

BAB I Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Indonesia masih melakukan impor pati termodifikasi (maltodekstrin) untuk memenuhi kebutuhan industri obat-obatan dan makanan dengan jumlah volume dan nilai transaksi sebesar 379 ton di tahun 2021 sampai 2023 dengan nilai US\$ 348 juta di tahun 2023 (Kementerian Perdagangan, 2023). Upaya pemanfaatan potensi bahan baku lokal dari Indonesia untuk produksi maltodekstrin perlu dilakukan, sehingga dapat mengurangi nilai impor. Diantara produk pertanian yang memiliki pati tinggi adalah sorgum, singkong, padi, nanas, jagung. Sebuah penelitian dari Thailand melaporkan bahwa batang nanas mengandung 9% pati dalam bentuk basah (Nakthong *et al.*, 2017), sehingga memiliki potensi sebagai bahan baku pembuatan maltodekstrin (Haryani *et al.*, 2016).

Maltodekstrin ditinjau dari aspek sifat kimia, memiliki kelarutan yang baik, dapat membentuk film, memiliki higroskopisitas rendah, sebagai pendispersi, menghambat kristalisasi dan memiliki daya ikat kuat (Sunari *et al.*, 2016). Selain itu, kelebihan maltodekstrin adalah dapat membentuk koloid bila dipanaskan dan mempunyai kemampuan sebagai perekat dan tidak bersifat toksik (Putri *et al.*, 2021). Kualitas maltodekstrin dipresentasikan ke dalam nilai DE (Dextrose Equivalent) sesuai dengan spesifikasi Pharmacopeial standar USP NF XVII untuk produk maltodekstrin yang mempunyai kisaran DE 5-20 (Pycia *et al.*, 2018). Dextrose Equivalent (DE) adalah besaran yang menyatakan nilai total pereduksi pati atau produk modifikasi pati dalam satuan persen. Pada hidrolisis sempurna, pati seluruhnya dikonversi menjadi dekstrosa, derajat konversi tersebut dinyatakan dengan Dextrose Equivalent (DE), dari larutan tersebut diberi indeks 100 (Meriatna, 2013). Nilai DE mempengaruhi karakteristik maltodekstrin.

Penggunaan pati alami dalam industri masih terbatas karena sifat fungsionalnya yang rendah, seperti kecenderungan mengalami retrogradasi ketika disimpan pada temperatur rendah (Chakraborty *et al.*, 2022). Usaha peningkatan sifat fungsional pati perlu dilakukan dengan proses modifikasi pati enzimatis melalui proses hidrolisis parsial menjadi maltodekstrin. Maltodekstrin ($C_6H_{10}O_5$) $_n \cdot H_2O$ merupakan polimer sakarida yang bernutrisi, tidak manis, terdiri dari beberapa unit glukosa dengan ikatan alpha 1,4 glikosidik, dengan nilai dextrose equivalent (DE) kurang dari 20 (BeMiller, 2003; Sutini *et al.*, 2020). Penelitian yang dilakukan (Suryani *et al.*, 2015) dalam pembuatan maltodekstrin dengan proses hidrolisa parsial pati singkong menggunakan Enzim Amilase, hasil yang didapat dari penelitian adalah maltodekstrin dengan harga Dekstrosa Ekuivalen (DE) maksimal sebesar 19,59%, dengan variabel proses pada konsentrasi pati 12%, waktu dekstrinisasi 120 menit dan pH 6.

Maltodekstrin mempunyai penggunaan yang lebih luas dibandingkan pati alami terutama dalam industri makanan, tekstil, kertas maupun farmasi (Aprilla *et al.*, 2023). Pada aplikasi di bidang industri makanan, maltodekstrin berfungsi sebagai bahan tambahan, penstabil rasa, bahan pemanis tambahan dengan derajat rendah namun berkalori, serta pencegah kontaminasi mikrobiologi dan reaksi pencoklatan. Selama ini, maltodekstrin diproduksi dari pati jagung (Amerika) dan pati singkong (Thailand) (Handayani *et al.*, 2022). Modifikasi pati nanas menjadi maltodekstrin diharapkan dapat meningkatkan nilai ekonomi tanaman nanas (Rahma

et al., 2019). Pati didalam bagian batang nanas juga sangat tinggi. Kadar pati yang terkandung dari limbah batang nanas sebesar $68,77 \pm 0,226\%$ dalam basis kering dan hasil rendemennya sebesar $66,31 \pm 0,834\%$ (Lumbanraja *et al.*, 2023). Artinya kadar pati tbatang nanas dalam basis basah sebesar 45,60%. Pembuatan maltodekstrin dari pati nanas melalui proses hidrolisa parsial dengan menggunakan enzim alfa amilase. Studi modifikasi pati telah banyak dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Erika, 2010; Mardawati *et al.*, 2019; Zulaidah, 2012) (Harum & Laga, 2021; Wahyuningsih, 2019).

Indonesia, yang dikenal sebagai salah satu produsen terbesar di Asia, tentu saja telah menghasilkan banyak ton limbah atau produk samping nanas, yang berpotensi digunakan sebagai bahan baku untuk produksi produk-produk bernilai tambah. Sehubungan dengan konsep pembangunan berkelanjutan dan perlindungan lingkungan terpusat dan bersih serta bahan baku terbarukan. Bahan yang tidak digunakan seperti limbah harus dimanfaatkan dalam biokonversi produk bernilai tambah sebagai proses yang hemat biaya serta menghasilkan limbah yang dapat digunakan (Oiza *et al.*, 2022). Langkah ini mampu memberikan manfaat ekologis dan ekonomi kepada para produsen dan lingkungan dalam menanggulangi hasil limbah dari pemanenan nanas.

Metode hidrolisis dapat dilakukan dengan cara hidrolisis asam dan basa, hidrolisis secara enzimatis dan gabungan antara hidrolisis enzim dan asam atau basa (Salsabila & Fahrurroji, 2021). Hidrolisis enzimatis memiliki beberapa keuntungan, yaitu kondisi prosesnya dapat dikontrol, biaya pemurnian lebih murah, dihasilkan lebih sedikit abu dan produk samping, dan kerusakan dapat diminimalkan.

