

PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT HIDROLISAT TAPIOKA DAN AKSEPTOR MINIMAL PADA PEMBENTUKAN SIKLODEKSTRIN

[The Effect of Tapioca Hydrolisate Concentration and Minimal Acceptor on Cyclodextrin Production]

Amran Laga

Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin

Diterima 2 Januari 2008 / Disetujui 27 Desember 2008

ABSTRACT

Substrate concentration is an important factor that influences the effectiveness of starch conversion to cyclodextrin by CGTase activity. The aims of this research were to produce maximum cyclodextrin at a high concentration of substrate and to compare cyclodextrin production at an acceptor minimal process by using ethanol and water at a various substrate concentration. This research was conducted by liquefy tapioca until reaching hydrolysis degree (HD) of 5 %. The hydrolisate was then fractionated its acceptor by using water and ethanol 65 %. The best result obtained was determined by statistical method, i.e. analysis of variants (anova). If there was a difference Duncan test was then used. The results were then used as substrate by suspending into phosphate buffer pH 6.0 (0.2 M). It was added CGTase into the substrate and processed at a temperature of 60 °C for 260 minutes. The results showed that the tapioca hydrolisate substrate at HD of 5 % with a minimum acceptor at concentration of 10 – 35 % could produce cyclodextrin with relative stable of conversion degree (65.73 – 67.49 %). In the minimum acceptor process by using ethanol, the maximum amount of substrate that could be used was 30 % (w/v). It produced cyclodextrin of 206.78 ± 1.43 g/l and the conversion value was 68.93 %. On the other hand, the amount of substrate concentration that could be used up to 35% (w/v) by using water as a minimum acceptor. It produced cyclodextrin of 225.76 ± 4.0 g/l with conversion value of 64.50 %.

Key words: Cyclodextrin, CGTase, hydrolysis degree, acceptor minimal, substrate concentration

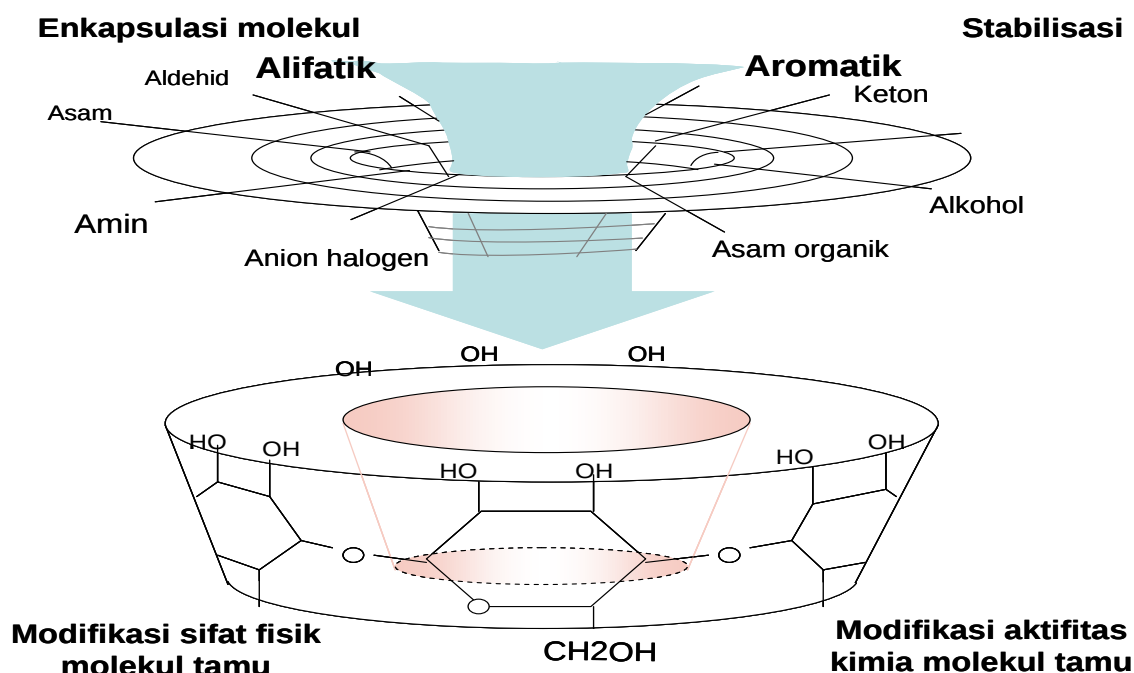
PENDAHULUAN

Siklodekstrin merupakan pati termodifikasi dalam bentuk oligosakarida non-pereduksi berbentuk cincin, tersusun dari 6, 7, atau 8 unit glukosa. Berdasarkan jumlah glukosa yang menyusun, siklodekstrin dibedakan atas α , β , dan γ -siklodekstrin (Blackwood and Bucke, 2000). Siklodekstrin merupakan produk modifikasi dari pati dengan aktifitas enzim CGTase (siklodekstrin glikosil transferase).

Siklodekstrin dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri antara lain pada industri pangan, farmasi, kimia, dan kosmetik. Pada industri pangan, siklodekstrin digunakan sebagai antioksidan dan pengikat flavor serta senyawa-senyawa volatil lainnya. Dalam industri farmasi, siklodekstrin digunakan untuk perbaikan sifat fisik, kimia, dan biologi obat-obatan. Dalam industri pertanian digunakan untuk meningkatkan kelarutan komponen kimia pestisida dan insektisida yang sulit larut dalam air. Siklodekstrin dapat berinteraksi dengan senyawa lain (molekul tamu) kemudian membentuk kompleks inklusi dengan keseimbangan dinamik (Vokk *et al.* 1991). Kompleks inklusi yang terbentuk dapat menimbulkan sifat baru pada molekul tamu tersebut, seperti peningkatan stabilitas dan peningkatan kelarutan dalam air (Oakes *et al.* 1991). Ilustrasi pembentukan kompleks inklusi siklodekstrin dengan senyawa lain dapat dilihat pada Gambar 1.

