada hidrolisis enzimatis jerami padi (Ren dkk., 2012). Fe^{2+} dan Cu^{2+} mampu mendegradasi jerami padi, sedangkan Mg^{2+} dan Fe^{3+} menghambat hidrolisis enzimatis pada substrat yang sama (Li dkk., 2015). Presecki dkk. (2013) melakukan hidrolisis pati menggunakan campuran enzim amilase dan glukoamilase dengan penambahan ion Ca.

Konversi gula reduksi yang diperoleh sebesar 100%. Penambahan ion Ca secara signifikan meningkatkan produksi gula reduksi dan menjaga stabilitas dari enzim. Gula reduksi dapat diperoleh dari tanaman yang mengandung pati.

Singkong merupakan salah satu jenis tanaman yang berpotensi di daerah tropis (Ikeh dkk., 2012). Secara global, tanaman singkong menempati urutan keenam dan menjadi makanan pokok selama lebih dari 800 juta orang di dunia, terutama di negara tropis (Ladeira dkk., 2013) sedangkan di Indonesia, singkong menempati urutan ketiga makanan pokok terpenting setelah beras dan jagung (Ristono & Amarullah, 2011). Salah satu jenis singkong yang berpotensi di Indonesia adalah singkong manis (*Manihot esculanta*). Singkong manis memiliki kandungan pati yang cukup tinggi yaitu sebesar 78,7 % (b/b) (Hargono dkk., 2017a). Pati singkong manis dapat diolah menjadi gula reduksi melalui proses hidrolisis.

Hargono dkk. (2017b) melakukan penelitian hidrolisis pati menggunakan Enzim Stargen™ 002 pada pati singkong manis, pati singkong pahit, dan pati gadung. Berdasarkan penelitian tersebut, konsentrasi gula reduksi tertinggi dan aktivitas enzim terbaik diperoleh dari pati singkong manis. Pada penelitian ini akan mengkaji lebih lanjut mengenai penambahan ion Na dan ion Ca untuk mampu meningkatkan aktivitas enzim sehingga produksi gula reduksi meningkat.

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh konsentrasi substrat pati singkong manis, konsentrasi enzim Stargen™ 002, dan penambahan ion Na dan Ca terhadap konsentrasi gula reduksi serta dipelajari pula kinetika hidrolisis enzimatis pati singkong tanpa penambahan dan dengan penambahan ion Na dan Ca.

2. Bahan dan Metode

2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah singkong manis (*Manihot esculanta*) berumur 10 bulan, yang berasal Desa Pung Wetan, kecamatan Jatipuro, Kabupaten Karanganyar, Surakarta. Adapun reagen kimia yang digunakan adalah: (1) potasium sodium tartrat tetrahidrat, (2) DNS (3,5-dinitrosalicic acid), (3) sodium hidroksida (Merck, 98%), (4) sodium sulfat (Merck, 98,5%), (5) asam sulfat (Merck, 98,5%), (6) larutan buffer 0,01 M sodium fosfat asam sitrat, (7) glukosa (Merck, 99,5%). Semua reagen dibeli dari Sigma-Aldrich Indonesia. Enzim yang digunakan adalah koktail Stargen™ 002. Enzim ini merupakan enzim campuran dari α -amilase yang berasal dari *Aspergillus kawachi* dalam *Trichoderma reesei* dan glukoamilase dalam *Trichoderma reesei*, dikenal dengan sebutan *granular starch hydrolyzing enzyme* (GSHE). GSHE merupakan enzim generasi kedua yang diproduksi oleh Genencor Internasional, BV (Genencor Internasional di Palo Alto, CA, USA). Aktivitas endo α -amilase dan ekso gluko-amilase secara lengkap menghidrolisis granula pati

dan bekerja secara sinergi untuk menghidrolisis substrat pati menjadi glukosa.

2.2 Metode

2.2.1 Pembuatan Pati Singkong

Pembuatan pati singkong dilakukan secara konvensional, diawali dengan pengupasan kulit pada ubi singkong, dilanjutkan pencucian dan pemarkaran. Hasil parutan ditambah air, selanjutnya dilakukan pemerasan agar pati bisa terekstrak dan terpisah dari ampasnya. Campuran air dan pati dipisahkan menggunakan *centrifuge* Hettich EBA200 agar diperoleh pati dengan kandungan air yang rendah, selanjutnya pati tersebut dikeringkan dengan sinar matahari selama 3 hari berturut-turut sampai kandungan air minimal (Hargono *dkk.*, 2017a).