Teknik fermentasi yang banyak digunakan untuk menghasilkan alpha amilase adalah fermentasi terendam (SMF) (Wang *et al.*, 2008), fermentasi keadaan padat (SSF) (Anto *et al.*, 2006; Lawal *et al.*, 2014; Bhatti *et al.*, 2007) dan fermentasi cair (Fujio & Morita, 1996). Fermentasi keadaan padat (SSF) adalah fermentasi yang menggunakan media padat dengan sedikit atau tanpa air untuk mendukung pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme (Pandey, 2006). Selain itu, mikroorganisme yang umum digunakan untuk memproduksi alpha amilase tersebut adalah *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, dan *Trichoderma reesei* (Pandey *et al.*, 2000). *Aspergillus awamori* merupakan isolat asli dari Indonesia yang telah diidentifikasi dapat menghasilkan alpha amilase (Matsubara *et al.*, 2004). Fermentasi substrat padat untuk menghasilkan alpha amilase oleh *Aspergillus* telah ditingkatkan dalam beberapa tahun terakhir. Beberapa substrat telah diteliti, misalnya, limbah serpih beras (Anto *et al.*, 2006), dedak gandum (Bertolin *et al.*, 2003), dan bahkan limbah makanan dari restoran cepat saji (Lam *et al.*, 2013). Meskipun demikian, efisiensi produksi enzim dari biomassa tertentu perlu diselidiki lebih lanjut untuk menurunkan biaya produksi.

Amilum akan diurai oleh enzim amilase yang mampu memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum, menghasilkan molekul-molekul yang lebih kecil seperti maltosa, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil. Enzim alpha amilase (alpha 1,4-glukan-4-glukanohidrolase) dapat ditemukan dalam mikroorganisme, tumbuhan, dan organisme tingkat tinggi (Kandra, 2003). Enzim alpha amilase termasuk dalam famili endo-amilase yang mengkatalisis hidrolisis awal pati menjadi oligosakarida yang lebih pendek melalui pembelahan ikatan glikosidik alpha D-(1-4) (Brayer *et al.*, 1995; Iulek *et al.*, 2000; Tangphatsornruang *et al.*, 2005a, 2005b). Residu glukosa terminal maupun ikatan α -1,6 tidak dapat dibelah oleh α -amilase (Whitcomb & Lowe, 2007). Mikroorganisme seperti bakteri dan

fungi diketahui mampu menghasilkan enzim ini. Kapang- kapang yang dapat menghasilkan amilase dan banyak dimanfaatkan untuk industri adalah *A. oryzae*, *A. awamori*, *R. oryzae*, juga beberapa species dari genus *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Neurospora*, dan *Rhizopus* (Roosheroe *et al.*, 2014). Enzim ini banyak digunakan dalam industri, yang sekitar dua pertiganya dihasilkan oleh mikroorganisme, termasuk kapang. Beberapa kapang dari genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Endhotia* dan *Mucor*. *A. awamori*, *A. niger* dan *A. flavus* diketahui mampu menghasilkan protease (Berka *et al.*, 1992). Dalam penelitian Munarso (1989) dedak yang diinokulasikan dengan *Aspergillus niger* selalu menghasilkan ekstrak amilase dengan aktivitas yang lebih rendah dibandingkan bila perlakuan tersebut dikenakan pada dedak yang diinokulasikan dengan *Aspergillus awamori* KT-11. Dengan kata lain *Aspergillus awamori* KT-11 bersifat lebih responsif untuk memproduksi ekstrak amilase.

Pusat Penelitian Mikrobiologi Terapan (PMRT) Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) memiliki *Aspergillus awamori* KT-11 yang telah teruji kemampuannya dalam menghidrolisis pati. Isolat ini mampu menghasilkan amilase kompleks dalam media padat dengan menggunakan dedak gandum. Jamur tersebut diketahui menghasilkan tiga jenis amilase, yaitu alpha glukosidase, alpha amilase, dan glukoamilase. Dari alpha amilase diperoleh tiga jenis yaitu Amil I, II dan III, dimana dua diantaranya (Amil II dan III) mampu menghidrolisis pati mentah (Anindyawati *et al.*, 1998) dan dua jenis glukoamilase (GA I dan II), memiliki kemampuan menghidrolisis pati mentah secara bersamaan (Anindyawati *et al.*, 1998). Ketika alpha amilase dan glukoamilase bekerja sama, tindakan pemecahan pati meningkat tiga kali lipat dibandingkan jika masing-masing enzim bekerja sendiri. Hal ini disebabkan juga karena glukoamilase dari kapang mempunyai kemampuan untuk memotong rantai glukosida alpha 1,6 dari pati atau berarti mempunyai aktivitas debranching yang tinggi (Melliawati & Nuryati, 2019). Kandungan karbohidrat yang tinggi pada umbi-umbian dapat menjadi sumber daya hayati yang potensial untuk dikembangkan. Oleh karena itu pada penelitian terdahulu menggunakan labu kuning, kentang, sukun, dan tepung pisang digunakan sebagai substrat pembuatan pemanis alami (gula cair). Pada media dedak gandum, aktivitas enzim *Aspergillus awamori* KT-11 mencapai 186,9835 U/mL, tepung pisang menghasilkan gula pereduksi tertinggi 117,938 mg/mL pada konsentrasi 20% dengan durasi 3 hari fermentasi. Tepung labu kuning menghasilkan gula pereduksi paling rendah (6,563 mg/mL) dengan tepung terigu konsentrasi 15% dan lama fermentasi 3 hari (Melliawati *et al.*, 2019).

Untuk membuat produk pangan baru, terdapat beberapa tantangan bagi produsen, karena karakteristik kimia dan tekstur pati harus dipertimbangkan. Struktur mikro, sifat mekanik dan kualitas nutrisi bahan berbasis pati sangat bergantung pada struktur dan sifat pati baris serta metode pengolahan yang digunakan (Mardawati *et al.*, 2019). Ada tren peningkatan terhadap produksi produk turunan pati yang dapat terbiodegradasi. Untuk memenuhi kebutuhan ini, banyak industri bergantung pada tanaman pangan. Hal ini bukanlah solusi yang berkelanjutan karena dapat menyebabkan eksploitasi berlebihan terhadap tanaman pangan, sehingga berdampak pada ketahanan pangan. Oleh karena itu alternatif yang berkelanjutan seperti pengambilan pangan dari limbah pertanian akan menjadi salah satu solusi yang tepat.

