

# PRODUKSI SIKLODEKSTRIN DARI SUBSTRAT TAPIOKA DENGAN MENGGUNAKAN PULLULANASE DAN CGTase SECARA SIMULTAN

## PRODUCTION OF CYCLODEXTRIN FROM TAPIOCA SUBSTRATE USING PULLULANASE AND CGTase SIMULTANEOUSLY

Amran Laga

Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan  
Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin - Makassar

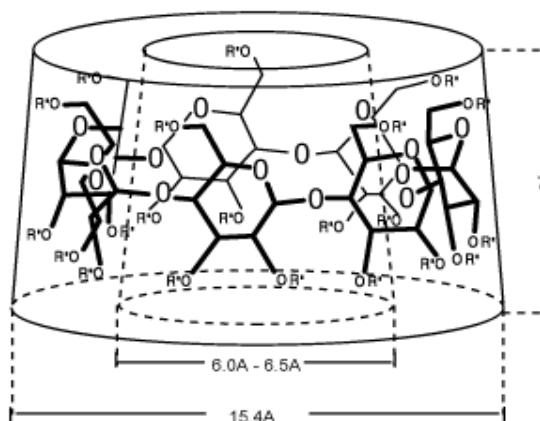
### ABSTRACT

Cyclodextrin is a modified starch which can be produced from the branched-chain of tapioca starch by the enzyme CGTase activity. This enzyme attacks the straight-chain of amylopectin of the substrate produced simultaneously by the hydrolyzing enzyme pullulanase on the tapioca starch. The aims of this research were to determine the best of temperature and reaction time on production step and to determine the best of concentration of the starch substrate to produce cyclodextrin. The temperature and reaction time applied were 50, 55 and 60 °C for up to 360 minutes and sampling was conducted every 30 minutes, while the concentration of starch applied were 20, 25, 30, 35 and 40% (w/v). Parameters measured were reducing sugar, starch residue, dextrose equivalent, viscosity and yield of cyclodextrin. The result showed that the branched-chain of starch was converted by the CGTase enzyme into cyclodextrin and reducing sugars. The best of temperature and reaction time for producing cyclodextrin were 60 °C and 210 minutes, respectively, which gave the highest conversion rate of cyclodextrin (~70,10 %) on 20% (w/v) tapioca substrate. Furthermore, the best of concentration of the tapioca substrate was 30% (w/v) which gave the similar highest conversion rate cyclodextrin (69.96%) and yield (209.89 g/L). These were derived from the same condition of temperature and reaction time (60 °C and 210 minutes).

**Keywords:** cyclodextrin, cyclization, hydrolyzing, substrate concentration, pullulanase and CGTase

### PENDAHULUAN

Siklodekstrin merupakan oligosakarida non-pereduksi produk modifikasi pati dengan struktur kimia berbentuk cincin, dan terbentuk melalui proses siklisasi oleh aktivitas CGTase (*Cyclodextrin glycosil transferase*) (Szejtli, 1988; Schmid, 1989; Tankova, 1998). Berdasarkan jumlah glukosa yang menyusunnya, siklodekstrin dibedakan atas  $\alpha$ -siklodekstrin (6 unit glukosa),  $\beta$ -siklodekstrin (7 unit glukosa) dan  $\gamma$ -siklodekstrin (8 unit glukosa) (Szejtli, 1988; Tankova, 1998). Struktur siklodekstrin berbentuk donat seperti ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur siklodekstrin (Uitdehaag *et al.*, 1999)

Siklodekstrin memiliki permukaan luar yang bersifat hidrofilik sedangkan bagian dalam rongganya bersifat non polar. Adanya bentuk tersebut mengakibatkan siklodekstrin dapat digunakan sebagai kompleks penginklusi dengan senyawa lain. Siklodekstrin memiliki sifat yang unik, sehingga banyak digunakan dalam berbagai industri antara lain pada industri farmasi, kosmetika, makanan, flavour, pertanian dan kimia. Pada industri farmasi digunakan untuk perbaikan sifat fisik, kimia dan biologi dari obat-obatan (Uekema dan Hirayama, 1988). Pada industri pangan dan kosmetika digunakan sebagai antioksidan dan perbaikan tekstur serta stabilitas flavor produk (Pszczola, 1988). Dalam industri pestisida dan insektisida digunakan untuk meningkatkan kelarutan komponen kimia yang sulit larut dalam air (Hashimoto, 1988).

Tapioka merupakan sumber pati yang potensial digunakan sebagai substrat untuk produksi siklodekstrin. Kondisi substrat sangat mempengaruhi aktivitas enzim CGTase dalam mengkatalisis reaksi pembentukan siklodekstrin. Tapioka mengandung komponen amilopektin yang relatif tinggi yakni 76,26-83% (Laga, 2001 dan Swinkles, 1985).