2.2.2 Pengaruh Konsentrasi Pati Singkong terhadap Konsentrasi Gula Reduksi

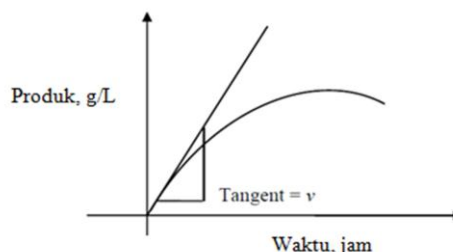
Pati singkong yang telah dibuat kemudian digunakan sebagai substrat pada hidrolisis dengan konsentrasi 100, 200 dan 300 g/L. Penambahan Na⁺ (NaCl) dan Ca²⁺ (CaCl₂) pada masing-masing konsentrasi *slurry* pati kemudian dilakukan inkubasi dalam *shaker* pada kecepatan 100 rpm, selama 10 menit pada pH 4. Untuk menjaga pH, *slurry* dikontrol menggunakan larutan *buffer* 0,01 M *sodium phosphate* asam sitrat. Selanjutnya untuk proses hidrolisis, *slurry* pati singkong manis dipindahkan ke dalam jar tes, ditambahkan Stargen™ 002 sesuai variabel 1 dan 1,5% (b/b) pada suhu 30°C, pH 4, selama 24 jam. Setiap periode waktu 3, 6, 9, 12, 15 dan 18 jam, sampel diambil, dilakukan sentrifugasi selama 4 menit pada putaran 100 Hz. Sampel hasil sentrifugasi yang telah terpisah filtratnya disaring menggunakan kertas saring Whatman CAT 40 No.1440-125 mm, agar diperoleh filtrat yang telah bebas dari padatan. Filtrat kemudian dianalisis untuk menentukan konsentrasi gula reduksi.

2.2.3 Metode Analisis Gula Reduksi

Filtrat hasil hidrolisis kemudian dianalisis konsentrasi gula reduksinya menggunakan metode *dinitrosalicylic acid* (DNS) (Miller, 1959). Reagen terdiri dari larutan 1% 3,5-dinitrosalicylic acid, 0,05% sodium sulfit, 20% sodium-potasium tartrat dan 1% sodium hidroksid ditambahkan pada rasio 3:1 ke dalam sampel dalam tabung reaksi. Larutan ini dikocok dan diinkubasi menggunakan air mendidih selama 8 menit. Sampel kemudian didinginkan menggunakan air es selama 5 menit, sebelumnya mengukur absorbansi pada 570 nm pada spektrofotometer UV/visible (UV-160A, SHIMADZU, Kyoto, Japan). Glukosa murni 0 sampai 10 g/L digunakan sebagai larutan standar. Oleh sebab itu pengukuran konsentrasi gula reduksi ditulis dalam satuan g/L.

2.2.4 Penentuan Kecepatan Awal Reaksi, Vo

Kecepatan awal, Vo dari hidrolisis pati singkong manis ditentukan dari *slope*/kemiringan kurva hubungan



Gambar 1. Penentuan kecepatan reaksi awal, Vo dengan menggambar garis lurus dan bersinggungan pada kurva hidrolisis (Lehninger, 1982).

antara konsentrasi gula reduksi dengan waktu hidrolisis pada awal reaksi. Cara menentukan kecepatan awal, Vo, seperti ditunjukkan dalam Gambar 1.

2.2.5 Penentuan Parameter Kinetika

Karakteristik konstanta V_{maks} dan K_m dapat ditentukan berdasarkan data eksperimen dengan menginkubasi enzim pada berbagai konsentrasi substrat awal [So]. Selanjutnya data-data yang diperoleh dibuat grafik hubungan antara Vo dengan [So]. Linierisasi kurva (garis lurus) dilakukan dengan membuat grafik hubungan antara 1/Vo vs 1/[So]. Nilai *slope* merupakan K_m/V_{maks}, intersep sumbu y adalah 1/V_{maks} dan titik potong kurvadengan sumbu x negatif adalah -1/K_m (Fange *dkk.*, 2011). Persamaan Michaelis-Menten, seperti yang ditunjukkan pada Persamaan 1, adalah persamaan kecepatan bagi suatu reaksi enzimatik satu substrat. Persamaan ini adalah suatu pernyataan mengenai hubungan kuantitatif di antara kecepatan reaksi awal Vo, kecepatan maksimum V_{maks}, dan konsentrasi substrat, semua dihubungkan melalui tetapan Michaelis-Menten, K_m.