1.2 Perumusan Masalah

Batang nanas mengandung kadar pati yang cukup tinggi setelah dipanen selama 12-24 bulan sehingga memungkinkan untuk dijadikan bahan baku alternatif atau bahan baku baru pada pembuatan maltodekstrin (Rinju & Harikumaran-Thampi, 2021). Permasalahan dalam penelitian ini adalah efektifitas konsentrasi enzim alpha amilase yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus awamori* KT-11, bagaimana pengaruh proses teknik enzimatik terhadap maltodekstrin yang dihasilkan, apakah maltodekstrin yang dihasilkan memenuhi karakteristik fisik dan apakah penggunaan mikroba lokal alpha amilase dari *Aspergillus awamori* KT-11 dapat mempengaruhi dalam proses pembuatan maltodekstrin.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini antara lain :

1. Memproduksi enzim alpha amilase dari kapang *Aspergillus awamori* KT-11 dengan teknik *Solid State Fermentation* (SSF)
2. Menentukan konsentrasi enzim optimal, waktu dan suhu likuifikasi optimal yang digunakan untuk proses pembuatan maltodekstrin
3. Memproduksi maltodekstrin dengan proses enzimatik dari pati batang tanaman nanas.
4. Menganalisa karakteristik fisik dan kimia maltodekstrin yang dihasilkan.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini selain bermanfaat dalam hal pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK) juga memberikan kontribusi sebagai berikut :

1. Menambah wawasan mengenai produk yang bisa dihasilkan dari limbah batang tanaman nanas seperti maltodekstrin.
2. Menjadi alternatif pemenuhan kebutuhan masyarakat akan maltodekstrin sebagai pengganti maltodekstrin tebu dan dekstrin jagung.
3. Memanfaatkan teknik enzimatik sebagai salah satu alternatif proses pembuatan maltodekstrin.

BAB II Metode Penelitian

2.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2023 sampai dengan Oktober 2024 di Laboratorium Genomik Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Laboratorium Terpadu Bioproduk, dan laboratorium InaCC Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) di Cibinong Bogor, Jawa Barat.

2.2 Bahan

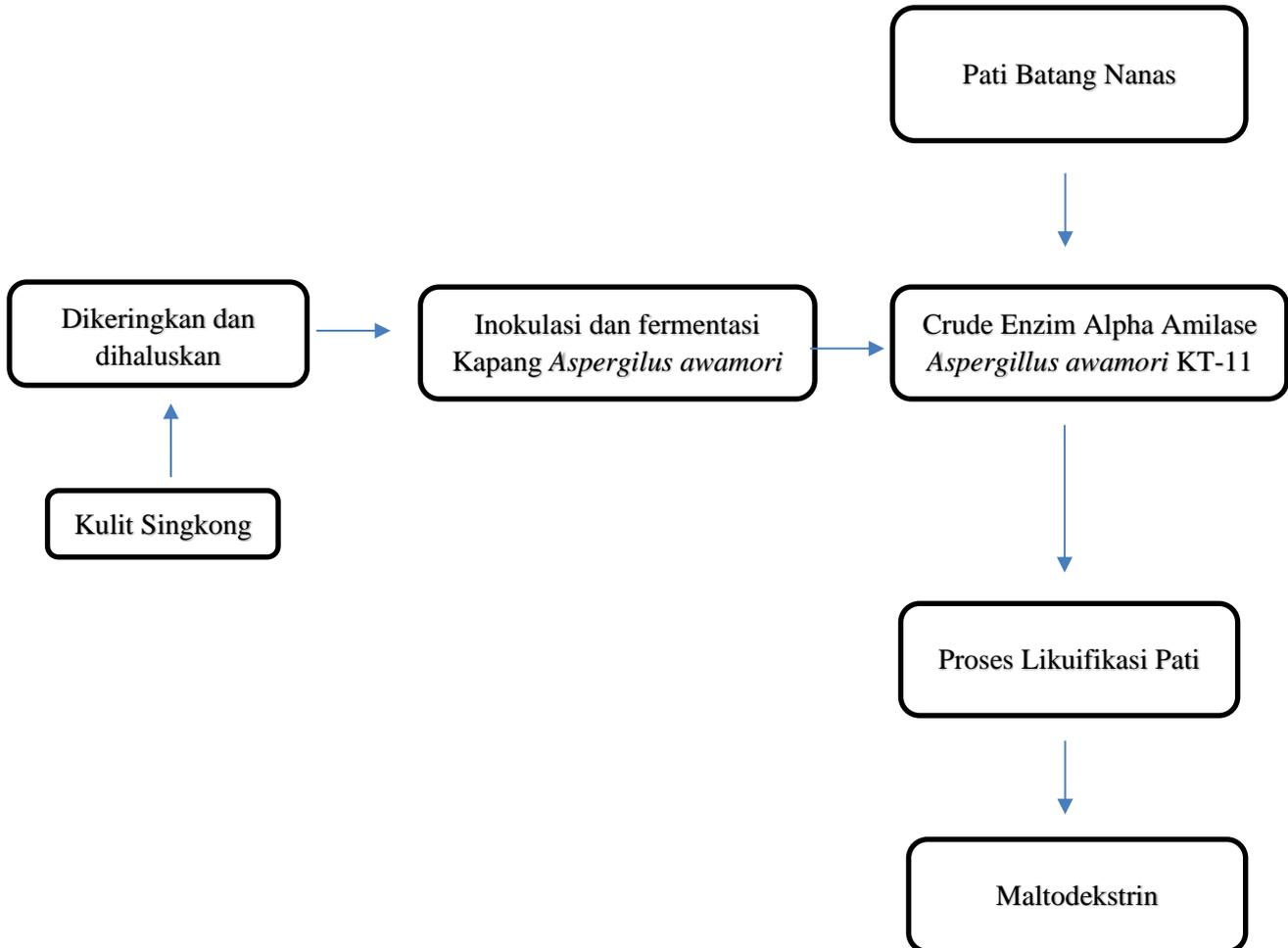
Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah serat pati batang nanas yang diperoleh dari PT. Great Giant Pineapple, Lampung, Indonesia. Sampel disiapkan di Laboratorium Terpadu Bioproduk, BRIN, Cibinong, dan diekstraksi dengan ekstrak air panas (Parlan, 2022). Selanjutnya ada kulit singkong yang diambil dari pasar sekitar tempat tinggal peneliti. Enzim yang digunakan adalah crude enzim alpha amilase *Aspergillus awamori* KT-11. Mikroba lokal *Aspergillus awamori* KT-11 kultur yang berasal dari Indonesia hasil isolasi dari udara teridentifikasi mampu memproduksi enzim amilase kultur InaCC BRIN (Melliawati *et al.*, 2019). Bahan untuk fermentasi yang digunakan untuk penelitian ini antara lain K_2HPO_4 (Sigma Aldrich Amerika Serikat), KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, Amerika Serikat), dan amonium sulfat (p.a) (Merck, Jerman). sementara untuk bahan analisa yaitu $CaCl_2$ produksi Sigma Aldrich Amerika Serikat, NaOH produksi Sigma Aldrich Amerika Serikat, Pb Asetat, Na-K Tartat produksi Merck Jerman, pati komersial (p.a) produksi Sigma Aldrich Amerika Serikat, tisu, aluminium foil, larutan DNS, dan akuades. Bahan-bahan untuk analisa kimia meliputi bahan-bahan untuk analisa pati dan maltodekstrin dan semua bahan adalah analitis.