Banyaknya komponen amilopektin dengan rantai cabangnya serta tingginya viskositas pasta tapioka tersebut menyebabkan tapioka jika digunakan sebagai substrat sulit dikonversi menjadi siklodekstrin. Hal ini disebabkan karena aktivitas siklisasi CGTase lebih optimal pada molekul rantai lurus (amilosa) daripada molekul rantai cabang (amilopektin) (Whistler *et al.*, 1984).

Menurut Hamilton *et al.* (2000) untuk meng-efektifkan reaksi siklisasi pembentukan siklodekstrin dari suatu sumber pati yang banyak mengandung amilopektin dapat dimodifikasi dengan pemotongan rantai cabang menggunakan enzim *debranching*. Enzim *debranching* adalah enzim yang spesifik menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6 D-glikosidik yang terdapat pada amilopektin, glikogen dan pullulan (Nakamura *et al.*, 1989). Jenis enzim *debranching* adalah *isoamilase* (glikogen 6-glukanohidro-lase, EC. 3.2.1.68) dan *pullulanase* (pullulan 6-glukanohidrolase, EC.3.2.1.41) (Okada *et al.*, 1994).

Aktifitas optimal *pullulanase* dalam pemotongan rantai cabang berada pada suhu 50°C (Okada *et al.*, 1994), sedangkan aktifitas optimal *CGTase* adalah pada suhu 60°C (Lee *et al.*, 1992). Oleh karena itu penggunaan kedua enzim tersebut secara bersamaan dalam substrat tapioka perlu ditentukan suhu dan lama reaksi yang terbaik untuk menghasilkan siklodekstrin. Selain itu, juga perlu ditentukan konsentrasi substrat maksimal dari suhu dan lama reaksi terbaik yang diperoleh.

Mekanisme *CGTase* mengkatalisis pembentukan siklodekstrin menurut Schmid (1988) dimulai dengan pengikatan delapan sampai sepuluh unit glukosa dari molekul pati. Reaksi tersebut dimulai pada rantai glukosa dari ujung non-pereduksi. Sisi aktif dari *CGTase* terdiri dari delapan sampai sepuluh (atau lebih) *subsite* (unit glukosa yang terikat dengan *CGTase*) yang berikatan dengan molekul glukosa. Sebagai contoh, mekanisme pembentukan  $\alpha$ -siklodekstrin terjadi melalui cara pengikatan delapan unit glukosa oleh  $\alpha$ -*CGTase*, selanjutnya pemutusan ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik antara *subsite* kedua dan ketiga. Hasil antara dari reaksi tersebut adalah maltoheksosa. Maltoheksosa tersebut selanjutnya tersiklisis melalui ujung non-pereduksi yang berikatan dengan *subsite* ketiga, sehingga membentuk ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik baru antara unit glukosa satu dengan keenam dari siklomaltoheksosa.

Tujuan penelitian adalah (1) untuk menentukan suhu dan lama reaksi yang terbaik dalam pembentukan siklodekstrin dengan penggunaan *pullulanase* (enzim *debranching*) dan *CGTase* (enzim pembentuk siklodekstrin) secara bersamaan, dan (2) untuk menentukan konsentrasi substrat tapioka yang terbaik dalam pembentukan siklodekstrin dengan penggunaan *pullulanase* dan *CGTase* secara simultan.

## METODOLOGI

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi *pullulanase* dan *CGTase* (Toruzyme™ 3.0 L) produk dari Novo Nordisk, tepung tapioka, pati terlarut, glukosa standar, larutan fenol 5%, DNS, larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, larutan NaOH 0.1 N, larutan Iod, larutan KI, Kalium-Natrium Tartrat, Pb asetat, CaCl<sub>2</sub> dan CaCO<sub>3</sub>.

Alat-alat yang digunakan meliputi *shaker incubator* (Barnstead/Lab-line Max<sup>Q</sup> 4000),

spektrofotometer (UV/VIS *spectrophotometer* SP-3000 Plus OPTIMA JAPAN), pH meter (Dakton pH 510 Series), mikropipet (Eppendorf Adjustable Volume Pipettors), sentrifus (Heraeus Labofuge A), *hot plate* (Stirrer CB302 Stuart), oven (Memmert), Brookfield DV-E Viscosimeter dan peralatan gelas.

