

**PERUBAHAN STRUKTUR DAN KINETIKA CAMPURAN ENZIM
SELAMA PROSES HIDROLISIS TEPUNG EMPULUR SAGU
(*Metroxylon sp.*)**

**CHANGES IN STRUCTURE AND KINETICS OF ENZYME
MIXTURES DURING THE HYDROLYSIS PROCESS OF SAGO
PITH FLOUR (*Metroxylon sp.*)**

**SUNRIXON CARMANDO YUANSAH
G032 21 1 003**



**PROGRAM MAGISTER ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**PERUBAHAN STRUKTUR DAN KINETIKA CAMPURAN ENZIM
SELAMA PROSES HIDROLISIS TEPUNG EMPULUR SAGU
(*Metroxylon sp.*)**

**CHANGES IN STRUCTURE AND KINETICS OF ENZYME
MIXTURES DURING THE HYDROLYSIS PROCESS OF SAGO
PITH FLOUR (*Metroxylon sp.*)**

**SUNRIXON CARMANDO YUANSAH
G032 21 1 003**



**PROGRAM MAGISTER ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**PERUBAHAN STRUKTUR DAN KINETIKA CAMPURAN ENZIM
SELAMA PROSES HIDROLISIS TEPUNG EMPULUR SAGU
(*Metroxylon sp.*)**

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan

Disusun dan diajukan oleh

SUNRIXON CARMANDO YUANSAH
G032211003

Kepada

**PROGRAM MAGISTER ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

TESIS
PERUBAHAN STRUKTUR DAN KINETIKA CAMPURAN ENZIM
SELAMA PROSES HIDROLISIS TEPUNG EMPULUR SAGU
(Metroxylon sp.)

SUNRIXON CARMANDO YUANSAH
NIM: G032211003

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Ilmu dan Teknologi
Pangan Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin
pada tanggal 24 Februari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Ir. Amran Laga, MS
NIP. 19621231 198803 1 020

Pembimbing Pendamping



Dr. Pirman, M.Si
NIP. 19631225 198903 1 002

Ketua Program Studi
Ilmu dan Teknologi Pangan S2



Dr. Adiansyah Syarifuddin, S.TP., M.Si
NIP. 19770527 200312 1 001

Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. Ir. Salengke, M.Sc
NIP. 19631231 198811 1 005

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "**PERUBAHAN STRUKTUR DAN KINETIKA CAMPURAN ENZIM SELAMA PROSES HIDROLISIS TEPUNG EMPULUR SAGU (*Metroxylon sp.*)**" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Prof. Dr. Ir. Amran Laga, MS dan Dr. Pirman, M.Si). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 3 Maret 2023



Sunrixon Carmando Yuansah
NIM G032211003

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillah. Segala puji syukur kami panjatkan kepada Allah Subhanahu wa ta'ala yang telah melimpahkan rahmatnya hingga kami dapat sampai di tahap ini. Alhamdulillah, segala keberhasilan yang kami raih semata-mata hanya atas pertolongan Allah SWT. Selama perjalanan kami, Baik suka dan duka dalam penelitian atau saat menempuh studi magister di program studi ilmu dan teknologi pangan Universitas Hasanuddin ini, kami ingin memberikan ucapan terima kasih kepada orang-orang yang berkontribusi langsung maupun tidak langsung dalam perjalanan kami. Ucapan terima kasih kami berikan kepada

1. Orang tua dan saudara-saudari kami yang memberikan dukungan sampai saat ini untuk kami dapat melanjutkan studi magister ini
2. Dosen pembimbing Prof.Dr.Ir.Amran Laga, MS dan Dr. Pirman, M.Si yang berperan sebagai orang tua kami di kampus, memberi dukungan, masukan dari diskusi dan berbagai pengalaman yang membuat kami terasah. Banyak kesempatan yang diberikan kepada kami untuk mengembangkan skill kami yang tidak akan kami dapatkan di tempat lain
3. Para dosen penguji kami, Dr. Adiansyah Syarifuddin, S.TP, M.Si, Dr.rer.nat. Zainal, S.TP, M.FoodTech dan Prof. Dr. Ir. Abu Bakar Tawali yang telah memberikan dukungan dan masukan yang berharga bagi proposal, tesis, maupun studi kedepan kami.
4. Dr. Februadi Bastian, S.TP, M.Si selaku dosen yang menjadi salah satu dosen yang seru diajak diskusi penelitian
5. Teman-teman laboratorium Bioteknologi Pangan, ITP Unhas (bu Ni Luh, kak hasmi, Bintu si bule stress, adek-adek ITP 2018, kak nana, kak nisa, kaki ita, yestray, bu mia) yang membantu kami secara langsung dan tidak langsung dalam penyelesaian penelitian kami
6. Bu Ani kemahasiswaan fakultas yang paling repot mengurus berkas kami
7. Orang-orang seteres yang akan kami sebutkan satu per satu: (kak andi yusniar alis ijhong yang suka membhantu mengeprint)
8. Orang-orang yang mau direpotkan selama ujian akhir kami seperti bu ani cs, desak dan mba jenny
9. Teman-teman Rhizopus oligosporus (kak vano, mba jen, mba riri, mas dian, kak dijah, kak ria, desak, indah)

10. Grup Berhasil Bebas UKT (kakanbertus ijong, kak farah, kak tata, desak dan kak ria) yang banyak membantu dalam pengurusan berkas akhir
11. Para orang baik yang membantu secara langsung maupun tidak langsung yang lupa untuk kami sebutkan

Kami berharap agar karya ilmiah kami dapat dimanfaatkan untuk pengembangan ilmu pengetahuan mendatang. Kami sadar masih banyak kekurangan dalam penelitian dan penulisan tesis ini. Oleh sebab itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan.