2.3 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spray dryer (Amfield FT300-China), Brabender (Micro Visco-Amylo-Graph-Ciscal/Australia), mikropipet (Transferpette-Sigma Aldrich/Amerika Serikat), timbangan analitik (Kern PCB- Kern and Sohn/Jerman), penangas, bath shaker dengan termometer, timbangan kasar, oven (Mammert/Jerman), cawan aluminium, alat gelas, kertas saring, batang pengaduk, magnetic stirrer, stopwatch, spectofotometer Uv-Vis, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, dan thermometer.

2.4 Kerangka Penelitian

2.4.1 Kerangka Teori



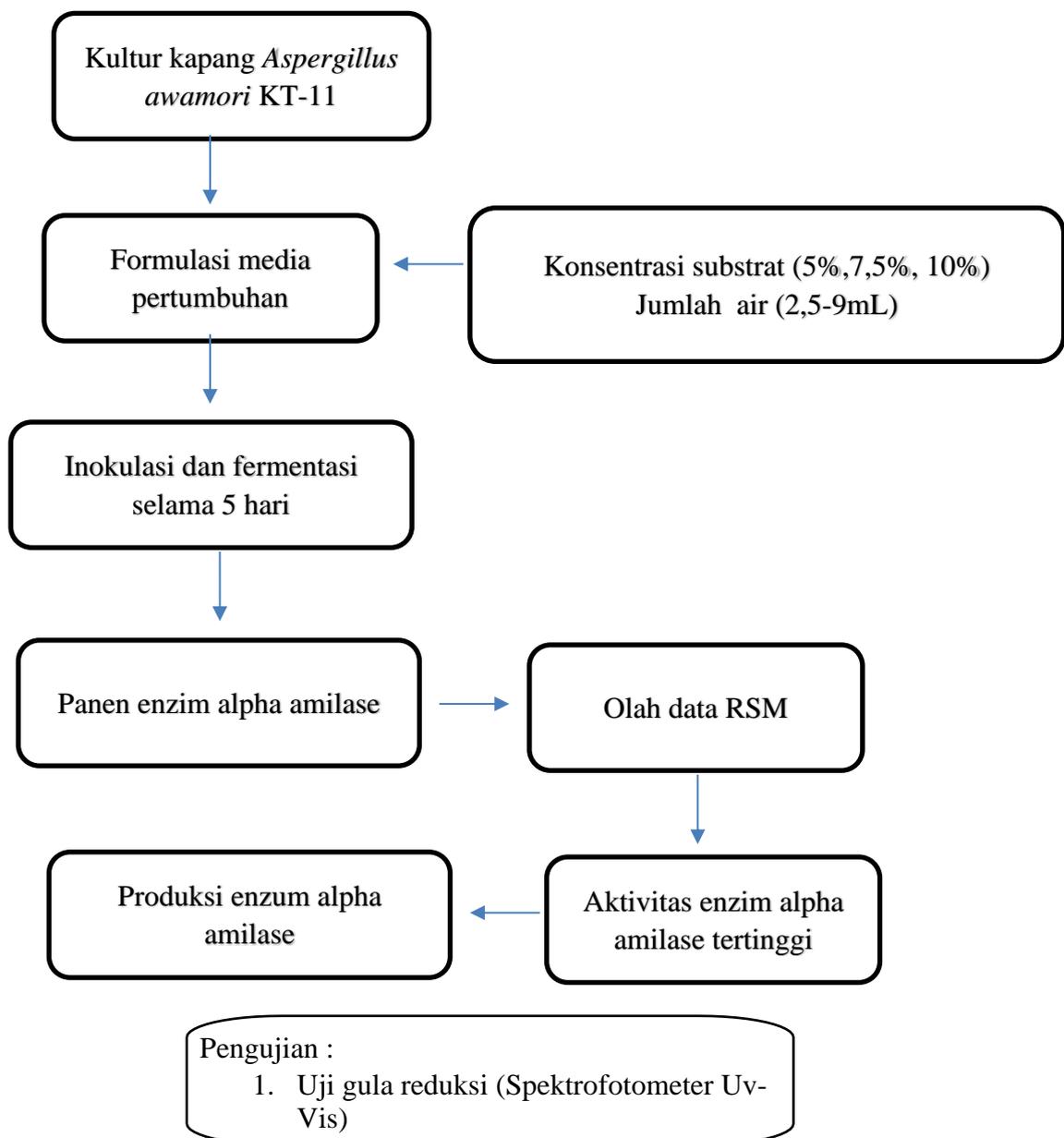
Gambar 1. Kerangka Penelitian Produksi Maltodekstrin dari Pati Batang Nanas Menggunakan Enzim alpha amilase dari Mikroba Lokal *Aspergillus awamori* KT-11

2.5 Prosedur Penelitian

Prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri dari beberapa bagian yaitu persiapan alat, bahan baku, dan peremajaan kultur (propagasi) mikroorganisme kapang *Aspergillus awamori* KT-11. Tahapan yang dilaksanakan dalam penelitian ini terdiri dari tahap pertama yaitu produksi enzim alpha amilase dari kapang *Aspergillus awamori* KT-11, dan pada tahap kedua yaitu produksi maltodekstrin menggunakan enzim alpha amilase dari mikroba lokal *Aspergillus awamori* KT-11.