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{[S] + K_m} \tag{1}$$

Vo adalah kecepatan reaksi awal, (g/Ljam), V_{maks} adalah kecepatan maksimum, (g/Ljam), [S] adalah konsentrasi substrat, g/L, K_m adalah tetapan Michaelis-Menten. Selanjutnya Persamaan 1 dibuat invers oleh Lineweaver Burk menjadi Persamaan 2.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \tag{2}$$

2.2.6 Penentuan Prosentase Kenaikan Konsentrasi Gula Reduksi

Penambahan ion Na dan Ca diharapkan akan menghasilkan kenaikan konsentrasi gula reduksi terhadap hasil hidrolisis tanpa penambahan ion Na dan

Ca. Presentase kenaikan dihitung menggunakan Persamaan 3.

$$\% \text{Kenaikan} = \frac{C_i - C_0}{C_0} \times 100\% \quad (3)$$

C_i dan C_0 secara berturut-turut adalah konsentrasi gula reduksi dengan penambahan ion Na maupun ion Ca dan konsentrasi gula reduksi tanpa penambahan ion Na maupun ion Ca.

3. Hasil dan Pembahasan

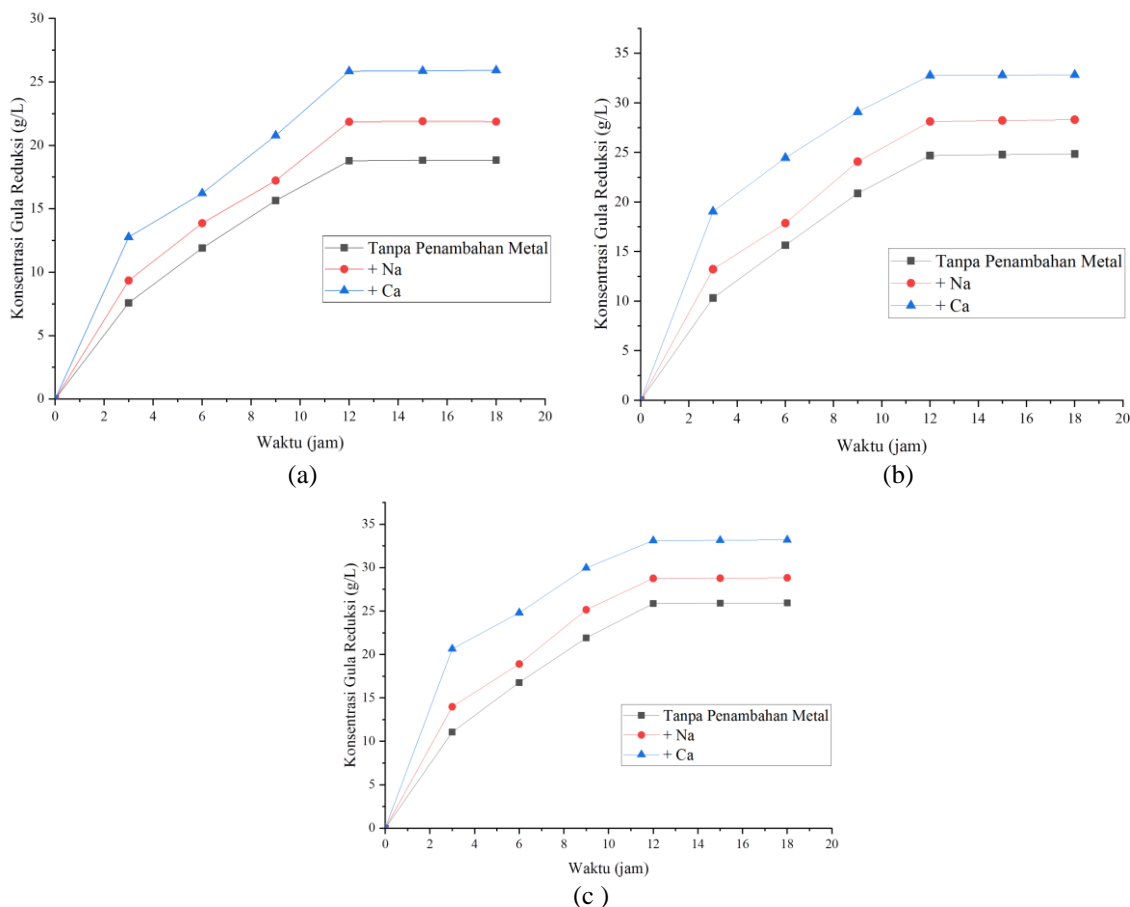
3.1 Pengaruh Penambahan Ion Na dan Ca pada Berbagai Konsentrasi Pati dan Konsentrasi Enzim terhadap Konsentrasi Gula Reduksi

Hidrolisis enzimatis singkong manis (*Manihot esculanta*) dilakukan menggunakan berbagai konsentrasi pati singkong yaitu 100, 200, dan 300 g/L dan berbagai konsentrasi enzim yaitu 1 dan 1,5% (b/b). Pada masing-masing konsentrasi pati dan konsentrasi enzim

dilakukan tanpa *pre-treatment* dan dengan *pre-treatment* penambahan ion Na dan Ca. Pengaruh konsentrasi pati dan penambahan ion Na dan Ca pada konsentrasi enzim 1% (b/b) ditunjukkan pada Gambar 2.