Makassar, 3 Maret 2023

Sunrixon Carmando Yuansah, S.TP

RIWAYAT HIDUP

Sunrison Carmando Yuansah yang biasa dipanggil Rixon, dilahirkan di Palembang pada tanggal 30 Desember 1998. Beberapa pendidikan formal yang telah ditempuh adalah seperti SD HARAPAN, Sungailiat, Kepulauan Bangka Belitung (2004-2010), SMP HARAPAN, Sungailiat, Kepulauan Bangka Belitung (2010-2013), SMA NEGERI 1 Sungailiat, Kepulauan Bangka Belitung (2013-2016), dan S1 Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Hasanuddin (2016-2020).

Pada tahun 2021, penulis melanjutkan studi di program magister Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Hasanuddin. Beberapa penelitian yang telah dilakukan oleh penulis seperti “Produksi Gula Sehat dari Jerami Padi Menggunakan Isolat Enzim Termotabil (2019)”, “Optimalisasi Proses Likuifikasi dan Sakarifikasi Tepung Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L.) pada produksi Gula Cair Fungsional Menggunakan Enzim Xilanase dan Mannnase (2019-2020)”, dan “Perubahan Struktural dan Kinetika Enzim Campuran Selama Proses Hidrolisis Enzimatis Tepung Empulur Sagu (*Metroxylon* sp.) (2022-2023)”. Penulis juga telah mendaftarkan beberapa HaKI dalam bentuk [Paten] dengan judul “Proses Produksi Gula Cair dari Bahan Baku Jerami padi (*Oryza sativa*) menggunakan Enzim Termotabil dari Isolat Bakteri Selulolitik-Hemiselulolitik Termofilik dari Jerami Padi (*Oryza sativa*) (IDP000083402) bersama Prof. Dr. Amran Laga, Darmawan, S.TP, dan Nurdian Fitriana, S.TP, serta Paten Sederhana berjudul “Proses Produksi Gula Cair Fungsional dengan Menghidrolisis Komponen Pati dan Hemiselulosa secara Enzimatik dari Bahan Baku Tepung Ubi Jalar Ungu (IDS000005032) bersama Prof. Dr. Ir. Amran Laga, MS, Dr. Ir. Adiansyah Syarifuddin, S.TP., M.Si, dan Muhpidah, S.TP., M.Si.

ABSTRAK

SUNRIXON CARMANDO YUANSAH. **Perubahan Struktur dan Kinetika Campuran Enzim Selama Proses Hidrolisis Tepung Empulur Sagu (*Metroxylon sp.*)**. (dibimbing oleh Amran Laga dan Pirman)

Empulur sagu mengandung komponen polisakarida dan fenolik yang dapat berperan sebagai bahan baku pembuatan gula cair akan tetapi fenolik dapat menjadi inhibitor enzim α -amilase, xilanase, mannanase, dan selulase. Untuk menghasilkan gula cair yang optimal perlu diketahui faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perubahan struktur empulur sagu selama proses *pretreatment*, kontribusi enzim α -amilase, xilanase, mannanase, dan selulase terhadap hidrolisis empulur sagu, efek penghambatan dari senyawa fenolik, kinetika enzim, efisiensi katalisis dan model penghambatan yang terjadi pada campuran enzim. Proses produksi diawali dengan pemisahan senyawa fenolik dan *pretreatment* empulur sagu kemudian dilanjutkan dengan tahap likuifikasi dan sakarifikasi dengan enzim. Kinetika enzim dan model penghambatan dianalisis pada tahap berikutnya. Hasil yang didapatkan pada proses *pretreatment* adalah perubahan atau terbukanya struktur pati dan dinding sel serta terjadi penurunan kekuatan ikatan hidrogen. Komposisi kimia tepung empulur sagu mengalami perubahan seperti selulosa (9,20% menjadi 5,84%), hemiselulosa (43,81% menjadi 73,36%), lignin (0,91% menjadi 0,96%) dan pati (39,89% menjadi 17,58%). Total fenolik dari ekstrak kasar didapatkan adalah 2,732 mg GAE/g. Tepung empulur sagu diinkubasi dengan xylanase selama 156 jam menghasilkan gula reduksi sebesar 1,62 g/L. Waktu likuifikasi yang diperpanjang sampai 168 jam tidak memberikan perbedaan gula reduksi yang signifikan sedangkan pada proses sakarifikasi dapat ditingkatkan melebihi 3 hari. Hidrolisis dengan mannanase mengakibatkan penurunan pH paling signifikan pada tahap likuifikasi yaitu 5,10. Model penghambatan ekstrak kasar fenolik diduga inhibitor unkompetitif ditandai dengan efisiensi katalisis meningkat dari 5,6117 menjadi 8,4175 dan terjadi penurunan K_m dan V_{max} . Kesimpulan dari penelitian ini adalah proses *pretreatment* mengakibatkan perubahan struktur dari empulur sagu. Inkubasi dengan xylanase 200 U/g selama 156 jam memiliki kontribusi terhadap peningkatan gula reduksi paling signifikan. Ekstrak kasar fenolik empulur sagu diduga inhibitor unkompetitif bagi campuran enzim ditandai dengan perubahan nilai K_m ($3,8 \times 10^{-3}$ ppm menjadi $2,2 \times 10^{-3}$ ppm) dan V_{max} (12,76 ppm/jam menjadi 11,11 ppm/jam).