### Metode

Dalam proses katalisis pemutusan rantai cabang amilopektin, *pullulanase* optimal bekerja pada suhu 50°C, sedangkan aktivitas optimal *CGTase* dalam pembentukan siklodekstrin adalah pada suhu 60°C. Oleh karena itu dalam penggunaan enzim secara bersamaan untuk mengkonversi tapioka menjadi siklodekstrin, perlu ditentukan suhu penggabungan kedua enzim dan lama reaksi yang terbaik untuk menghasilkan siklodekstrin. Perlakuan yang digunakan adalah variasi suhu reaksi pencampuran kedua enzim tersebut, yakni suhu 50, 55 dan 60°C. Masing-masing dari suhu reaksi tersebut ditentukan lama reaksi yang terbaik dalam pembentukan siklodekstrin. Reaksi dilakukan selama 360 menit dengan pengambilan sampel setiap 30 menit. Substrat tapioka yang digunakan untuk reaksi tersebut sebanyak 20% b/v.

Suhu dan lama reaksi terbaik yang diperoleh dalam pembentukan siklodekstrin, dilanjutkan untuk penentuan konsentrasi substrat tapioka terbaik pada penggabungan kedua enzim tersebut. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 20, 25, 30, 35 dan 40 % (b/v).

Penelitian dimulai dengan membuat suspensi tapioka (konsentrasi sesuai perlakuan) lalu disuspensikan ke dalam bufer fosfat pH 6,0 (0,2 M) (Laga, 2001). Selanjutnya ion kalsium dalam bentuk CaCl<sub>2</sub> ditambahkan sebanyak 10 ppm untuk mempertahankan stabilitas enzim selama reaksi berlangsung. Suspensi tapioka digelatinisasi dengan pemanasan sampai suhu 75°C. Sebelum penambahan enzim, suhu medium diturunkan, hingga sama dengan suhu reaksi untuk inkubasi yang diperlukan. Substrat ditambahkan dengan *pullulanase* sebanyak 10 unit/gram substrat dan *CGTase* 100 unit/gram substrat serta etanol 10% (v/v) untuk pencegahan reaksi umpan balik (Mattsson *et al.*, 1991, Blackwood dan Bucke, 2000 dan Laga, 2001). Reaksi dilangsungkan dalam *shaker incubator* pada kecepatan pengadukan 200 rpm. Suhu dan lama reaksi diatur sesuai dengan perlakuan yang digunakan.

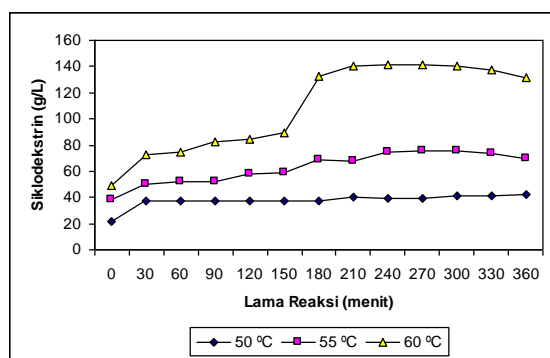
Parameter yang diamati meliputi perolehan siklodekstrin (metode Kitahata, 1988), gula pereduksi (metode DNS), kadar pati sisa metode iod (Modifikasi Laga, 2001), viskositas (Modifikasi Jane dan Chen, 1992) dan dekstrosa ekuivalen (Taji, 1988). Penelitian dilakukan dengan pendekatan eksperimen, pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Tahapan penelitian penentuan suhu dan lama reaksi yang terbaik dilakukan dengan *plotting* data, sedangkan penentuan konsentrasi substrat dilakukan dengan rancangan acak lengkap, jika berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji BNJ (beda nyata jujur).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh Suhu dan Lama Reaksi Dalam Pembentukan Siklodekstrin

#### Pembentukan Siklodekstrin

Hasil analisa perolehan siklodekstrin selama reaksi berlangsung menunjukkan bahwa pada perlakuan suhu 50 dan 55°C perolehan siklodekstrin relatif kecil dibandingkan dengan perolehan siklodekstrin pada perlakuan suhu 60°C. Perolehan siklodekstrin tertinggi pada perlakuan suhu 50°C yakni pada menit ke 300 sebesar 41,22 g/L (konversi sebesar 20,61% dari substrat yang digunakan). Siklodekstrin tertinggi pada perlakuan suhu 55°C diperoleh pada menit ke 270 yakni sebesar 75,60 g/L (konversi 37,8% dari substrat yang digunakan). Profil pembentukan siklodekstrin selama reaksi seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan suhu dan lama reaksi terhadap perolehan siklodekstrin