Kondisi substrat merupakan faktor penting yang mempengaruhi efektivitas konversi pati menjadi siklodekstrin oleh aktivitas CGTase. Pati gelatinisasi pada konsentrasi tinggi sulit digunakan karena viskositas pasta yang tinggi. Viskositas tapioka tergelatinisasi pada konsentrasi 5 dan 10 % (b/v) adalah sebesar 2360 cP dan 15360 cP. Kondisi tersebut tidak memungkinkan untuk digunakan pada konsentrasi 10 % (b/v) atau lebih.

Tapioka terlebih dahulu dilikuiifikasi menggunakan α -amilase untuk mengatasi hambatan viskositas pada penggunaan substrat dengan konsentrasi tinggi. Namun, proses likuiifikasi akan menimbulkan masalah baru dengan terbentuknya komponen oligosakarida dan gula sederhana yang berpotensi menghambat reaksi pembentukan siklodekstrin. Menurut Schmid (1989) bahwa proses likuiifikasi pati menggunakan α -amilase akan menghasilkan pati rantai pendek berupa maltooligosakarida dan gula sederhana yang bersifat sebagai akseptor. Maltooligosakarida atau akseptor yang terdapat di dalam medium reaksi pada konsentrasi DE melebihi 20 % menyebabkan terjadinya reaksi *coupling* dan disproporsionasi, sehingga menghambat reaksi pembentukan siklodekstrin.



Gambar 1 Ilustrasi pembentukan kompleks inklusi siklodekstrin dengan berbagai senyawa

Berdasarkan permasalahan tersebut maka komponen gula sederhana dan oligosakarida (maltosa, maltotriosa, dan maltotetraosa) yang terdapat di dalam hidrolisat pati perlu diminimalkan, sehingga reaksi siklisisasi pembentukan siklodekstrin dapat berlangsung optimal. Pemisahan komponen oligosakarida rantai pendek dan gula sederhana dalam hidrolisat berdasarkan tingkat kelarutannya dalam suatu pelarut. Menurut Houghton dan Raman (1998), penggunaan pelarut untuk fraksinasi senyawa kimia dilakukan berdasarkan tingkat polaritasnya, misalnya pelarut dengan polaritas tinggi untuk fraksinasi senyawa kelompok gula dan asam-asam amino. Berdasarkan tingkat kelarutan komponen oligosakarida rantai pendek dan gula sederhana (gula pereduksi) yang bersifat polar maka digunakan pelarut air dan etanol untuk memisahkan atau meminimalkan komponen gula pereduksi tersebut.

Tujuan penelitian adalah menghasilkan siklodekstrin yang maksimal pada penggunaan substrat konsentrasi tinggi, mendapatkan konsentrasi substrat yang optimal untuk menghasilkan siklodekstrin yang maksimal, dan membandingkan perolehan siklodekstrin pada proses minimalisasi akseptor (oligosakarida rantai pendek dan gula sederhana) menggunakan air dengan etanol pada variasi konsentrasi substrat.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah tapioka (Gunung Agung) dan α -amilase (Termamyl 120 KNU/g), CGTase (Toruzyme 3.0 KNU/g) yang diperoleh dari Novo Nordisk (Denmark). Tapioka yang digunakan mengandung pati sebesar 84.59 % yang terdiri dari komponen amilosa 23.74 % dan amilopektin 76.26 %. Alat-alat yang digunakan meliputi *shaker inkubator* (Barnstead/Lab-line Max^Q 4000), spektrofotometer (UV/VIS spectrophotometer SP-3000 Plus OPTIMA JAPAN), pH meter (Dakton pH 510 Series), mikropipet (Eppendorf Adjustabele Volume Pipettors), sentrifugasi (Heraeus Labofuge A), "hot plate" (Hot plate Stirer CB 302 Stuart), oven (Mettler), kromatografi gas (GC), viskositometer (Brookfield DV-E Viscosimeter) dan peralatan gelas.

Metode

Persiapan substrat dimulai dengan proses likuifikasi tapioka dengan penambahan α -amilase sebanyak 0.10 % (b/bk substrat) ke dalam suspensi tapioka. Suspensi tapioka dipanaskan hingga mencapai suhu 66 °C untuk memperoleh hidrolisat dengan tingkat DH 5. Hidrolisat yang diperoleh disimpan dalam ruang pendingin selama 48 jam, kemudian fraksi encer dipisahkan dan endapan yang diperoleh disuspensikan ke dalam pelarut yang digunakan (air dan etanol 65 %) dengan perbandingan 1 : 2. Campuran tersebut disimpan kembali dalam ruang pendingin selama 24 jam, kemudian fraksi encer dipisahkan dan endapan yang

diperoleh digunakan sebagai substrat untuk produksi siklodekstrin.

Substrat yang diperoleh pada proses minimalisasi akseptor (gula sederhana) menggunakan air disuspensikan ke dalam bufer fosfat pH 6.0 (0.2 M) sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan (10 – 40 % (b/v)). Substrat kemudian ditambahkan etanol 10 % (v/v) dan CGTase sebanyak 100 U/gram substrat. Proses selanjutnya substrat diinkubasi dalam inkubator goyang dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 60 °C selama 260 menit.

Substrat yang diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol, sebelum disuspensikan ke dalam bufer fosfat pH 6.0 (0.2 M), terlebih dahulu dilakukan pengukuran kadar alkohol (etanol) dengan kromatografi gas. Selanjutnya substrat ditambahkan CGTase sebanyak 100 unit/g substrat. Lalu diinkubasi dalam inkubator goyang dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 60 °C, selama 260 menit.