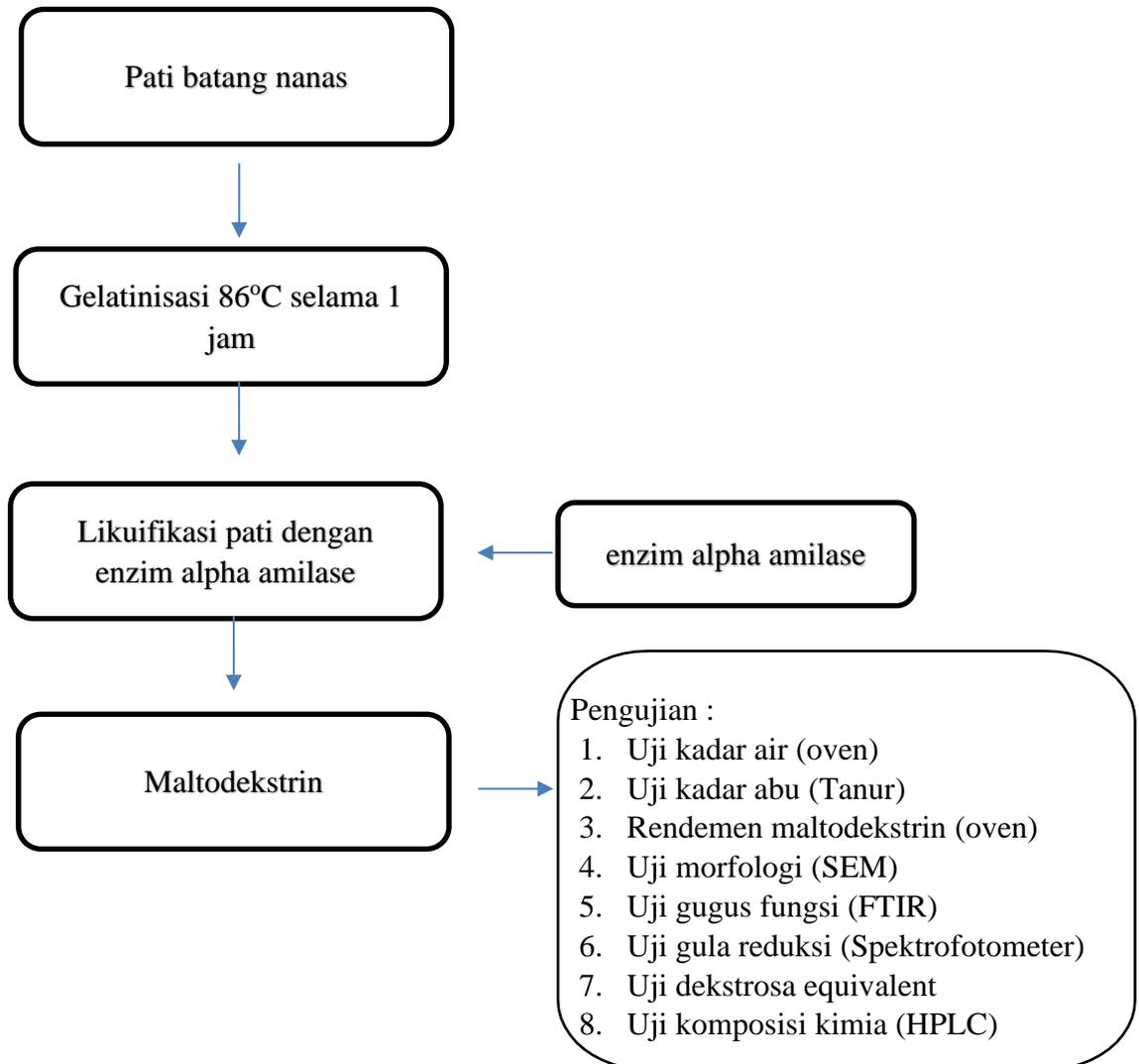
2.5.1 Skema Penelitian

Penelitian produksi maltodekstrin menggunakan kapang *Aspergillus awamori* KT-11 dilakukan dengan 2 skema tahapan yaitu :



Gambar 2. Skema penelitian tahap pertama produksi enzim alpha amilase

Dari tahap pertama penelitian mendapatkan enzim alpha amilase yang akan digunakan pada tahapan kedua produksi maltodekstrin. Skema penelitian tahap kedua yaitu:

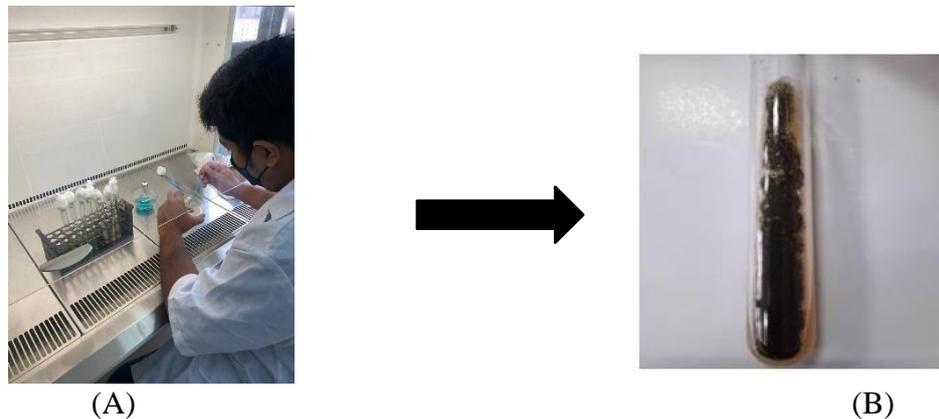


Gambar 3. Skema tahap kedua proses pembuatan maltodekstrin

2.5.2 Peremajaan kultur (propagasi) mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Aspergillus awamori* KT-11, yang merupakan koleksi kapang pusat riset mikrobiologi terapan BRIN. Kapang ini sangat potensial untuk menghasilkan enzim alpha amilase (Melliawati & Nuryati, 2019). Peremajaan isolat *Aspergillus awamori* KT-11 dilakukan sebelum digunakan untuk mendapatkan kondisi kultur yang aktif sehingga optimal dalam memproduksi enzim. Kapang *Aspergillus awamori* KT-11 ditumbuhkan pada media PDA dan inkubasi selama 5 hari pada suhu ruang. Spora

Aspergillus awamori KT-11 terlihat hitam sempurna setelah 5 hari inkubasi. Media yang telah dipenuhi spora siap untuk dipindahkan ke media yang lebih kompleks dari PDA. Komposisi media yang lebih kompleks dapat menginduksi produksi enzim amilase. Suspensi kapang disiapkan dengan cara 0,5 ml aquadest steril dituangkan ke dalam tabung reaksi yang berisi kapang, kemudian dilarutkan dengan menggunakan jarum ose. Dilakukan 10 tabung propagasi dalam penelitian ini.



Gambar 4. (A) Inokulasi *Aspergillus awamori* KT-11, (B) Inokulasi *Aspergillus awamori* KT-11

2.5.3 Media Produksi Enzim

Media untuk fermentasi digunakan yaitu media padat dengan teknik Solid-State Fermentation (SSF). Komposisi media padat : 5-10 g serbuk kulit singkong kering, , 0,5% K_2HPO_4 , 0,5% KH_2PO_4 , 5% amonium sulfat dan menambahkan 50-90% konsentrasi aquades (diaduk rata). Media tersebut disterilisasi pada $121^\circ C$ selama 15 menit. Kemudian didinginkan. Formulasi komposisi media menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) dengan desain CCD untuk menilai komposisi yang paling baik dalam menghasilkan enzim alpha amilase.