Rendahnya perolehan siklodekstrin pada penggunaan suhu reaksi 50 dan 55°C, menunjukkan bahwa kendatipun proses pemutusan rantai cabang amilopektin dari *pullulanase* untuk menghasilkan rantai lurus dapat berlangsung baik, tetapi aktifitas *CGTase* tidak optimal dalam melakukan aktivitas siklisasi, maka pembentukan siklodekstrin menjadi tidak optimal. Hal tersebut disebabkan karena suhu reaksi tidak optimal untuk aktifitas *CGTase*. Pembentukan siklodekstrin pada perlakuan suhu reaksi 60°C menunjukkan aktivitas siklisasi yang optimal (Gambar 2). Lama reaksi yang optimal untuk menghasilkan siklodekstrin adalah 210 menit yakni sebesar 140,20 g/L (konversi 70,10% dari substrat yang digunakan). Tingginya perolehan siklodekstrin pada suhu tersebut karena reaksi berada pada kondisi yang optimal yakni suhu 60°C dan substrat yang tersedia dalam bentuk rantai lurus, sehingga mudah mengalami proses siklisasi. Menurut Whistler *et al.* (1984) pembentukan siklodekstrin lebih optimal jika menggunakan media pati yang mengandung fraksi amilosa daripada fraksi amilopektin.

Penggunaan *pullulanase* secara simultan dengan *CGTase* dalam penggunaan media tapioka, fraksi amilopektin yang dominan pada tapioka dikonversi menjadi rantai lurus (amilosa) melalui

pemutusan rantai cabang amilopektin. Fraksi rantai lurus yang terbentuk akan lebih mudah disiklisasi oleh *CGTase* menjadi siklodekstrin. Amilopektin merupakan polimer yang tersusun dari unit glukosa dengan struktur bercabang. Rantai dasarnya adalah konformasi antara glukosa dengan ikatan  $\alpha$ -1,4 dengan titik percabangan pada ikatan  $\alpha$ -1,6 dan rata-rata panjang setiap rantai cabang sekitar 20-25 unit glukosa (Pomeranz, 1985).

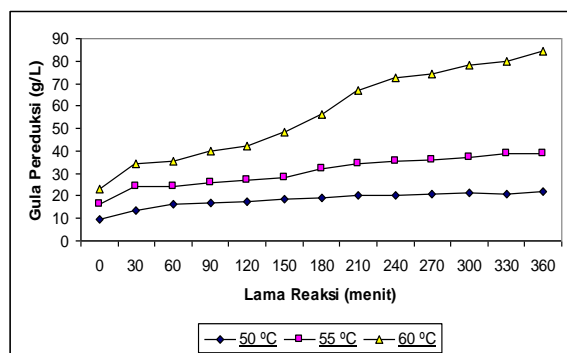
Pembentukan siklodekstrin pada suhu 60°C merupakan kondisi terbaik yang diperoleh dengan lama reaksi 210 menit (3.5 jam) dengan perolehan siklodekstrin 140,20 g/L (nilai konversi 70,10%). Pemotongan rantai cabang amilopektin dari *pullulanase* membentuk rantai lurus, menyebabkan pembentukan siklodekstrin berlangsung dengan cepat. Lama reaksi tersebut lebih singkat dibanding produksi siklodekstrin menggunakan hidrolisat tapioka dengan proses minimalisasi aseptor, yakni 260 menit (4 jam 20 menit) (Laga, 2001). Lama reaksi tersebut jauh lebih singkat dibanding dengan waktu reaksi yang dilaporkan Lee dan Kim (1991) dan Lee *et al.* (1992) yakni 19-24 jam untuk menghasilkan siklodekstrin maksimal pada penggunaan substrat pati jagung 10% b/v.

Perolehan siklodekstrin pada reaksi lebih lanjut (menit 240 sampai dengan menit ke 300) perolehan siklodekstrin relatif stabil. Akan tetapi pada reaksi lebih lanjut (menit ke 330 dan 360) perolehan siklodekstrin cenderung menurun (Gambar 2). Kecenderungan penurunan siklodekstrin setelah jumlah perolehan yang maksimum, disebabkan karena siklodekstrin mengalami dekomposisi kembali oleh aktivitas *CGTase* melalui reaksi *coupling*. Reaksi *coupling* tersebut disebabkan oleh akumulasi gula pereduksi yang bersifat sebagai aseptor. Akumulasi produk samping dalam bentuk gula sederhana tersebut, dapat mengganggu reaksi siklisasi dan stabilitas produk siklodekstrin. Menurut Whistler *et al.* (1984) peningkatan gula pereduksi sampai jumlah tertentu, menyebabkan perolehan siklodekstrin menjadi maksimum dan selanjutnya mengalami penguangan sampai mendekati nol.