Parameter yang diamati meliputi kadar gula pereduksi substrat (metode DNS), DE (dextrosa equivalen) substrat, kadar pati substrat ditentukan secara spektrofotometer (metode iod), viskositas substrat metode Jane dan Chen (1992), kadar gula pereduksi produk (metode DNS), DE (dekstrosa equivalen) produk dan perolehan siklodekstrin serta nilai konversi substrat menjadi siklodekstrin. Perolehan siklodekstrin ditentukan dengan metode Kitahata (1988), yakni selisih total gula (metode fenol-asam sulfat) dengan kadar gula pereduksi (metode DNS).

Penelitian disusun dengan rancangan acak lengkap pola faktorial (2 x 7). Faktor pertama adalah jenis pelarut (air dan etanol) dan faktor kedua adalah konsentrasi substrat dengan 7 taraf (10, 15, 20, 25, 30, 35 dan 40) %. Percobaan dilakukan dengan ulangan sebanyak 3 kali. Jika perlakuan berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap gula pereduksi dan DE substrat

Pengukuran gula pereduksi dan DE substrat dimaksudkan untuk memperoleh gambaran gula pereduksi dan DE awal sebelum terjadi reaksi. Gula pereduksi dan DE substrat diupayakan seminimal mungkin karena gula pereduksi awal dalam jumlah yang cukup akan memacu reaksi transglukosilasi intermolekuler (reaksi dengan akseptor) dan menghambat reaksi transglukosilasi intramolekuler (reaksi pembentukan siklodekstrin).

Hasil pengamatan gula pereduksi substrat berkisar antara 1.23 – 6.93 g/l dan DE substrat berkisar antara 0.52 - 1.73 %. Hasil analisis sidik ragam gula pereduksi dan DE substrat, masing-masing berpengaruh

sangat nyata pada perlakuan minimalisasi akseptor, konsentrasi substrat dan interaksi antara kedua perlakuan tersebut.

Gula pereduksi substrat terendah diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air dengan konsentrasi substrat 10 % (b/v). Sebaliknya gula pereduksi substrat tertinggi diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air dengan konsentrasi substrat 40 % (b/v). DE substrat terendah diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol pada konsentrasi substrat 40 % (b/v), sedang DE tertinggi diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air dengan konsentrasi substrat 40 % (b/v). Hasil uji lanjut Duncan ($\alpha=0.05$) pada perlakuan konsentrasi substrat terhadap gula pereduksi menunjukkan perbedaan yang nyata antara satu dengan lainnya, sedangkan DE substrat tidak berbeda nyata satu dengan lainnya kecuali terhadap perlakuan konsentrasi 10 %. Profil perubahan gula pereduksi dan DE pada penggunaan variasi konsentrasi substrat dengan minimalisasi akseptor menggunakan air dan etanol dapat dilihat pada Gambar 2.

Penggunaan air dan etanol pada proses minimalisasi akseptor hidrolisat menunjukkan penurunan yang efektif. Hal ini disebabkan karena gula sederhana hasil hidrolisat dapat larut dengan baik dalam air dan etanol.

Kemampuan gula sederhana larut dalam air dan etanol, dipengaruhi oleh interaksi antara pelarut (air dan etanol) dengan gula, serta antara gula satu dengan gula yang lain. Etanol merupakan pelarut organik dengan tingkat polaritas sedang (4.3) dibandingkan dengan tingkat polaritas air yang tinggi (10.2) (Houghton dan Raman, 1998). Pada tingkat polaritas tersebut terjadi gaya tarik-menarik antara gula dengan gula, serta antara gula dengan pelarut yang seimbang dalam medium dispersi. Hal ini menyebabkan gula - gula sederhana dalam medium tidak dapat menyatu, sehingga tidak terjadi pengendapan gula sederhana.

Kemampuan pelarut tersebut untuk melarutkan gula sederhana disebabkan oleh tiga hal: (1) pelarut tersebut mempunyai polaritas yang tinggi (Houghton dan Raman, 1998), (2) ukuran molekul gula sederhana relatif kecil dan (3) gula sederhana memiliki sejumlah gugus hidroksil.

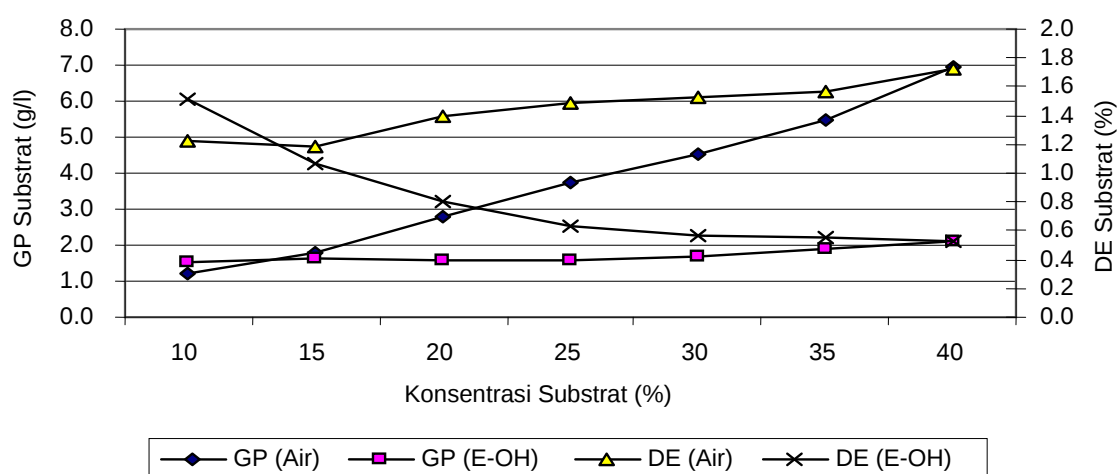
Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kadar pati dan viskositas substrat

Pengukuran kadar pati dimaksudkan untuk mengetahui jumlah pati dalam substrat setelah proses likuifikasi dan minimalisasi akseptor, sebelum reaksi pembentukan siklodekstrin. Demikian pula halnya dengan viskositas substrat, dimaksudkan untuk memperoleh gambaran tingkat kekentalan medium sebelum reaksi berlangsung, karena akan berpengaruh dalam proses pengadukan dan reaksi enzimatik.