Kata kunci: empulur sagu, inhibitor, kinetika enzim, gula cair, struktur

ABSTRACT

SUNRIXON CARMANDO YUANSAH. **Changes in Structure and Kinetics of Enzyme Mixtures During the Hydrolysis Process of Sago Pith Flour (*Metroxylon* sp.)**. (supervised by Amran Laga and Pirman)

Sago pith contains polysaccharides and phenolics which can be utilized as raw materials for liquid sugar production, but phenolics inhibit α -amylase, xylanase, mannanase and cellulase. To produce optimal liquid sugar, it is necessary to know the factors influencing enzymes. This study aimed to analyze the changes of sago pith's structure during the pretreatment, the contribution of enzymes, enzyme kinetics, catalytic efficiency, inhibition effect and model that occur in mixed enzymes. The production begins with the separation of phenolic compounds and pretreatment of sago pith, followed by enzymatic liquefaction and saccharification. Enzyme kinetics and inhibition models were then analyzed in the next step. The findings revealed that in the pretreatment opened the structure of starch and cell walls. The strength of hydrogen bonds decreased. The composition of sago pith flour changed during pretreatment; cellulose (9.20% to 5.84%), hemicellulose (43.81% to 73.36%), lignin (0.91% to 0.96%) and starch (39.89% to 17.58%). The total phenolic content of the crude extract was 2,732 mg GAE/g. Sago pith flour incubated with xylanase for 156 hours produced 1.62 g/L reducing sugar. Extending the process to 168 hours didn't give a significant difference in reducing sugars, while the saccharification could be increased beyond 3 days. Mannanase produced the lowest suspension pH (pH 5.10) during liquefaction. The inhibition model of sago pith crude extract predicted as an uncompetitive inhibitor, and the catalytic efficiency increased from 5.6117 to 8.4175. This study concludes that the pretreatment resulted in structure changes in sago pith. Xylanase 200 U/g incubated for 156 hours has the highest contribution for reducing sugar. Sago pith crude extract (total phenolic 10 μ g/mL) is an inhibitor for mixed enzymes resulting in changes in Km values (3.8×10^{-3} ppm to 2.2×10^{-3} ppm) and Vmax (12.76 ppm/hour to 11.11 ppm/hour).

Keywords: enzyme kinetics, inhibitor, liquid sugar, sago pith, structure

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERYATAAN PENGAJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN TESIS	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RIWAYAT HIDUP	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Kandungan Empulur Sagu (<i>Metroxylon sp.</i>) dan Produk Pangan Turunannya.....	3
2.2 Potensi Serat dan Senyawa Fenolik Empulur Sagu Dalam Produksi Gula Cair	4
2.3 Senyawa Fenolik Empulur Sagu dan Penghambatannya Terhadap Enzim.....	5
2.4 Enzim-Enzim yang Digunakan Pada Proses	5
2.4.1 Enzim α -Amilase.....	5
2.4.2 Enzim Amiloglukosidase	6
2.4.3 Enzim Selulase	6
2.4.4 Enzim Xilanase	6
2.4.4 Enzim Mannanase	7
2.5 Separasi Senyawa Fenolik Empulur Sagu	7
BAB III METODE PENELITIAN.....	9
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	9
3.2 Alat dan Bahan	9
3.3 Prosedur Penelitian.....	9
3.3.1 Pemisahan Senyawa Fenolik dan <i>Pretreatment</i> Empulur Sagu.....	9

3.3.2	Kontribusi Enzim-Enzim pada Proses Likuiifikasi dan Sakarifikasi Tepung Empulur Sagu	10
3.3.3	Kinetika Campuran enzim dan Model Penghambatan Senyawa Fenolik Empulur Sagu Selama Hidrolisis Enzimatis.....	10
3.4	Desain Penelitian	12
3.5	Parameter Penelitian.....	14
3.1.1	Pengukuran Total Fenolik.....	14
3.1.2	Pengukuran Lignoselulosa	14
3.1.3	Persen Recovery.....	15
3.1.4	Analisis Perubahan Struktur Mikroskopis	15
3.1.5	Analisis Spektrum menggunakan FTIR	15
3.1.6	Pengukuran pH	15
3.1.7	Penentuan Kadar Pati	15
3.1.8	Analisis Gula Pereduksi Metode DNS	15
3.1.9	Kinetika Campuran enzim dan Model Penghambatan Senyawa Fenolik Empulur Sagu Terhadap Enzim yang Digunakan dalam Proses Hidrolisis Tepung Empulur Sagu	16
3.1.10	Efisiensi Katalisis	17
3.6	Analisis Data	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		18
4.1	Perubahan kandungan pati dan lignoselulosa selama proses pretreatment empulur sagu (<i>Metroxylon</i> sp.).....	18
4.2	Ekstraksi senyawa fenolik empulur sagu (<i>Metroxylon</i> sp.).....	19
4.3	Perubahan struktur empulur sagu (<i>Metroxylon</i> sp.) selama proses pretreatment.....	20
4.3.1	Penggambaran Mikroskopis selama proses pretreatment.....	20
4.3.2	Analisis FTIR selama proses pretreatment	21
4.4	Perubahan gula reduksi dan derajat keasaman selama proses likuifikasi dan sakarifikasi tepung empulur sagu (<i>Metroxylon</i> sp.) menggunakan beberapa jenis enzim	22
4.5	Kinetika campuran enzim selama proses hidrolisis dan kinetika penghambatan dari senyawa fenolik tepung empulur sagu	26
BAB V PENUTUP		31
5.1	Kesimpulan	31
5.2	Saran	31
DAFTAR PUSTAKA.....		32
LAMPIRAN		37