Gambar 2 (a,b dan c) menunjukkan fenomena yang sama dari masing-masing variabel. Konsentrasi gula reduksi meningkat dengan bertambahnya waktu hidrolisis hingga 12 jam kemudian cenderung konstan. Hal ini disebabkan salah satunya karena telah tercapai titik saturasi sehingga enzim sudah tidak mampu lagi mengkonversi pati menjadi gula reduksi (Daniel & Danson, 2013).

Konsentrasi gula reduksi tertinggi yang diperoleh pada konsentrasi pati 100 g/L untuk tanpa penambahan logam, dengan penambahan ion Na^+ , dan penambahan ion Ca^{2+} secara berturut-turut 18,84; 21,87; 25,92 g/L. Konsentrasi gula reduksi tertinggi yang diperoleh pada konsentrasi pati 200 g/L untuk tanpa penambahan logam, dengan penambahan ion Na^+ , dan penambahan ion Ca^{2+} secara berturut-turut 24,85; 28,30; 32,82 g/L. Berdasarkan data tersebut, kenaikan konsentrasi gula



Gambar 2. Pengaruh penambahan ion Na dan ion Ca pada konsentrasi pati: a) 100 g/L, b) 200 g/L, c) 300 g/L terhadap konsentrasi gula reduksi pada hidrolisis menggunakan StargenTM002, konsentrasi 1% (b/b), suhu 30°C

reduksi dari konsentrasi pati 100 g/L ke 200 g/L cukup signifikan. Hal ini disebabkan semakin banyak konsentrasi pati maka semakin banyak substrat yang dikonversi menjadi gula reduksi. Hal ini menandakan bahwa situs aktif enzim masih mampu mengkonversi jumlah substrat yang lebih banyak (Mezule *dkk.*, 2019).

Konsentrasi gula reduksi tertinggi diperoleh pada konsentrasi pati 300 g/L untuk tanpa penambahan logam, dengan penambahan ion Na⁺, dan penambahan ion Ca²⁺ secara berturut-turut 25,92; 28,82; 33,20 g/L. Berdasarkan data tersebut, kenaikan konsentrasi gula reduksi dari konsentrasi 200 g/L ke 300 g/L tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Hal ini disebabkan oleh peningkatan viskositas yang menghambat proses difusi. Selain itu, terdapat kemungkinan terjadi inhibisi akibat konsentrasi substrat yang tinggi (Ruiz *dkk.*, 2011).

Mezule *dkk.* (2019) melakukan hidrolisis dengan konsentrasi substrat 1-10% (b/v). Peningkatan pada konsentrasi substrat hingga 5% (b/v) dapat meningkatkan produk gula reduksi. Pada konsentrasi substrat diatas 5% (b/v) tidak mampu meningkatkan konsentrasi gula reduksi atau cenderung konstan. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan.

Penelitian yang sama juga dilakukan dengan menggunakan konsentrasi pati 100-300 g/L untuk tanpa

penambahan logam dan dengan penambahan ion Na⁺ dan Ca²⁺ menggunakan konsentrasi enzim StargenTM 002 sebesar 1,5% (b/b) seperti disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan fenomena yang disajikan pada Tabel 1, pengaruh gula reduksi terhadap waktu hidrolisis dan konsentrasi pati memiliki kecenderungan yang sama pada penelitian menggunakan konsentrasi enzim sebesar 1% (b/b). Namun demikian, konsentrasi enzim sebesar 1,5% (b/b) menghasilkan peningkatan konsentrasi gula reduksi yang signifikan untuk masing-masing variabel dibandingkan dengan konsentrasi enzim 1% (b/b).

Krajang *dkk.* (2021) melakukan hidrolisis enzimatis pada pati singkong menggunakan enzim StargenTM 002 dengan variasi konsentrasi 0,1 hingga 0,4% (w/v). Hasil produk gula reduksi meningkat seiring bertambahnya konsentrasi enzim yang digunakan yaitu mencapai 78,70 g/L pada konsentrasi enzim 0,4% (w/v). Hal ini disebabkanoleh semakin banyaknya situs aktif yang bekerja (Krajang *dkk.*, 2021).