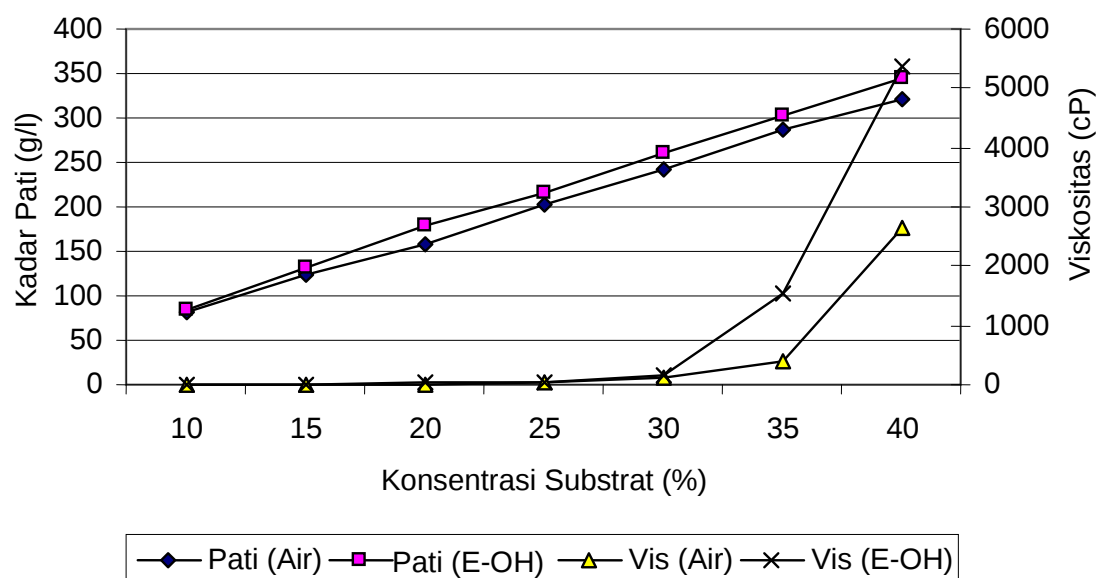
Hasil pengamatan kadar pati dari semua perlakuan berkisar antara 82.35 – 343.48 g/l. Hasil analisis sidik ragam perlakuan minimalisasi akseptor, konsentrasi substrat, dan interaksi antara kedua perlakuan tersebut berpengaruh sangat nyata terhadap kadar pati substrat. Kadar pati terendah diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air pada konsentrasi substrat 10 %. Sebaliknya kadar pati tertinggi diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol dengan konsentrasi substrat 40 % (b/v). Hasil uji lanjut Duncan ($\alpha=0.05$) untuk berbagai kombinasi perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata, kecuali perlakuan minimalisasi akseptor

menggunakan air dan etanol pada masing-masing konsentrasi substrat 15 % dan 10 % tidak berbeda nyata terhadap kadar pati substrat.

Kadar pati rata-rata lebih besar pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol daripada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air (Gambar 2). Hal tersebut disebabkan terjadinya penurunan proporsi kandungan maltooligosakarida dan gula sederhana di dalam substrat. Penurunan komponen tersebut disebabkan karena proses pengenceran yang dilakukan untuk mereduksi kelebihan etanol di dalam substrat. Proses ini menyebabkan peningkatan kadar pati secara proporsional.



Gambar 2 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap gula pereduksi (GP) dan DE substrat dengan minimalisasi akseptor menggunakan air dan etanol



Gambar 3 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kadar pati (KP) dan viskositas (Vis) substrat dengan minimalisasi akseptor menggunakan air dan etanol

Peningkatan kandungan pati substrat tersebut diikuti dengan peningkatan viskositas substrat. Hasil pengukuran viskositas substrat dari semua perlakuan berkisar antara 5.20 – 5,366.67 cP. Hasil analisis sidik ragam terhadap perlakuan minimalisasi akseptor, konsentrasi substrat, dan interaksi antara kedua perlakuan tersebut berpengaruh sangat nyata terhadap viskositas substrat. Viskositas terendah diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol dengan konsentrasi substrat 10 % (b/v), sedangkan viskositas tertinggi diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol pada taraf konsentrasi substrat 40 % (b/v). Hasil uji lanjut Duncan ($\alpha:0.05$) untuk semua kombinasi perlakuan, menunjukkan perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air dan etanol pada konsentrasi substrat 10, 15, 20, 25 dan 30 % tidak berbeda nyata satu dengan yang lainnya, tetapi berbeda nyata terhadap perlakuan konsentrasi 35 dan 40 %.

Viskositas substrat yang diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol, rata - rata lebih besar (1,019.03 cP) daripada penggunaan air (463.05 cP). Perbedaan tersebut disebabkan karena pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol, kadar pati rata-rata lebih besar daripada perlakuan menggunakan air. Perlakuan konsentrasi substrat antara 10 sampai 25 % diikuti dengan peningkatan viskositas substrat, tetapi peningkatan konsentrasi substrat tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap viskositas substrat. Peningkatan konsentrasi substrat yang lebih besar (30 – 40 %) menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap viskositas substrat.