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kadar pati dan total fenolik pada empulur sagu dan ekstrak fenoliknya	19
Tabel 2. Kinetika enzim campuran dan efisiensi katalisis pada substrat	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur lignoselulosa dan penyebaran senyawa fenolik dalam sel	3
Gambar 2. Pemisahan senyawa fenolik dan proses pretreatment empulur sagu	11
Gambar 3. Proses likuifikasi dan sakarifikasi tepung empulur sagu dengan dan tanpa penambahan ekstrak senyawa fenolik sagu.....	12
Gambar 4. Kinetika campuran enzim dan penghambatan senyawa fenolik saat hidrolisis enzimatis tepung empulur sagu	12
Gambar 5. Kandungan dan persen recovery sebelum dan setelah proses pretreatment empulur sagu.....	19
Gambar 6. Penggambaran mikroskopis empulur sagu (a) pembesaran 40x dan (b) 100x granula pati dan dinding sel sagu sebelum pretreatment; (c) pembesaran 100x dan (d) 400x granula pati sagu utuh sebelum proses pretreatment; (e) pembesaran 100x dan (f) 400x granula pati setelah proses pretreatment	20
Gambar 7. Spektra FTIR pada empulur sagu sebelum dan sesudah proses pretreatment.....	21
Gambar 8. Interaksi jenis enzim dan waktu likuifikasi tepung empulur sagu terhadap konsentrasi gula reduksi.....	22
Gambar 9. (a) Pengaruh tunggal jenis enzim; (b) pengaruh tunggal waktu sakarifikasi tepung empulur sagu terhadap konsentrasi gula reduksi	24
Gambar 10. (a) Pengaruh tunggal jenis enzim; (b) pengaruh tunggal waktu likuifikasi tepung empulur sagu terhadap derajat keasaman.....	25
Gambar 11. Pengaruh tunggal waktu sakarifikasi tepung empulur sagu terhadap derajat keasaman.....	26
Gambar 12. Perubahan konsentrasi produk gula reduksi berdasarkan penambahan konsentrasi substrat selama proses hidrolisis enzimatis tepung empulur sagu (a) tanpa penambahan (b) dengan penambahan senyawa fenolik 10 µg/mL (ekstrak kasar 0,0037 g/mL)	28
Gambar 13. Kinetika campuran enzim α -amylase 0,0198% + xylanase 0,0396% pada substrat tepung empulur sagu tanpa dan dengan penambahan senyawa fenolik 10µg/mL (ekstrak kasar 0,0037 g/mL)	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel hasil pengamatan gula reduksi selama proses likuifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim	37
Lampiran 2. Tabel rataan hasil pengamatan gula reduksi selama proses likuifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim	38
Lampiran 3. ANOVA hasil pengamatan gula reduksi selama proses likuifikasi tepung empulur sagu.....	39
Lampiran 4. Uji lanjut pengaruh tunggal enzim terhadap gula reduksi pada proses likuifikasi dengan beberapa jenis enzim.....	39
Lampiran 5. Uji lanjut pengaruh tunggal waktu terhadap gula reduksi pada proses likuifikasi	40
Lampiran 6. Uji lanjut interaksi jenis enzim dan waktu terhadap gula reduksi pada proses likuifikasi	41
Lampiran 7. Tabel hasil pengamatan gula reduksi selama proses sakarifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim	45
Lampiran 8. Tabel rataan hasil pengamatan gula reduksi selama proses sakarifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim	45
Lampiran 9. ANOVA hasil pengamatan gula reduksi selama proses sakarifikasi tepung empulur sagu.....	46
Lampiran 10. Uji lanjut pengaruh tunggal jenis enzim terhadap gula reduksi pada proses sakarifikasi	46
Lampiran 11. Uji lanjut pengaruh tunggal waktu terhadap gula reduksi pada proses sakarifikasi.....	47
Lampiran 12. Tabel hasil pengamatan pH selama proses likuifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim.....	47
Lampiran 13. Tabel rataan hasil pengamatan pH selama proses likuifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim	49
Lampiran 14. ANOVA hasil pengamatan derajat keasaman selama proses likuifikasi tepung empulur sagu.....	49
Lampiran 15. Uji lanjut pengaruh tunggal jenis enzim terhadap derajat keasaman selama proses likuifikasi tepung empulur sagu.....	50
Lampiran 16. Uji lanjut pengaruh tunggal waktu terhadap derajat keasaman selama proses likuifikasi tepung empulur sagu.....	50
Lampiran 17. Tabel hasil pengamatan pH selama proses sakarifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim.....	51
Lampiran 18. Tabel rataan hasil pengamatan pH selama proses sakarifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim	52
Lampiran 19. ANOVA hasil pengamatan pH selama proses sakarifikasi tepung empulur sagu menggunakan beberapa jenis enzim.....	52
Lampiran 20. Uji lanjut pengaruh tunggal jenis enzim terhadap derajat keasaman selama proses sakarifikasi tepung empulur sagu.....	52
Lampiran 21. Uji lanjut pengaruh tunggal waktu terhadap derajat keasaman selama proses sakarifikasi tepung empulur sagu.....	53
Lampiran 22. Tabel hasil pengamatan penambahan produk selama proses hidrolisis enzimatis	53
Lampiran 23. Tabel kinetika enzim selama proses hidrolisis enzimatis	55