Konsentrasi gula reduksi setelah diberikan penambahan ion Na⁺ dan ion Ca²⁺ mengalami peningkatan dibandingkan tanpa pemberian ion logam. Prosentase kenaikan konsentrasi gula reduksi terhadap penambahan ion Na⁺ dan ion Ca²⁺ untuk masing-masing variabel disajikan pada Tabel 2.

Penambahan ion logam menunjukkan kenaikan

Tabel 1. Pengaruh penambahan ion Na dan ion Ca pada konsentrasi pati 100 g/L, 200 g/L, dan 300 g/L terhadap konsentrasi gula reduksi menggunakan StargenTM 002, konsentrasi 1,5% (b/b), suhu 30°C.

Waktu (jam)	Konsentrasi Gula Reduksi (g/L)								
	Konsentrasi Pati 100 g/L			Konsentrasi Pati 200 g/L			Konsentrasi Pati 300 g/L		
	Tanpa	+Na	+Ca	Tanpa	+Na	+Ca	Tanpa	+Na	+Ca
3	16,34	20,54	30,52	19,45	28,45	39,90	18,12	30,12	36,12
6	24,16	29,08	35,88	34,22	38,24	48,92	35,65	39,24	42,45
9	28,24	34,64	48,65	40,12	42,56	59,07	41,34	43,56	52,84
12	30,12	40,23	52,44	41,33	49,78	68,32	42,65	50,34	55,60
15	30,34	40,45	52,56	41,89	49,82	68,76	42,70	50,36	55,70
18	30,56	40,54	52,58	41,94	49,86	68,79	42,72	50,40	55,78

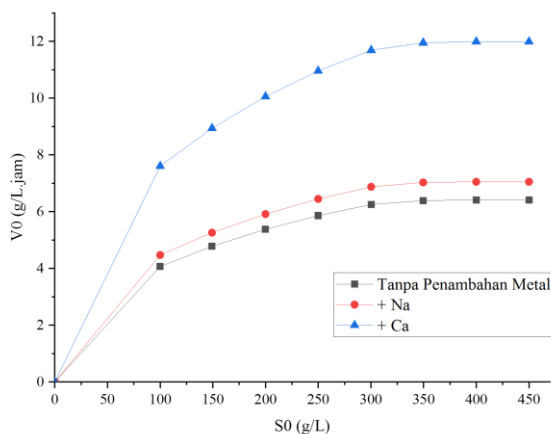
Tabel 2. Prosen kenaikan konsentrasi gula reduksi terhadap penambahan ion Na dan ion Ca pada berbagai konsentrasi pati terhadap konsentrasi gula reduksi pada hidrolisis menggunakan StargenTM 002, konsentrasi 1,5% (b/b), suhu 30°C.

Waktu (jam)	Kenaikan konsentrasi gula reduksi (%)					
	Konsentrasi Pati 100 g/L		Konsentrasi Pati 200 g/L		Konsentrasi Pati 300 g/L	
	+Na	+Ca	+Na	+Ca	+Na	+Ca
3	25,7	86,8	46,3	105,1	66,2	99,3
6	20,4	48,5	11,7	43,0	10,1	19,1
9	22,7	72,3	6,1	47,2	5,4	27,8
12	33,6	74,1	20,4	65,3	18,0	30,4
15	33,3	73,2	18,9	64,1	17,9	30,4
18	32,7	72,1	18,9	64,0	18,0	30,6

konsentrasi gula reduksi yang cukup tinggi seperti ditunjukkan pada Tabel 2. Penambahan ion Ca^{2+} menghasilkan kenaikan konsentrasi gula reduksi yang lebih tinggi dibandingkan penambahan ion Na^+ untuk masing-masing variabel Na^+ yang mampu meningkatkan konsentrasi gula reduksi dan mengaktivasi enzim dengan mengikat air dan residu protein yang sesuai (David *dkk.*, 2016). Zohra *dkk.* (2016) telah melakukan penelitian hidrolisisenzimatis dengan penambahan ion logam monovalen, divalen, dan trivalen. Penambahan ion Ca^{2+} menghasilkan aktivitas enzim tertinggi diantara ion logam lain. Hal ini disebabkan secara umum amilase dikenal sebagai metaloenzim dan mengandung setidaknya satu ion Ca^{2+} sebagai komponen integral untuk meningkatkan aktivitas enzim. Selain itu, untuk menjagakestabilan dan memperpanjang waktu paruh enzim, Ca^{2+} adalah kation yang disukai. -amilase termostabil menggambarkan stabilitas termo yang lebih dengan adanya Ca^{2+} (Zohra *dkk.*, 2016).