Secara umum peningkatan viskositas substrat disebabkan oleh peningkatan kadar pati substrat. Menurut Lee dan Kim (1991) peningkatan konsentrasi pati dengan perlakuan pemanasan akan diikuti dengan peningkatan viskositas secara eksponensial. Selanjutnya Jane dan Chen (1992) melapor bahwa peningkatan konsentrasi larutan amilosa diikuti dengan peningkatan viskositas secara linier, sedangkan peningkatan konsentrasi larutan amilopektin juga meningkatkan viskositas walaupun tidak secara linier (bersifat kuadrat).

Peningkatan viskositas pasta disebabkan oleh banyaknya air yang terikat melalui ikatan H pada gugus hidroksil dari komponen amilosa dan amilopektin, sehingga pergerakan air menjadi berkurang. Peningkatan viskositas tersebut merupakan efek sinergis dari ukuran molekul, interaksi antara komponen amilosa dan amilopektin, dan konsentrasi komponen tersebut (Jane dan Chen, 1992).

Penggunaan hidrolisat tapioka sebanyak 10 % (b/v) sebagai substrat menunjukkan viskositas yang lebih kecil (5.76 cP), dibandingkan dengan tapioka 10 % (b/v) tergelatinisasi (15,360 cP). Viskositas tertinggi (5,366.67 cP) diperoleh pada perlakuan minimalisasi

akseptor menggunakan etanol dengan konsentrasi substrat 40 % (b/v) (Gambar 3). Keadaan tersebut menunjukkan bahwa tapioka terlikuifikasi pada tingkat DH 5, masih efektif digunakan hingga konsentrasi 35 % (b/v). Lee dan Kim (1991) melaporkan bahwa viskositas pati jagung pada konsentrasi 7 dan 10 % yang dipanaskan (gelatinisasi), memiliki viskositas sebesar 770.1 dan 30,003.4 cP. Akibatnya penggunaan pati tersebut tidak dapat melebihi konsentrasi 7 %.

Viskositas hidrolisat tapioka pada tingkat DH-5 lebih rendah dibandingkan dengan viskositas tapioka gelatinisasi pada tingkat konsentrasi yang sama. Hal tersebut disebabkan oleh terjadinya pemotongan rantai molekul pati secara acak, sehingga pati dengan rantai molekul panjang dirubah menjadi rantai molekul lebih pendek.

Panjang rantai polisakarida menurut Rapaille dan Van Hemedrijeck (1992) menentukan tingkat viskositas pasta. Polisakarida berantai pendek akan membentuk pasta dengan kekentalan lebih rendah dibandingkan dengan pasta pati yang mempunyai rantai polisakarida lebih panjang. Tingkat viskositas pasta juga dipengaruhi oleh interaksi antara molekul pati seperti lilitan antara molekul - molekul bercabang (Jane dan Chen, 1992).

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap gula pereduksi dan DE produk

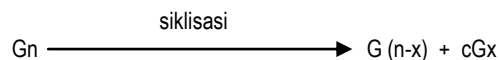
Pengukuran gula pereduksi dan DE produk dimaksudkan untuk memperoleh gambaran aktivitas katalisis dari CGTase selama reaksi berlangsung. Pengukuran tersebut perlu dilakukan mengingat CGTase selain melakukan reaksi siklisasi yang akan menyisakan sejumlah rantai pendek yang bersifat pereduksi, CGTase juga mengatalisis reaksi *coupling* yaitu reaksi dekomposisi siklodekstrin dan reaksi disproporsionasi. Aktivitas reaksi *coupling* tersebut sangat dipengaruhi oleh jumlah gula pereduksi dalam medium reaksi. Gula pereduksi akan bersifat sebagai akseptor dalam reaksi dekomposisi siklodekstrin.

Hasil pengukuran gula pereduksi produk dari semua perlakuan berkisar antara 19.65 – 72.06 g/l. Hasil analisis sidik ragam perlakuan minimalisasi akseptor, konsentrasi substrat, dan interaksi antara kedua perlakuan tersebut berpengaruh sangat nyata terhadap gula pereduksi substrat. Gula pereduksi terendah diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air dengan konsentrasi substrat 10 % (b/v), sedangkan gula pereduksi tertinggi diperoleh pada perlakuan dengan menggunakan air pada konsentrasi substrat 35 % (b/v). Hasil uji lanjut Duncan ($\alpha=0.05$) pada perlakuan konsentrasi substrat terhadap gula pereduksi produk, menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan satu dengan yang lainnya, kecuali pada perlakuan konsentrasi 35 dan 40 % tidak berbeda nyata.

Hasil perhitungan DE produk berkisar antara 17.58 – 23.70 %. Nilai DE terendah diperoleh pada perlakuan menggunakan etanol pada konsentrasi substrat 40 % (b/v), sedang DE tertinggi juga diperoleh pada perlakuan menggunakan etanol dengan konsentrasi substrat 20 % (b/v). Hasil uji lanjut Duncan ($\alpha=0.05$) pada perlakuan konsentrasi substrat terhadap DE produk menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antara perlakuan konsentrasi 10, 15, 25, 30, dan 35 %, tetapi berbeda nyata terhadap perlakuan konsentrasi 20 dan 40 %.

Peningkatan kadar gula pereduksi produk (Gambar 4) seiring dengan peningkatan konsentrasi substrat, tetapi nilai DE produk tidak mengalami peningkatan. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan gula pereduksi merupakan peningkatan secara proporsional, sebagai produk samping dari peningkatan aktivitas pembentukan siklodekstrin.