Lampiran 24. Gambar kinetika campuran enzim dalam plot Michaelis-Menten ..	55
Lampiran 25. Gambar kinetika campuran enzim dalam plot Lineaweaver-Burk .	55
Lampiran 26. Dokumentasi penelitian	56

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Empulur sagu merupakan bagian inti dari batang tanaman sagu (*Metroxylon sp.*) yang mengakumulasi komponen pati berkisar 20,1-41,4% bk sesuai dengan fase pertumbuhannya. Empulur sagu juga memiliki kandungan selulosa (6,6-23% bk), hemiselulosa (3,3-9,2% bk), lignin (9,6-22,1% bk) dan total fenolik (2,83 – 42,76 mg GAE/g) (Duque et al. 2018; Ehara et al. 2018; Linggang et al. 2012; Pei-Lang et al. 2006; Yahya et al. 2011). Kandungan serat empulur sagu tersusun dari selulosa dan hemiselulosa yang dapat hidrolisis menjadi oligosakarida (xilooligosakarida (XOS) dan selooligosakarida (COS)), disakarida (selobiosa dan sukrosa) serta monosakarida (glukosa, xilosa dan arabinosa). Monosakarida seperti xilosa telah diteliti secara *in vitro* dan *in vivo* berpotensi menghambat beberapa jenis enzim pencernaan, memperbaiki respon insulin dan menurunkan kadar gula darah (Kim et al., 2016; Shi dan Yin, 2017) sedangkan oligosakarida seperti xilooligosakarida (XOS) berperan sebagai prebiotik karena secara selektif menstimulasi pertumbuhan bakteri bermanfaat seperti *Bifidobacteria* dan *Lactobacilli* (Saville dan Saville, 2018). Pati sagu memiliki kandungan senyawa fenolik (2,83-42,76 mg GAE/g) yang diidentifikasi sebagai DL-epikatekin, D-katekin dan prosianidin. DL-epikatekin dan D-katekin merupakan komponen fenolik yang bertanggung jawab dalam pembentukan pigmen akibat oksidasi enzimatik (Konuma et al., 2013; Duque et al., 2018). Komponen-komponen dari empulur sagu ini memiliki potensi untuk dikembangkan dalam produksi gula cair.

Enzim α -amilase dan amiloglukosidase (AMG) umumnya digunakan dalam proses biokonversi pati menjadi gula sedangkan untuk memanfaatkan komponen serat dibutuhkan enzim pendegradasi dinding sel seperti selulase, xilanase dan mannanase. Pemanfaatan enzim-enzim ini perlu memperhatikan berbagai faktor seperti jenis enzim, konsentrasi substrat, dan inhibitor lainnya. Struktur alami dari dinding sel tanaman dapat menghambat kerja enzim sehingga untuk meningkatkan aktivitas enzim diterapkan beberapa satuan proses termasuk proses *pretreatment*. Selain itu, inhibitor pada empulur sagu seperti komponen fenolik dapat mempengaruhi kinetika enzim yang digunakan dalam proses sakarifikasi (Ximenes et al., 2010; Rohn et al., 2002; Marco et al., 2015; Simsek et

al., 2015). Pada proses *pretreatment* ini, struktur dinding sel dihancurkan dan senyawa fenolik diminimalkan keberadaannya pada substrat.

Kandungan fenolik yang tinggi pada empulur sagu dapat memberikan efek antioksidan pada gula cair yang dihasilkan apabila dapat dipertahankan pada saat proses (Bujang, 2018; Duque *et al.*, 2018), akan tetapi senyawa fenolik dapat menghambat enzim yang digunakan pada proses hidrolisis. Beberapa penelitian membuktikan senyawa fenolik dapat menghambat kerja enzim α -amilase, xilanase (Mathibe *et al.*, 2020), manannase (Marco *et al.*, 2015) dan selulase (Ximenes *et al.*, 2010). Oleh karena itu, perlu dikaji kinetika enzim yang digunakan dalam produksi gula cair dari tepung empulur sagu, model penghambatan senyawa fenolik terhadap campuran enzim dan efisiensi katalisis dari campuran enzim yang digunakan dalam proses hidrolisis tepung empulur sagu

1.2 Rumusan Masalah

Pembuatan gula cair dari tepung empulur sagu memanfaatkan kandungan pati, serat dan senyawa fenoliknya. Proses produksi gula cair dirancang untuk menghasilkan rendemen yang optimum dengan komponen fungsional tetap terjaga. Kandungan pati dan serat dihidrolisis dengan enzim sedangkan senyawa fenolik ingin dipertahankan pada proses untuk menghasilkan gula cair yang memberikan rasa manis dan efek kesehatan. Kandungan fenolik empulur sagu berpotensi sebagai antioksidan akan tetapi dapat juga menghambat kerja enzim. Perlu diketahui bagaimana penghambatan akibat keberadaan senyawa fenolik terhadap produksi gula cair dari tepung empulur sagu.