2.5.4 Produksi Enzim alpha amilase

Produksi enzim alpha amilase dilakukan dengan menginokulasikan suspensi *Aspergillus awamori* KT-11 sebanyak 5% (diambil dari agar miring) substrat ke dalam wadah erlenmeyer, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari. Setelah 5 hari fermentasi kapang *Aspergillus awamori* KT-11 terlihat berwarna hitam sempurna. Di hari ke 5 dilakukan pemanenan dengan cara mempersiapkan buffer posphat pH 4,8 sebanyak 1:2 dengan substrat (b:v). Buffer yang telah disiapkan lalu dituangkan ke dalam wadah erlenmeyer kapang *Aspergillus awamori* KT-11 dan dilakukan pengadukan sampai substrat dan buffer tercampur rata. Setelah itu ekstraksi enzim dilakukan dengan cara penyaringan crude enzim lebih dulu menggunakan kain saring kemudian dilanjutkan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Crude enzim dipisahkan dari biomassa dan disimpan di lemari pendingin $4^\circ C$.

2.5.5 Uji aktivitas alpha amilase enzim kapang *Aspergillus awamori* KT-11

Pengujian aktivitas enzim alpha amilase dengan cara yaitu penggunaan substrat untuk aktivitas enzim adalah 5% soluble starch dalam buffer fosfat pH 4,8 50 mM. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan mereaksikan enzim amilase dan soluble starch dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 60°C. Setelah inkubasi berakhir, tabung didinginkan pada suhu ruang. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam air mendidih 100°C selama 10 menit sampai berubah warna menjadi merah kecoklatan. Tabung reaksi didinginkan selama 10 menit dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 540 nm (Marsiti *et al.*, 2016).

Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Aktivitas enzim amilase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/mL. Satuan unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1 μ mol pati menjadi gula pereduksi per menit (Sampson *et al.*, 2022). Aktivitas enzim alpha amilase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standar, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus Persamaan:

$$\text{Aktivitas Enzim U/mL} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa } (\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}) \times (\text{Volume total enzim-substrat})(\text{ml})}{\text{Berat molekul glukosa } \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{Volume enzim (ml)} \times \text{Waktu inkubasi (menit)}} \quad (1)$$

2.5.6 Likuifikasi Pati menjadi Maltodekstrin

Pada percobaan pengaruh suhu dan waktu likuifikasi menggunakan pati batang nanas terhadap produksi maltodekstrin, kondisi fermentasi sebagai variabel tetap dan konsentrasi pati batang nanas sebagai variabel terikat dengan waktu dan suhu likuifikasi serta konsentrasi enzim sebagai variabel terkontrol. Pati batang nanas disuspensikan ke dalam 100 mL larutan aquades dengan variasi berat pati yaitu 10% (b:v). Suspensi kemudian diatur pHnya dengan NaOH/HCl 0,1 M hingga pH netral (7). Suspensi kemudian ditambahkan crude enzim alpha amilase dengan buffer fosfat sebanyak 5-25% (v:v). Setelah di konversi hanya crude enzim saja menjadi 1,67-8,34% dengan perbandingan substrat dan buffer 1:2 (v:v). Suspensi dihidrolisis dengan cara dipanaskan diatas penangas oven *shaker* pada waktu reaksi yang diperlukan untuk mengubah pati menjadi dekstrin dengan bantuan enzim alpha amilase sebagai variabel kontrol dan suhu yang juga ditentukan sebagai variabel kontrol. sambil diaduk dengan kecepatan 200 rpm. Suspensi yang telah dihidrolisis kemudian didinginkan dengan air dingin hingga suhu 30°C, kemudian dipanaskan di air mendidih selama 10 menit untuk menonaktifkan enzim. Setelah itu suspensi disaring dan diambil supernatannya yaitu maltodekstrin yang terbentuk yang kemudian dikeringkan di oven pada suhu 50°C selama 24 jam lalu dihaluskan hingga di peroleh serbuk maltodekstrin kasar dan dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat maltodekstrin}}{\text{Berat Pati}} \times 100\% \quad (2)$$

2.6 Desain Penelitian

Desain penelitian ini terdiri dari 2 tahap yakni tahap pertama produksi enzim alpha amilase kapang *Aspergillus awamori* KT-11 dengan metode *solid-state fermentation* variabel konsentrasi substrat padat (5-10%) dan Jumlah air (2,5-9mL) menggunakan *Central Composite Design*, variabel terikat digunakan yaitu hasil konsentrasi enzim alpha amilase. Tahap kedua yaitu produksi maltodekstrin dengan variabel konsentrasi enzim (1,67-8,34%), didapat dari konversi crude dengan buffer 1:2. lama waktu reaksi likuifikasi (15, 30, 60, 90, 120 menit) dan suhu likuifikasi (50°C-70°C) untuk menghasilkan produk maltodekstrin terbaik dengan menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) desain *Box-behnken Design*, variabel terikat dari tahap kedua yaitu dextrosa equivalent, total padatan, rendemen, kadar air, dan kadar abu dari hasil produksi maltodekstrin.

2.6.1 Desain penelitian tahap pertama

Desain yang digunakan dalam tahap pertama ini adalah *central composite design* dari RSM dengan rincian sebagai berikut:

Tabel 1. Informasi Desain RSM penelitian tahap pertama

Build Information

File Version	13.0.5.0		
Study Type	Response Surface	Subtype	Randomized
Design Type	Central Composite	Runs	13.00
Design Model	Quadratic	Blocks	No Blocks
Build Time (ms)	42.00		

Tabel 2. Komponen dalam RSM untuk penelitian tahap pertama

Factor	Name	Units	Type	SubType	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
A	substrat	%	Numeric Continuous		5.00	10.00	-1 ↔ 5.00	+1 ↔ 10.00	7.50	2.04
B	water content	%	Numeric Continuous		50.00	90.00	-1 ↔ 50.00	+1 ↔ 90.00	71.54	15.19

Komponen variabel yang ada dalam tahapan ini adalah:

A : Media pertumbuhan kapang variasi serbuk kulit singkong dalam 100 mL erlenmeyer (b/v).