Aktivitas siklisasi substrat pati membentuk siklodekstrin akan menyisakan sejumlah komponen rantai pendek yang tidak dapat dikonversi menjadi siklodekstrin. Akumulasi rantai pendek tersebut menyebabkan peningkatan kadar gula pereduksi. Menurut Kitahata (1988) dan Tankova (1998) pembentukan siklodekstrin dari substrat (pati atau maltooligosakarida) melalui reaksi siklisasi CGTase, juga menghasilkan gula sederhana (molekul rantai pendek). Pembentukan siklodekstrin dan gula sederhana tersebut melalui reaksi seperti berikut:



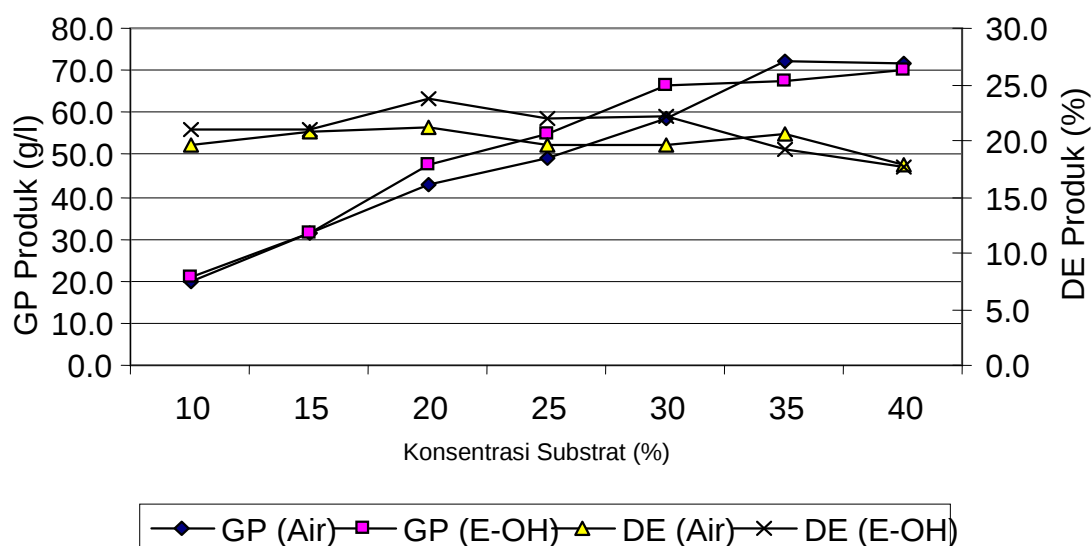
Keterangan:

Gn = Rantai lurus maltooligosakarida yang mengandung n sebagai unit dari 1,4- α -D-glukopiranos

cGx = Siklodekstrin dengan x sebagai unit 1,4- α -D-glukopiranos

Peningkatan konsentrasi substrat menunjukkan nilai DE produk tetap stabil (Gambar 4). Hal tersebut menunjukkan terhambatnya aktivitas reaksi nonsiklisasi (disproporsionasi dan *coupling*). Fenomena ini juga dipengaruhi oleh penggunaan substrat dengan akseptor minimal, serta penambahan etanol 10 % (v/v) yang berperan dalam pembentukan kompleks inklusi dengan siklodekstrin, sehingga reaksi *coupling* dapat dicegah.

Kompleks inklusi yang terbentuk antara siklodekstrin dengan molekul tamu menimbulkan sifat baru dari molekul tersebut (Oakes *et al.* 1991). Selanjutnya Blackwood dan Bucke (2000) melaporkan bahwa terbentuknya kompleks inklusi antara siklodekstrin dengan pelarut organik menyebabkan perubahan konformasi struktur siklodekstrin, sehingga kontak antara siklodekstrin dengan CGTase terhambat. Perubahan struktur siklodekstrin tersebut menyebabkan CGTase tidak dapat mengenali sisi aktif siklodekstrin, sehingga terlepas dari proses hidrolisis



Gambar 4 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap gula pereduksi (GP) dan DE produk dengan minimalisasi akseptor menggunakan air dan etanol

Proses pembentukan kompleks inklusi antara siklodekstrin dengan etanol merupakan suatu cara untuk menghindari degradasi siklodekstrin. Akibatnya pembentukan gula pereduksi berkurang selama reaksi. Hal tersebut nampak dari nilai DE produk yang relatif stabil. Penambahan etanol 10 % (v/v) ke dalam medium reaksi dapat menghambat laju pembentukan gula pereduksi selama reaksi pembentukan siklodekstrin berlangsung (Lee dan Kim, 1991; Blackwood dan Bucke, 2000).

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap perolehan siklodekstrin dan nilai konversi

Perolehan siklodekstrin dari semua perlakuan berkisar antara 65.22 – 225.76 g/l dengan nilai konversi antara 36.43 – 68.93 %. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penggunaan jenis pelarut air dan etanol untuk minimalisasi akseptor dan variasi konsentrasi substrat serta interaksinya berpengaruh sangat nyata terhadap perolehan siklodekstrin dan nilai konversi.

Nilai konversi terendah (36.43 %) diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol dengan konsentrasi substrat 40 %, sedangkan nilai konversi tertinggi (68.93 %) diperoleh pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol dengan konsentrasi substrat 30%. Perlakuan konsentrasi substrat antara 10 – 30 % (b/v) menghasilkan siklodekstrin dengan nilai konversi yang stabil pada kisaran 65.73 – 67.49 %. Uji lanjut Duncan pada perlakuan tersebut tidak berbeda nyata satu dengan yang lainnya. Namun, pada penggunaan konsentrasi substrat yang lebih tinggi (35 dan 40 % b/v) nilai konversi menurun menjadi 55.50 % dan 40.14 %. Hasil lanjut uji Duncan penurunan nilai konversi tersebut berbeda nyata satu dengan lainnya. Stabilitasnya tingkat konversi pembentukan siklodekstrin pada penggunaan substrat antara 10 – 30 % (b/v) (Gambar 5), menunjukkan bahwa penggunaan substrat hidrolisat tapioka dengan akseptor minimal pada tingkat DH-5 merupakan kondisi substrat yang optimal untuk dikonversi menjadi siklodekstrin.