1.3 Tujuan Penelitian

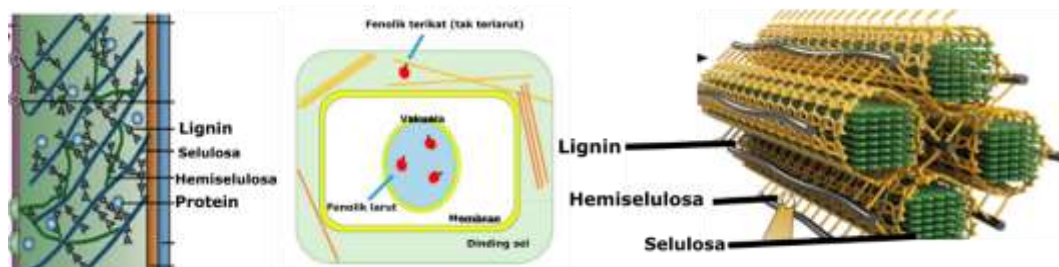
1. Untuk menganalisis perubahan struktur empulur sagu selama proses *pretreatment* steam uap bertekanan
2. Untuk menganalisis kontribusi α -amilase, xylanase, mannnase, dan selulase pada proses hidrolisis tepung empulur sagu
3. Untuk menganalisis kinetika enzim, efisiensi katalisis dan model penghambatan dari ekstrak kasar terhadap campuran enzim yang digunakan dalam proses hidrolisis dari tepung empulur sagu

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kandungan Empulur Sagu (*Metroxylon sp.*) dan Produk Pangan Turunannya

Empulur sagu merupakan bagian inti dari batang tanaman sagu (*Metroxylon sp.*) yang digunakan tanaman ini untuk menyimpan cadangan pati. Pati yang disimpan memiliki bentuk granula oval/elips atau berbentuk seperti lonceng dengan ukuran 10-65 μ m (Ehara *et al.*, 2018; Manthey, 2016). Empulur mengakumulasi pati sebesar 20,1-41,4% bk dengan karakter titik gelatinisasi pada suhu 60°C (Pei-Lang *et al.*, 2006; Ehara *et al.*, 2018). Granula pati sagu tersusun dari amilosa sebesar 27% (Manthey, 2016). Selain itu, empulur memiliki kandungan polisakarida non-pati (79,88% bk), lignin (9,6-22,1% bk) dan komponen fenolik (0,2-0,9% bk) (Pei-Lang *et al.*, 2006). Penelitian Duque *et al.*, (2018) menunjukkan kadar pati yang lebih tinggi pada tepung empulur sagu yaitu berkisar 64,67-96.62%. Total polifenol, IC₅₀, dan FRAP dari tepung empulur sagu berturut-turut 2,83-42,76 mg GAE/g, 2,22-3,06 mol vit.E ekuivalen/g, dan 0,84-17,49 mmol Fe(II)/g.

Selain berperan menyimpan cadangan pati, empulur sagu juga memiliki kandungan lignoselulosa yang menyusun dinding sel dari jaringan empulur. Lignoselulosa ini merupakan polimer kompleks yang tersusun dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Dalam komponen lignoselulosa, terdapat komponen lain yang dapat berikatan secara lemah ataupun terperangkap dalam matriks lignoselulosa. Salah satunya adalah asam fenolik. Senyawa asam fenolik dapat menjadi bentuk terlarut yang terakumulasi di vakuola ataupun dalam bentuk tak larut yang berikatan dengan struktur (Gambar 1).



Gambar 1. Struktur lignoselulosa dan penyebaran senyawa fenolik dalam sel

Beberapa produk pangan dari turunan sagu seperti pati sagu memiliki kandungan serat pangan larut sebesar 77% yang mana 73,7% adalah pati. Serat pangan tak larut (selulosa, hemiselulosa dan lignin), protein dan lemak kasar berturut-turut 4%, 2,4% dan 0,3%. Hasil hidrolisis dari pati sagu ini menghasilkan glukosa (42,8%), xilosa (5,4%), selobiosa (2,3%), sukrosa (1,3%), maltose (23,5%) dan oligosakarida tak terhidrolisis (24,7%) (Dwiarti et al. 2007). Produk pangan lain dari sagu seperti gula sagu. Gula sagu coklat memiliki kandungan total fenolik 39,60 mg GAE/100g, flavonoid 61,06 mg QE/100g dan aktivitas antioksidan sebesar 85% sedangkan gula sagu putih memiliki kandungan total fenolik, flavonoid dan antioksidan berturut-turut 0,865 mg GAE/100g, 0,213 mg QE/100g, dan 33% (Bujang, 2018).

2.2 Potensi Serat dan Senyawa Fenolik Empulur Sagu Dalam Produksi Gula Cair

Kandungan serat empulur sagu umumnya tersusun dari selulosa, lignin, dan hemiselulosa secara berturut-turut sebesar 6,6-7,4% bk, 9,6-22,1% bk, dan 3,3-4,0% bk (Pei-Lang et al., 2006; Yahya et al., 2011) . Selulosa dan hemiselulosa dari empulur sagu dapat hidrolisis menjadi oligosakarida seperti xilooligosakarida (XOS) dan selooligosakarida (COS) yang dapat berperan sebagai prebiotik (Sunarti et al., 2012; Otieno dan Ahring, 2012; Barbarosa et al., 2020; Saville dan Saville, 2018). Hidrolisis dari serat sagu menggunakan selulase dari *Acremonium* menghasilkan glukosa, xilosa, arabinosa, dan selobiosa berturut-turut 10,2 g/L, 1,6 g/L, 0,3 g/L, dan 1,6 g/L berdasarkan penelitian Husin et al. (2019). Xilosa secara *in vitro* dan *in vivo* memiliki potensi untuk menghambat beberapa jenis enzim pencernaan, memperbaiki respon insulin dan menurunkan kadar gula darah (Kim et al., 2016; Shi dan Yin, 2017) sedangkan oligosakarida seperti xilooligosakarida (XOS) berperan sebagai prebiotik karena secara selektif menstimulasi atau memodulasi pertumbuhan bakteri menguntungkan seperti *Bifidobacteria* dan *Lactobacilli* (Saville dan Saville, 2018) dan menurunkan rasio *Firmcutes/Bacteriodes* (Wang et al., 2018).