Penelitian serupa juga dilakukan oleh Wang *dkk.* (2018). Ia melakukan hidrolisis jerami gandum dengan penambahan ion logam. Hasil yang diperoleh bahwa semakin tinggi muatan ion pada logam tersebut maka semakin tinggi pula aktivitas enzim yang dihasilkan. Namun tidak semua jenis logam dengan muatan yang lebih tinggi dapat bertindak sebagai aktivator (Wang *dkk.*, 2018). Salah satu contohnya adalah ion logam Mg^{2+} . Pada konsentrasi 6-10 mM, ion Mg^{2+} dapat menurunkan aktivitas enzim karena mampu mengikat sisi aktif enzim (Anggraini *dkk.*, 2020).

Ezugwu *dkk.* (2016) melakukan studi aktivitas enzim glukamilase menggunakan beberapa ion logam divalen yaitu Ca^{2+} , Zn^{2+} , dan Fe^{2+} . Penggunaan ion logam ini mampu menahan substrat untuk melakukan interaksi dengan enzim menggunakan bantuan ion hidroksida nukleofilik yang dihasilkan oleh ion logam



Gambar 3. Hubungan konsentrasi substrat awal (S_0) terhadap kecepatan reaksi awal (V_0) pada penambahan ion Na dan ion Ca.

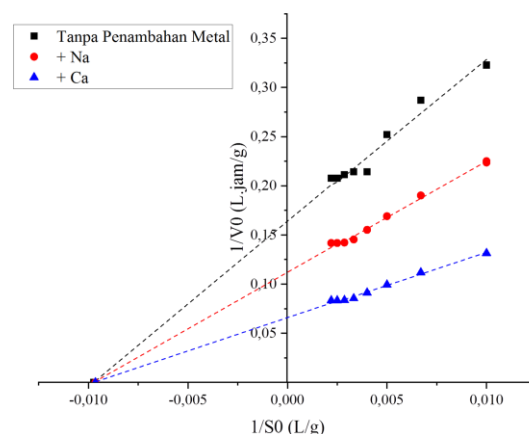
tersebut. Peningkatan aktivitas enzim dengan ion Ca^{2+} , Zn^{2+} , dan Fe^{2+} dapat didasarkan pada kemampuan berinteraksi dengan asam amino bermuatan negatif, seperti asam aspartat dengan menstabilkan muatan negatif yang terbentuk di situs aktif (Carvalho *dkk.*, 2014).

3.2 Parameter Kinetika Hidrolisis Pati Singkong terhadap Penambahan Ion Na dan Ca

Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat pati singkong. Pada penelitian ini digunakan variasi konsentrasi substrat sebesar 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, dan 450 g/L. Kecepatan reaksi awal (V_0) ditentukan menggunakan tangen dari persamaan garis polynomial hubungan waktu terhadap produksi gula reduksi seperti ditunjukkan pada Gambar 1. Kecepatan reaksi awal (V_0) kemudian diplotkan pada grafik untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi substrat (S_0) terhadap kecepatan reaksi awal (V_0) seperti disajikan pada Gambar 3.

Penambahan konsentrasi substrat meningkatkan kecepatan reaksi awal kemudian pada konsentrasi substrat setelah 300 g/L menghasilkan kecepatan reaksi awal yang cenderung konstan. Hal ini sesuai dengan konsep Michaelis-Menten bahwa konsentrasi substrat awal berpengaruh terhadap kecepatan reaksi. Pada kenaikan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi sampai titik tertentu kemudian tidak akan meningkat meskipun ditambahkan substrat yang lebih banyak. Hal ini disebabkan enzim sudah mencapai titik jenuh terhadap substrat dan mencapai kecepatan reaksi maksimum (V_{maks}) sehingga aktivitas enzim tidak dipengaruhi konsentrasi substrat (Vitolo, 2020).

Parameter kinetika hidrolisis singkong dapat ditentukan menggunakan bantuan persamaan hasil



Gambar 4. Hubungan $1/S_0$ terhadap $1/V_0$ pada penambahan ion Na dan ion Ca.

Tabel 3. Parameter kinetika hidrolisis pati singkong terhadap penambahan ion Na dan ion Ca.