Perlakuan peningkatan konsentrasi substrat cenderung diikuti dengan peningkatan perolehan siklodekstrin (Gambar 5). Perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air, siklodekstrin tertinggi (225.76 g/l) diperoleh pada penggunaan substrat 35 % (b/v), sedangkan untuk minimalisasi akseptor menggunakan etanol, siklodekstrin tertinggi (206.78 g/l) diperoleh pada penggunaan substrat 30 % (b/v).

Perolehan siklodekstrin sebesar 225.76 g/l pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air dengan konsentrasi substrat 35 % (b/v) merupakan perolehan siklodekstrin tertinggi dari semua kombinasi perlakuan. Perolehan siklodekstrin tersebut pada uji lanjut Duncan ($\alpha=0.05$) menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap semua kombinasi perlakuan lainnya. Perolehan siklodekstrin sebesar 206.78 g/l pada

perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol dengan konsentrasi substrat 30 % (b/v) pada uji lanjut Duncan ($\alpha=0.05$) menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap semua kombinasi perlakuan lainnya, tetapi tidak berbeda nyata terhadap perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air dengan konsentrasi substrat 30 % (b/v) dengan perolehan siklodekstrin sebesar 198.18 g/l.

Pembentukan siklodekstrin yang maksimal tersebut disebabkan karena beberapa hal, yakni substrat yang digunakan mempunyai struktur yang lebih sederhana, terhambatnya pembentukan gula pereduksi selama reaksi, dan degradasi siklodekstrin dapat dihambat karena terbentuknya kompleks inklusi antara siklodekstrin dengan etanol. Menurut Tankova (1998) penambahan pelarut organik ke dalam campuran reaksi akan meningkatkan perolehan siklodekstrin 50 – 55 %, karena terbentuknya kompleks inklusi antara siklodekstrin dengan pelarut organik, sehingga siklodekstrin yang terbentuk tidak mengalami hidrolisis.

Perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol pada konsentrasi substrat antara 15 – 30 %, menunjukkan perolehan siklodekstrin dan nilai konversi lebih besar daripada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air pada taraf konsentrasi yang sama (Gambar 5). Hal tersebut dapat disebabkan oleh dua faktor, (1) karena kadar gula pereduksi dan DE substrat lebih kecil pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol daripada perlakuan menggunakan air, dan (2) kadar pati substrat lebih besar pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol daripada perlakuan menggunakan air.

Perlakuan peningkatan konsentrasi substrat sampai 35 % pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air menunjukkan perolehan siklodekstrin yang maksimal (225.76 g/l) dengan konversi 64.50 %. Sebaliknya pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol perolehan siklodekstrin mengalami penurunan (163.09 g/l) dengan konversi 46.60 %. Perolehan tersebut menunjukkan produksi siklodekstrin pada perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air dapat digunakan sampai konsentrasi 35 % (b/v). Pada produksi siklodekstrin dengan perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol konsentrasi substrat maksimum digunakan sampai 30 % (b/v). Perolehan siklodekstrin tersebut menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan perolehan siklodekstrin (146.5 g/l) pada penggunaan substrat konsentrasi 30 % (b/v) (perlakuan 1 – 30 % pati terlikuifikasi) yang dilaporkan Mattsson *et al.* (1991).

Pembentukan siklodekstrin yang berlangsung optimal sampai tingkat konsentrasi substrat 30 – 35 % (b/v) disebabkan oleh jumlah gula pereduksi substrat dan gula pereduksi yang terbentuk selama reaksi rendah dan viskositas pasta yang kecil, serta rantai molekul pati dalam substrat relatif panjang (DH-5).

Reaksi pembentukan siklodekstrin menurut Schmid (1989) hanya dapat efisien jika substrat yang digunakan nilai DE-nya tidak melebihi 20 %. Selain itu, menurut Kitahata (1988) substrat yang hanya mengandung amilosa atau amilopektin maka katalisis CGTase semata-mata mengkatalisis reaksi transglukosilasi intramolekuler untuk menghasilkan siklodekstrin, sehingga selama reaksi berlangsung siklodekstrin terus mengalami peningkatan.

Perlakuan konsentrasi substrat 35 % (b/v) dengan minimalisasi akseptor menggunakan etanol, menunjukkan penurunan perolehan siklodekstrin dan nilai konversi. Fenomena tersebut disebabkan karena viskositas substrat telah mencapai nilai 1,525 cP. Akibatnya antara enzim dengan substrat tidak dapat berinteraksi dengan baik. Faktor lain yang berpengaruh adalah aktivitas CGTase terhambat akibat peningkatan konsentrasi substrat yang semakin besar. Kedua faktor tersebut terjadi karena adanya peningkatan kadar pati substrat yang signifikan (303.87 g/l) dibandingkan dengan kadar pati substrat (287.63 g/l) pada penggunaan air dengan tingkat konsentrasi substrat yang sama (35 %, b/v). Pengaruh faktor tersebut semakin jelas pada perlakuan konsentrasi substrat 40 % (b/v) dengan perolehan siklodekstrin dan nilai konversi semakin kecil (Gambar 5).

Penggunaan substrat dengan konsentrasi yang tinggi umumnya menunjukkan produktivitas siklodekstrin yang rendah. Hal tersebut seperti yang dilaporkan Mattsson *et al.* (1991) pada penggunaan pati jagung terlikuifikasi dengan penambahan etanol

mengalami penurunan derajat konversi dari 70 % menjadi 48.83 % pada peningkatan konsentrasi substrat (1 - 30 %). Fenomena yang sama dilaporkan Lee dan Kim (1991) pada penggunaan pati jagung tanpa likuifikasi dengan beberapa tingkat konsentrasi substrat (5 - 20 %) dihasilkan siklodekstrin maksimal (50 g/l) pada konsentrasi substrat 15 %.