Senyawa fenolik memiliki potensi dikembangkan sebagai antikanker, anti-inflamasi, antibakteri, anti-diabetes, anti-alergi, anti-analgesik, kardio dan neuroprotektif serta anti-Alzheimer (Shahidi dan Yeo, 2018). Empulur sagu memiliki kandungan fenolik yang tinggi sehingga berpotensi memberikan efek antioksidan pada produk akhir gula cair apabila dapat dipertahankan selama

proses biokonversi (Bujang, 2018; Duque *et al.*, 2018). Selain itu, senyawa fenolik memiliki potensi sebagai prebiotik karena dapat menstimulasi pertumbuhan mikrobiota usus menguntungkan dan menekan pertumbuhan mikroba yang merugikan (Nazzaro *et al.*, 2020).

2.3 Senyawa Fenolik Empulur Sagu dan Penghambatannya Terhadap Enzim

Beberapa senyawa fenolik memiliki kemampuan untuk menghambat beberapa jenis enzim baik secara kompetitif, non-kompetitif, dan inhibisi campuran. Senyawa fenolik yang diidentifikasi terdapat pada sagu adalah DL-epikatekin dan D-katekin yang berperan sebagai prekursor pencoklatan enzimatis serta senyawa prosianidin (Konuma *et al.*, 2013; Ozawa *et al.*, 1990; Duque *et al.*, 2018). Senyawa katekin, epikatekin dan prosianidin dapat menghambat kerja enzim α -amilase dan α -glukosidase (Musa *et al.*, 2019). Pada konsentrasi rendah, katekin akan menghambat kerja enzim selulase sedangkan sebaliknya pada konsentrasi tinggi, katekin akan memfasilitasi kerja enzim selulase (Rajbhar dan Dawda, 2018). Penelitian Desseaux *et al.* (2018) menunjukkan bahwa katekin dan epikatekin memiliki mekanisme penghambatan terhadap kerja enzim α -amilase secara kompetitif. Aktivitas penghambatan enzim ini berpotensi memberikan efek fungsional gula cair empulur akan tetapi dapat berpotensi juga menghambat proses sakarifikasi enzimatis gula cair.

2.4 Enzim-Enzim yang Digunakan Pada Proses

2.4.1 Enzim α -Amilase

Enzim α -amilase (α -1,4-glukan-glukanohidrolase) (EC 3.2.1.1) merupakan enzim yang termasuk ke dalam kelompok enzim endo-amilase. Enzim ini mengkatalisis hidrolisis rantai internal pati secara acak dengan memotong ikatan α -1,4-glikosidik. Produk yang dihasilkan berupa oligosakarida dengan berbagai panjang rantai dan α -limit dekstrin (de Sales *et al.*, 2012; de Souza dan Magalhães, 2010; Saini *et al.*, 2017). Enzim α -amilase bakterial memiliki kondisi optimum yaitu 30-135°C dan pH 5-10 jika dibandingkan dengan enzim α -amilase fungal (de Souza dan Magalhães, 2010). Beberapa inhibitor enzim α -amilase seperti acarbose (inhibitor kompetitif), kelompok flavonoid, terpen dan tannin (de Sales *et al.*, 2012).

2.4.2 Enzim Amiloglukosidase

Amiloglukosidase atau glukamilase (α -1,4 glukon glukohidrolase) (EC 3.1.2.3) merupakan enzim yang memotong ikatan glikosidik α -1,4 dan α -1,6 dari ujung non-pereduksi menghasilkan D-glukosa (Sivakumar et al. 2006). Enzim ini berkerja secara *exoacting* dan berkerja sinergis dengan α -amilase dalam industri jus. Dalam industri, enzim ini paling banyak dihasilkan dari *Aspergillus niger* (Aehle et al., 2007). AMG memiliki kondisi optimum pada pH 5.0 dan suhu 70°C. Beberapa inhibitor dari enzim ini seperti nanokristalin selulosa, vanillin dan kurkumin dalam konsentrasi tinggi (inhibitor kompetitif) (Atindana et al., 2019; Sivakumar et al., 2006).

2.4.3 Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan enzim-enzim dari kelompok glikosil hidrolase yang mengkatalisis reaksi hidrolisis β -1,4 pada rantai polimer linear selulosa. Selulase dapat dibagi menjadi 3 kelas fungsional enzim (klasifikasi paling sederhana) yaitu endoselulase (endoglukanase (EG)), eksoselulase (selobiohidrolase (CBH)), dan β -glukosidase (Atalla dan Isogai, 2010; Wilson, 2009; Jalak et al., 2012). Enzim eksoglukanase atau CBH akan memulai hidrolisis dari ujung rantai selulosa secara prosesif (reaksi hidrolisis selulosa tanpa terlepas dari substrat) sedangkan EG akan menghidrolisis rantai selulosa secara acak dari dalam secara non-prosesif. Hasil produk dari CBH yaitu selobiosa akan dihidrolisis oleh β -glukosidase menjadi glukosa. Pembentukan produk dari enzim ini akan menghambat kerja dari CBH (Jalak et al., 2012; Wilson, 2009). Enzim selulase digunakan dalam pengolahan kapas, daur ulang kertas, enzim deterjen, ekstraksi jus dan aditif pakan hewan (Wilson, 2009). Penelitian Kassanov et al. (2017) menunjukkan bahwa kondisi optimal dari enzim selulase yang diproduksi dari *Aspergillus niger* (70 U/g FPA) yaitu pada suhu 50°C dan pH 4,5 selama 48 jam dengan konsentrasi enzim sebanyak 2 g/L. Beberapa inhibitor dari enzim selulase seperti konsentrasi monosakarida yang tinggi akan menghambat endo- dan eksoselulase (Hsieh et al., 2014), oligosakarida (DP 7-16) seperti XOS dan GOS menghambat aktivitas selobiohidrolase *T. reesei* (Kont et al., 2013), dan komponen fenolik yang dapat mengakibatkan deaktivasi dan inaktivasi β -glukosidase (Kim et al., 2011).