A1 : Substrat serbuk kulit singkong sebanyak 5%

A2 : Substrat serbuk kulit singkong sebanyak 7,5%

A3 : Substrat serbuk kulit singkong sebanyak 10%

B : Jumlah air yang digunakan berbandingan dengan substrat (b/v)

B1 : Jumlah air 50%

B2 : Jumlah air 60%

B3 : Jumlah air 70 %

B4 : Jumlah air 80 %

B5 : Jumlah air 90%

Tabel 3. Running RSM aktivitas enzim alpha amilase

Running	Konsentrasi substrat (gr)	Konsentrasi jumlah air (mL)
1	5	4,5
2	10	5
3	7,5	5,25
4	10	9
5	7,5	6
6	7,5	4,5
7	5	3,5
8	10	7
9	5	4
10	10	8
11	7,5	6,75
12	5	2,5
13	7,5	3,75

2.6.2 Desain penelitian tahap kedua

Penelitian tahap kedua yaitu proses likuifikasi pati batang nanas menggunakan enzim alpha amilase dari mikroba *Aspergillus awamori* KT-11. Desain yang digunakan dalam tahap kedua ini adalah *box-behnken design* dari RSM. Dalam konsentrasi enzim memakai crude enzim alpha amilase dengan perbandingan 1:2, dengan rincian sebagai berikut:

Tabel 4. Informasi Desain RSM penelitian tahap kedua

Build Information

File Version	13.0.5.0
Study Type	Response Surface Subtype Randomized
Design Type	Box-Behnken Runs 20.00
Design Model	Quadratic Blocks No Blocks
Build Time (ms)	7.00

Tabel 5. Komponen dalam RSM untuk penelitian tahap kedua

No.	Name	Units	Type	Sub Type	Min	Max	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
A	Konsentrasi enzim	%	Numeric	Continuous	5.00	25.00	5.00	25.00	15.00	7.25
B	Waktu likuifikasi	Minute	Numeric	Continuous	15.00	120.00	15.00	120.00	63.00	39.92
C	Suhu likuifikasi	Degree	Numeric	Continuous	50.00	70.00	50.00	70.00	60.00	7.25

Variabel yang digunakan dalam tahapan ini yaitu:

D : Waktu likuifikasi

D1: 15 menit, D2 : 30 menit, D3 : 60 menit, D4 : 90 menit,

D5 : 120 menit

X : Suhu likuifikasi

X1 : 50°C, X2 : 55°C, X3 : 60°C, X4 : 65°C, X5 : 70°C

Y : Konsentrasi enzim (v:v) dipakai perbandingan 1:2 crude enzim alpha amilase, jadi dalam formulasi tercantum sebagai berikut :

Y1 : 1,67%, Y2 : 3,34%, Y3 : 5%, Y4 : 6,67%, Y5 : 8,34%

Tabel 6. Running RSM tahap 2 proses likuifikasi maltodekstrin

Running	Konsentrasi crude enzim (%)	Waktu likuifikasi (Menit)	Suhu likuifikasi (C)
1	6,67	120	65
2	1,67	15	50
3	3,34	30	50
4	1,67	90	70
5	3,34	15	55
6	3,34	30	55
7	5	60	60
8	5	60	50
9	8,34	15	70
10	1,67	120	50
11	3,34	15	70
12	5	120	65
13	8,34	90	65
14	5	60	70
15	8,34	30	60
16	6,67	60	60
17	6,67	90	60
18	8,34	120	55
19	1,67	30	55
20	6,67	90	65

2.7 Parameter pengujian dalam penelitian

Parameter penelitian yang dilakukan di tahapan pertama menggunakan parameter uji aktivitas enzim, sedangkan parameter yang dilakukan di tahapan kedua menggunakan parameter pengukuran gula pereduksi, padatan total, dextrose equivalent (DE), rendemen maltodekstrin, analisa HPLC untuk jenis gula yang terbentuk, SEM untuk morfologi permukaan maltodekstrin, analisa FTIR untuk gugus fungsi yang ada di maltodekstrin, analisa kadar air dan kadar abu

2.7.1 Aktivitas enzim

2.7.1.1 Pembuatan larutan reagen DNS (Bailey *et al.*, 1992; dalam Pratiwi *et al.*, 2018)

Penentuan aktivitas enzim alpha amilase dilakukan berdasarkan kemampuan enzim tersebut dalam mengurai substrat, yang dalam penelitian ini adalah polisakarida pati menjadi sakarida yang terdegradasi dan monosakarida dalam bentuk gula pereduksi pada satuan waktu tertentu. Metode yang paling sering digunakan dalam penentuan gula pereduksi produk reaksi enzimatik dari enzim - enzim pendegradasi polisakarida adalah metode DNS (Miller, 1959). Metode ini menggunakan reagen asam 3,5- dinitrosalisilat (DNS).

Volume 1416 ml aquades ditambahkan 10,6 gr DNS, 19,8 gr NaOH, 8,3 gram Na-metabisulfid, 306 gram NaK-Tartar, 7,6 ml fenol cair suhu 105°C. bahan – bahan tersebut dicampur hingga larut.

2.7.1.2 Pembuatan kurva standar

Kurva standar menggunakan glukosa standar. Sebanyak 0,1 gram gula standar dilarutkan dalam 100 ml aquades. Kurva standar dibuat pada konsentrasi 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 ppm.

2.7.1.3 Pengujian aktivitas enzim metode DNS (Miller, 1959)

Dalam melakukan pengujian aktivitas enzim, bahan yang dibutuhkan yaitu pati komersial sebanyak 1% dipanaskan dalam penangas air selama 1 jam dengan suhu 80°C. Larutan pati tersebut dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 500 uL dan masukkan juga enzim alpha amilase sebanyak 500 uL. Campuran tersebut dipanaskan di penangas selama 1 jam dengan suhu 60°C. larutan selanjutnya ditambahkan dengan 1 mL pereaksi DNS, selanjutnya dipanaskan pada hotplate mendidih selama 10 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan kedalam kuvet, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kadar gula ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi absorbansi larutan standar (Dimodifikasi dari (Yulistiani *et al.*, 2019)).

2.7.2 Uji gula pereduksi metode DNS (Miller, 1959)

Dalam melakukan pengujian gula pereduksi, bahan yang dibutuhkan yaitu larutan maltodekstrin sebanyak 500 uL. Larutan selanjutnya ditambahkan dengan 500 uL pereaksi

DNS, selanjutnya dipanaskan pada hotplate mendidih selama 10 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan kedalam kuvet, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kadar gula ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi absorbansi larutan standar (Dimodifikasi dari (Yulistiani *et al.*, 2019)).

2.7.3 Pengukuran kadar gula total metode fenol – asam sulfat (Apriyantono, 1989; dalam Qalsum *et al.*, 2017)

Sebanyak 1 mL larutan gula hasil hidrolisis dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2,5 mL pereaksi H₂SO₄ dan 250 uL Phenol 5%, selanjutnya dipanaskan pada hotplate mendidih selama 10 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan kedalam kuvet, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Kadar gula total ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi absorbansi larutan standar ((Permanasari *et al.*, 2018; Yue *et al.*, 2022).

2.7.4 Total padatan maltodekstrin metode oven (Dzurec & Baptie, 1989)

Penentuan total padatan dihitung diawali dengan cawan dikeringkan dalam oven suhu 105°C selama 30 menit dan didinginkan dalam desikator selama 20 menit. Sebanyak 2g sampel ditimbang ke dalam cawan kering, cawan yang berisi sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 6 jam. Kemudian ditimbang dan dioven kembali, pengovenan dan penimbangan dianggap selesai apabila tetap konstan (selisih penimbangan ≤0,5 mg).