KESIMPULAN

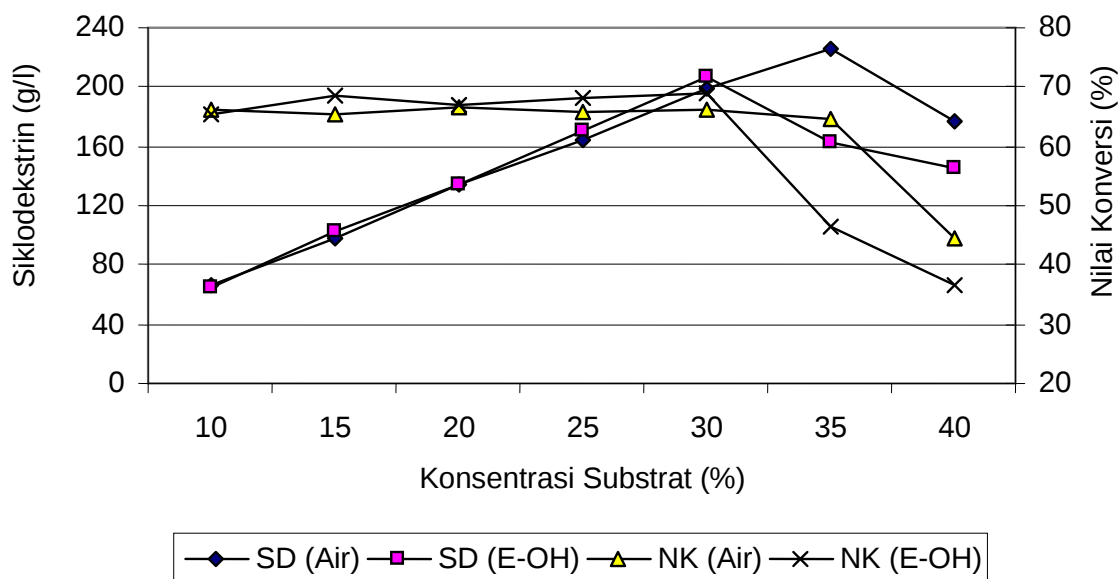
Penggunaan hidrolisat tapioka dengan akseptor minimal pada tingkat DH-5 dapat digunakan sebagai substrat sampai konsentrasi 30 - 35 % (b/v) dengan perolehan siklodekstrin yang maksimal.

Penggunaan substrat hidrolisat tapioka pada tingkat DH-5 menunjukkan viskositas yang relatif rendah hingga tingkat konsentrasi substrat 30 % (145.47 cP).

Peningkatan konsentrasi substrat antara 10 - 30 % (b/v) diikuti dengan peningkatan perolehan siklodekstrin (65.73 - 202.48 g/l) dengan derajat konversi yang relatif stabil (65.73 - 67.49 %).

Perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan etanol, substrat maksimum digunakan sampai konsentrasi 30 % (b/v) dengan perolehan siklodekstrin 206.78 ± 1.43 g/l dan nilai konversi sebesar 68.93 %.

Perlakuan minimalisasi akseptor menggunakan air, substrat dapat digunakan sampai konsentrasi 35 % (b/v) dengan perolehan siklodekstrin sebesar 225.76 ± 4.0 g/l dan nilai konversi 64.50 %.



Gambar 5 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap perolehan siklodekstrin (SD) dan nilai konversi (NK) dengan minimalisasi akseptor menggunakan air dan etanol

DAFTAR PUSTAKA

- Blackwood AD, Bucke C. 2000. Addition of polar organic solvents can improve the product selectivity of cyclodextrin glycosyltransferase solvent effects on CGTase. *J Enzyme and Microbial Technol* 27: 704-708.
- Houghton PJ, Raman A. 1998. *Laboratory Handbook for The Fractination of Natural Extracts*. London: Chapman and Hall.
- Jane JL, Chen JF. 1992. Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch. *J Cereal Chem* 69(1): 60-65.
- Kitahata S. 1988. Cyclomaltodextrin glucanotransferase. p 154-163. Di dalam: *The Amylase Research Society of Japan (ed). Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Oxford: Pergamon Press. .
- Lee YD, Kim HS. 1991. Enzymatic production of cyclodextrin from unliquefied corn starch in an attrition bioreactor. *J Biotechnol and Bioeng* 37(4): 795-891.
- Mattsson P, Korpela T, Pavilainen S, Makela M. 1991. Enhanced conversion of starch to cyclodextrin in ethanolic solutions by *Bacillus circulans* var *alkalophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase. *App Bichem and Biotechnol* 30: 17-28.
- Oakes, J.V., Shewmaker, C.K. and Stalker, D.M. 1991. Production of cyclodextrins. A novel carbohydrate in the tubers of transgenic potato plant. *J Biotechnol* 9(10): 982-987.
- Rapaille, A. and van Hemelrijck, J. 1992. Modified starch. Di dalam: Imeson A, editor. *Thickening and Gelling Agents for Food*. Madras : Blackie Academic & Profesional.
- Schmid G. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production: Yield Enhancement by Overexpression of Cloned Genes. *TIBTECH* 7(9): 244-247.
- Tankova A. 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *J Enzyme and Microbial Technol* 22: 678-686.
- Uitdehaag JCM, Kalk KH, Veen BA van der, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 1999. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase as revealed by g-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8 resolution. *J Biol Chem* 274: 34868-34876.
- Vokk R, Menert A, Saar EK. 1991. Inclusion complexes with essential oils and spices. Biotechnology of α -cyclodextrin. R&D. *BFE* 8(9): 510-516