	Persamaan Garis	V_{maks} (g/L.jam)	K_m (g/L)
Tanpa	$Y = 16,26 X + 0,1652$	6,053	98,426
+ Na	$Y = 11,17 X + 0,1126$	8,881	99,183
+ Ca	$Y = 6,572 X + 0,0662$	15,106	99,269

linearisasi dari persamaan Michaelis-Menten yaitu menggunakan kurva Lineweaver-Burk seperti ditunjukkan pada Gambar 4. Hubungan antara $1/S_o$ vs $1/V_o$ akan menghasilkan persamaan garis yang mana slope merupakan K_m/V_{maks} dan intercept adalah $1/V_{maks}$. Data kinetika disajikan pada Tabel 3 dan kurva hubungan $1/S_o$ vs $1/V_o$ disajikan pada Gambar 4.

Hasil perhitungan dari kurva Lineweaver-Burk menunjukkan bahwa penambahan ion Na dan ion Ca meningkatkan nilai V_{maks} . Penambahan ion Ca meningkatkan V_{maks} dengan signifikan mencapai 15,106 g/L.jam sedangkan penambahan ion Na meningkatkan nilai V_{maks} hingga 8,881 g/L.jam. Berdasarkan fenomena tersebut keberadaan ion Ca dan ion Na bertindak sebagai aktivator karena mampu meningkatkan nilai V_{maks} . Pada persamaan Michaelis-Menten, penambahan inhibitor dapat menurunkan nilai V_{maks} dan meningkatkan nilai K_m sedangkan penambahan aktivator dapat menurunkan nilai K_m dan meningkatkan nilai V_{maks} (Silverstein, 2019).

Berdasarkan Gambar 4, masing-masing kurva garis lurus berpotongan di satu titik pada sumbu x yang menunjukkan nilai $-1/K_m$ yang berhimpitan. Hal ini menunjukkan pada fenomena ini memiliki nilai K_m yang sama. Fenomena tersebut sesuai dengan persamaan Michaelis-Menten yaitu termasuk dalam jenis non kompetitif. Angraini *dkk.* (2020) melakukan studi kinetika menggunakan penambahan ion Mg^{2+} memperoleh nilai K_m yang sama di satu titik. Hal ini menunjukkan penambahan ion logam mengikuti model Michaelis-Menten jenis non kompetitif.

4. Kesimpulan

Analisa penambahan ion Na dan Ca terhadap hidrolisis pati singkong pada berbagai variasi konsentrasi pati dan konsentrasi enzim telah dilakukan. Penambahan ion Ca menghasilkan peningkatan konsentrasi gula reduksi yang lebih besar dibandingkan penambahan ion Na. Prosen peningkatan konsentrasi gula reduksi tertinggi diperoleh pada kondisi konsentrasi pati 200 g/L dengan konsentrasi enzim 1,5% (b/b) pada penambahan ion Ca 60 ppm dengan hasil konsentrasi gula reduksi sebesar 68,79 g/L. Studi kinetika menunjukkan fenomena hidrolisis ini mengikuti persamaan Michaelis-Menten dengan nilai K_m 99,183

g/L dan nilai V_{maks} berturut-turut 6,053; 8,881; 15,106 g/L.jam sehingga penambahan ion Na dan Ca mampu meningkatkan aktivitas enzim.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro yang telah memfasilitasi penelitian ini di Laboratorium Pengolahan Limbah hingga penelitian ini dapat berjalan dan selesai dengan baik.

Daftar Pustaka

- Angraini, D.P., Sulistiana, D., Agustina, D.K., Ulimaz, A. (2020). Determination of Kinetic Parameters and The Effect of Ion Mg^{2+} Inhibition Into Pectinase Activities. *Jurnal Penelitian dan Pengkajian Ilmu Pendidikan*, 4(2), 112-118.
- Bednarska, K.A. (2015). *Kinetic modelling of enzymatic starch hydrolysis*. Wageningen: Wageningen University Press.
- Bialas, W., Daria, S., Włodzimierz, G. (2010). Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. *Bioresources Technology*, 101, 3126–3131.
- Carvalho, C.C., Ziotti, L.S., Pereira, G.M., Furquim da Cruz, A., Jorge, J.A., Polizeli, M.T.M. (2014). Production and Functional Properties of Free and Immobilized Glucoamylases of *Penicillium citrinum*. *Jacobs Journal of Biotechnology and Bioengineer*, 1(2), 1-10.
- David, W., Gohara, Cera, E.D. (2016). Molecular Mechanisms of Enzyme Activation by Monovalent Cations. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 20840-20848.
- Daniel, R.M., Danson, M.J. (2013). Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. *FEBS Letters*, 587, 2738-2743.
- Ezugwu, A.L., Ottah, V.E., Eze, S.O.O., Chilaka, F.C. (2016). Effect of pH, various divalent metal ion and different substrates on glucoamylase activity obtained from *Aspergillus niger* using amylopectin from tiger nut starch as carbon source. *African Journal of Biotechnology*, 15(21), 980-988.
- Foerster, H. (2010). Granular starch hydrolysis (GSHE) for conversion of grains to ethanol. *Near-term Opportunities for Biorefineries Symposium*. Champaign, IL: Genencor- A Danisco Division.
- Hargono, H., Jos, B., Kumoro, A.C. (2017a). Production of Bioethanol from Sweet and Bitter Cassava Starches by Simultaneous Saccharification and

- Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Advanced Science Letters*, 23, 2427–2431.
- Hargono, H., Jos, B., Kumoro, A.C. (2017b). Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Sweet Cassava Starch, Bitter Cassava, and Gadung (*Dioscorea hispida* Dennst) Flours at Low Temperature. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 12(2), 256-262.
- Hargono, Kumoro, A.C., Jos, B. (2015). Comparative study on the conventional and non-thermal simultaneous saccharification and fermentation of *Manihot glaziovii* root starch. *AIP Conference Proceedings*. (1699) 030013.
- Hua, X., Yang, R. (2016). Enzymes in starch processing. In Chandrasekaran, M. (Ed.) *Enzymes in Food and Beverage Processing*, Boca Raton: CRC Press.
- Ikeh, A.O., Udaeyo, N.U., Udoh, E.I., Iboko, .K.O., Udounang, P.I. (2012). Growth and yield of Cassava (*Manihot esculenta* Crants) as influenced by the number of shoots retained per stand on as Ultisol. *Nature and Science*, 10(8), 17-20.
- Ladeira, T., Souza, H. Pena, R. (2013). Characterization of the roots and starches of three cassava cultivars. *International Journal of Agricultural Science Research*, 2(1), 12-20.
- Li, D.Y., Tian, Y.H., Gong, D.C. (2015). Effects of Metal Ion on the Hydrolysis of Steam-Exploded Straw by Cellulase. *Hubei Agricultural Sciences*, 54(3), 546-549.
- Mezule, L., Berzina, I., Strods, M. (2019). The Impact of Substrate–Enzyme Proportion for Efficient Hydrolysis of Hay. *Energies*, 12(3526), 1-8.
- Presecki, A.V., Blazevic, Z.F., Vasic-Racki, D. (2013). Complete starch hydrolysis by the synergistic action of amylase and glucoamylase: impact of calcium ions. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 36, 1555-1562.
- Ren, T.B., Yin, S.Y., Ma, X.Q., Zhang, L.L., Su, Y., Song, A.D. (2012). The Effect of Chemical Inducers on Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. *Journal of Agro-Environment Science*, 31(1), 206-211.
- Ristonon, Amarullah. (2011). *Singkong Gajah Berjuang* Balikpapan: Petrogas Press.
- Robertson, G.H., Wong, D.W., Lee, C.C., Wagschal, K., Smith, M.R., Orts, W.J. (2016). Native orrrow starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 353-365.
- Ruiz, M.I., Sanchez, C.I., Torres, R.G., Molina, D.R. (2011). Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(12), 2337-2343.
- Silverstein, T.P. (2019). When both Km and Vmax are altered, Is the enzyme inhibited or activated? *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 47(4), 446-449.
- Szymanowska, D.P., Lewandowicz, G., Kubiak, P., Błaszczak, W. (2014). Stability of the process of simultaneous saccharification and fermentation of corn flour. The effect of structural changes of starch by stillage recycling and scaling up of the process. *Fuel*, 119, 328-334.
- Uthumporn, U., Zaidul, I.S., Karim, A. (2010). Hydrolysis of granular starch at subgelatinization suhue using a mixture of amyolytic enzymes. *Food Bioprod Process*, 88, 47-54.
- Vitolo, M. (2020). Brief Review on Enzyme Activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(2), 60-76.
- Wang, S., Lv, M., Yang, J., Zhou, Y., Xu, B. (2018). Effects and Mechanism of Metal Ions on Enzymativ Hydrolysis of Wheat Straw after Pretreatment. *BioResources*, 13(2), 2617-2631.
- Zohra, R.R., Qader, S.A.U., Pervez, S., Aman, A. (2016). Influence of different metals on the activation and inhibition of α -amylase from thermophilic *Bacillus firmus* KIBGE-IB28. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(4), 1275-1278.