2.4.4 Enzim Xilanase

Enzim xilanase (EC3.2.1.8) merupakan enzim-enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 xilosida dari polisakarida linear xilan.

Beberapa jenis enzim seperti endoxilanasase, β -xilosidase, α -glukoronidase, α -arabinofuranosidase, dan asetilxilan esterase termasuk ke dalam enzim xilanase. Endoxilanasase merupakan enzim paling penting di antara enzim xilanase lainnya karena berperan secara langsung dalam pemotongan ikatan glikosidik dan melepas xilooligosakarida pendek (Liu dan Kokare, 2017). Penelitian Chen *et al.* (2016) menunjukkan bahwa enzim xilanase dari bakteri memiliki kondisi optimum yaitu pada suhu 60°C dan pH 6 sedangkan dari fungsi memiliki kondisi optimal pada suhu 70°C dan pH 5. Bakteri *Bacillus subtilis* BS05 dapat mendegradasi substrat bagasse tebu dengan suhu 50°C dan pH 5,0 dengan aktivitas enzim sebesar 439 IU⁻¹ (Chakdar *et al.*, 2016). Beberapa inhibitor dari enzim xilanase seperti etanol, senyawa aromatik (vanillin), furan dan asam alifatik (asam format), dan monosakarida (D-xylosa, L-arabinosa, dan D-glukosa) (Rohman *et al.*, 2019; Hidayatullah *et al.*, 2020)

2.4.4 Enzim Mannanase

Enzim mannanase terdiri atas dua jenis enzim yaitu endo-1,4- β -mannanase (E.C 3.2.1.78, mannan endo-1,4- β -mannosidase / 1,4- β -D-mannan mannanohidrolase) dan ekso- β -mannosidase (E.C 3.2.1.25). Endo-1,4- β -mannanase memotong secara acak rantai utama β -1,4 D-mannan dari glukomanan, galaktomanan, glukogalaktomanan dan mannan menghasilkan produk manno-oligosakarida, kemudian ekso- β -mannosidase akan mengubah produk ini menjadi manosa (Dhawan dan Kaur, 2007). Kondisi optimum dari enzim mannanase secara umum yaitu berada pada 37°C-70°C dan pH 5,0-9,6 sedangkan enzim manannase yang dihasilkan dari fungal memiliki kondisi optimum pada suhu 40°C-65°C dan pH 3,5-6 (Ma *et al.*, 2004; Kote *et al.*, 2009; Chauhan *et al.*, 2012). Penelitian Marco *et al.* (2015) menunjukkan enzim β -mannanase termostabil (Man 58) dari *Aspergillus foetidus* menunjukkan aktivitas optimal pada suhu 60°C dan pH 4.0. Senyawa FeSO₄ dan CoCl₂ mengaktivasi enzim ini sedangkan MgSO₄, FeCl₃, CuSO₄, MgCl₂, ZnCl₂, ZnSO₄, CaCl₂, CuCl₂, KCl dan EDTA menghambat enzim ini. Senyawa fenolik juga tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim ini.

2.5 Separasi Senyawa Fenolik Empulur Sagu

Rasa pahit yang ada pada buah, sayur, legum, teh, kopi dan wine merupakan sebab adanya senyawa fenolik yang terakumulasi pada tanaman. Beberapa senyawa fenolik memiliki kemampuan untuk memberikan pigmen warna

tanaman. Asam fenolik, lignan, flavonoid, tannin dan stilben merupakan kelompok dari senyawa fenolik (Alara *et al.*, 2021). Ekstraksi senyawa fenolik mempertimbangkan waktu ekstraksi, kualitas, prosedur ekstraksi berulang, dan pemanfaatan teknologi yang ramah lingkungan untuk menghasilkan rendemen yang tinggi dan pengurangan dari limbah (Jing dan Giusti, 2007; Li *et al.* 2019). Beberapa teknik yang telah dikembangkan saat ini adalah ekstraksi pelarut, ekstraksi enzimatis, *high voltage pulse electric field*, *microwave-assisted extraction*, *ultrasound-assisted extraction*, dan *accelerated solvent extraction* (Li *et al.*, 2019). Ekstraksi pelarut menjadi teknik ekstraksi yang paling murah dan paling mudah untuk dilakukan. Penelitian Sun *et al.* (2015) melakukan evaluasi ekstraksi senyawa fenolik berdasarkan pengaruh konsentrasi etanol/air. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa etanol 75% (v/v) menghasilkan rendemen terbaik dan aktivitas antiosidan terkuat. Rendemen ekstraksi, total fenolik dan total flavonoid yang didapatkan berturut-turut mencapai 47,60%, 164,20 mg GAE/g dan 282,83 mg RE/g.