2.7.5 Penentuan nilai *dextrose equivalent* (DE)

Dextrose Equivalent (DE) atau persamaan dekstroza adalah ukuran jumlah gula pereduksi yang ada dalam produk gula, dinyatakan sebagai persentase pada basis kering relatif terhadap dekstroza. Dalam semua polimer glukosa, dari pati asli hingga sirup glukosa, rantai molekul berakhir dengan gula pereduksi, yang mengandung aldehida bebas dalam bentuk liniernya. Saat pati dihidrolisis, molekul menjadi lebih pendek dan lebih banyak gula pereduksi yang ada. Oleh karena itu, DE menggambarkan derajat konversi pati menjadi dekstroza.

DE dapat dianalisis menggunakan metode dinitrosalisilat (DNS) secara spektrofotometri uv-vis. Nilai adsorbansi yang diperoleh dikonversi menjadi konsentrasi (mM) dengan menggunakan persamaan regresi kurva kalibrasi. Selanjutnya nilai gula pereduksi tersebut dibagi dengan nilai padatan total substrat pati yang digunakan. Selanjutnya konsentrasi dikonversikan menjadi DE dengan persamaan berikut :

$$DE = \frac{\text{gula pereduksi yang terbentuk } \frac{b}{v}}{\text{total padatan substrat } \frac{b}{v}} \times 100\% \quad (3)$$

2.7.6 Pengujian gugus fungsi maltodekstrin

Penentuan gugus fungsional dilakukan dengan alat spektrofotometer FTIR. Sebelum dilakukan pengujian, sampel dikeringkan menggunakan spray dryer. Spray dryer merupakan salah satu jenis alat pengering yang dioperasikan secara kontinyu. Pengeringan semprot merupakan pengeringan yang dapat mengubah umpan dari keadaan fluida menjadi butiran-butiran dan kemudian diubah lagi menjadi partikel-partikel kering melalui penyemprotan secara terus menerus dalam media pengering panas. Dantas *et al.* (2024) menyatakan bahwa alat pengering semprot dapat digunakan untuk mengeringkan larutan kental. Larutan disemprotkan dengan kecepatan tinggi secara sentrifugal sehingga zat cair akan menguap segera karena kontak permukaan yang besar dengan udara kering bersuhu tinggi. Di dalam sebuah pengering semprot, bahan cair atau bahan padat disemprotkan dalam bentuk tebaran halus ke dalam aliran panas, proses pengeringan terjadi dengan sangat cepat.

Produk yang dihasilkan oleh pengering semprot dapat berupa bubuk, butiran-butiran atau gumpalan. Hal ini tergantung dari sifat fisik dan kimia bahan yang dikeringkan, kondisi dan desain dari alat pengering semprot yang digunakan (Erlina, 2012).

Spektrum FT-IR dari sampel maltodekstrin diukur dengan spektrometer dari 500 hingga 4000 cm^{-1} dengan pemindaian masing-masing 16 kali dan 8 resolusi (Thermoscientific Nicolet iS-10, Nicolet, Amerika Serikat). 3 mg sampel dicampur seluruhnya dengan KBr kering (300 mg), dan kemudian data dimasukkan ke dalam tabel untuk dianalisis.

2.7.7 Pengujian kandungan gula maltodekstrin

Sampel ditimbang sebanyak 5gr lalu ditambahkan 20 mL Etanol 80%, lalu dipanaskan pada suhu 80°C selama 30 menit. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh ditambahkan larutan Pb-Asetat 10% sebanyak 2 mL lalu disentrifugasi kembali. Pellet yang diperoleh ditambahkan 20 mL Etanol 80% lalu disentrifugasi kembali. Supernatan yang diperoleh digabung dengan supernatan sebelumnya, lalu diuapkan dengan hotplate hingga volume 10ml. Setelah itu, ditambahkan Na-Oksalat 5% hingga tidak terjadi endapan, serta Etanol 80% hingga volume larutan 25 mL. Lalu larutan dihomogenkan dan disaring dengan millex, kemudian sampel diinjeksikan ke dalam HPLC. Kurva standar dibuat sukrosa, glukosa, dan fruktosa masing-masing 1000, 750, dan 500 ppm dengan volume injeksi 10 μL . Perhitungan kadar gula berdasarkan interpolasi regresi linear dari kurva standar.

2.7.8 Uji kadar air

Uji kadar air menggunakan metode pengeringan dengan alat moisture analyzer. Pertama yang dilakukan adalah memastikan alat moisture analyzer sudah dikalibrasi dan siap digunakan. Setelah itu tekan tombol ON untuk menyalakan alat dan tunggu hingga 5 menit. Sampel disiapkan sebanyak 5 gr dan dimasukan kedalam pan. Pastikan penyebaran sampel merata dan menutupi seluruh permukaan pan dengan lapisan sampel yang tipis. Diatur waktu (5 menit) dan suhu (105°C) dengan cara menekan tombol yang di panel operasi. menekan tombol start untuk menghidupkan alat, buka penutup alat, dan masukan pan ke modul

pemanas. Setelah pan sudah masuk, tekan tombol zero, pemanasan akan berlangsung selama waktu yang ditentukan. Amati hasil kadar air yang diperoleh dari proses pemanasan tersebut.

2.7.9. Uji kadar abu

Uji kadar abu menggunakan metode pengeringan tanur dengan pemanasan tinggi sampai 600°C dengan alat oven tanur. Pertama yang harus dipastikan adalah alat sudah dikalibrasi dan siap digunakan. Setelah itu tekan tombol ON untuk menyalakan alat dan tunggu hingga suhu meningkat sampai 600°C. Sampel disiapkan sebanyak 5 gr dan dimasukkan kedalam pan. Penyebaran sampel merata dan menutupi seluruh permukaan pan dengan lapisan sampel yang tipis. Atur waktu (5 menit) dengan menekan tombol yang di panel operasi. Tekan tombol start, buka penutup alat, dan masukan pan ke modul pemanas. Setelah pan sudah masuk, tekan tombol zero, pemanasan akan berlangsung selama waktu yang ditentukan. Amati hasil kadar abu yang diperoleh dari proses pemanasan tersebut.

2.8 Pengolahan data

Data yang diperoleh diolah dengan tahap pertama menggunakan analisa deskriptif *Response Surface Methodology* (RSM) dengan desain CCD pada hasil yang diperoleh dengan 2 variabel, tahap 2 menggunakan analisa RSM dengan desain *box-behnken design* dengan 3 variabel berdasarkan data hasil pengamatan. Data selanjutnya diperoleh optimasi dengan aplikasi *design expert 13*.