#### Pembentukan Gula Pereduksi

Gula pereduksi yang terbentuk selama reaksi merupakan produk samping dari reaksi pembentukan siklodekstrin. Gula pereduksi tersebut pada konsentrasi tertentu akan bersifat sebagai aseptor yang menghambat pembentukan siklodekstrin.

Pembentukan gula pereduksi pada perlakuan suhu 50°C relatif kecil. Gula pereduksi tertinggi yang diperoleh pada perlakuan suhu tersebut adalah 21,80 g/L pada menit ke 360. Pada perlakuan suhu 55°C gula pereduksi yang terbentuk cenderung lebih tinggi dibanding perlakuan suhu 50°C. Gula pereduksi tertinggi yang diperoleh pada perlakuan suhu 55°C adalah 38,80 g/L pada menit ke 360 (Gambar 3).



Gambar 3. Hubungan suhu dan lama reaksi terhadap kadar gula pereduksi

Rendahnya gula pereduksi yang terbentuk pada perlakuan suhu 50 dan 55°C, menunjukkan bahwa aktifitas *CGTase* tidak optimal baik pada reaksi siklisasi (pembentukan siklodekstrin), maupun pada reaksi non-siklisasi (hidrolisis, *coupling* dan disproporsionasi). Menurut Tankova (1998) *CGTase* selain dapat mengkatalisis reaksi transglukosilasi intramolekuler (siklisasi) dan reaksi transglukosilasi intermolekuler (reaksi pembentukan maltooligosakarida dengan aseptor), *CGTase* juga mempunyai aktivitas hidrolisis pada molekul pati dan siklodekstrin.

Pembentukan gula pereduksi yang cukup besar terjadi pada perlakuan suhu 60°C. Gula pereduksi tertinggi (84,25 g/L) dihasilkan pada menit 360 (Gambar 3). Tingginya gula pereduksi yang terbentuk menunjukkan aktifitas *CGTase* berlangsung baik. Gula pereduksi yang terbentuk merupakan fragmen dari rantai panjang molekul pati yang tidak cukup untuk tersiklisasi menjadi siklodekstrin. Jumlah minimal rantai glukosa yang diperlukan untuk membentuk  $\alpha$ -siklodekstrin adalah rantai dengan 8 unit glukosa,  $\beta$ -siklodekstrin dengan 9 unit glukosa dan  $\gamma$ -siklodekstrin dengan 10 unit glukosa. Pada proses siklisasi tersebut dua unit glukosa (maltosa) yang dilepaskan bersifat sebagai pereduksi.

Pembentukan siklodekstrin menurut Schmid (1988) dimulai dengan pengikatan delapan sampai sepuluh unit glukosa dari molekul pati (lebih besar dari jumlah glukosa yang me-nyusun siklodekstrin). Proses pembentukan siklodekstrin oleh *CGTase* dengan mekanisme tersebut, terjadi berulang-ulang, sehingga akan menyisakan sejumlah molekul dekstrin yang tidak dapat tersiklisasi menjadi siklodekstrin. Molekul dekstrin tersebut akan terakumulasi, sehingga menyebabkan peningkatan gula pereduksi dalam medium produksi.

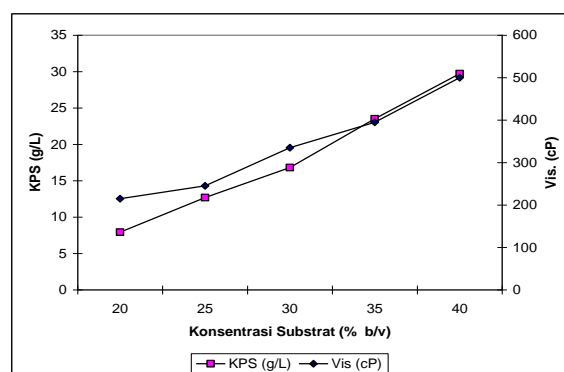
#### Penentuan Konsentrasi Substrat yang Terbaik dalam Pembentukan Siklodekstrin

Tahapan penelitian ini dilakukan dengan menggunakan suhu dan lama reaksi terbaik yang diperoleh untuk menghasilkan siklodekstrin pada penggunaan *pullulanase* dan *CGTase* secara simultan, yakni suhu 60°C dengan lama reaksi 210 menit. Parameter uji yang diamati meliputi kadar

pati sisa, gula pereduksi, perhitungan dekstrosa equivalen, viskositas, perolehan siklodekstrin dan nilai konversi.

#### Kadar Pati Sisa dan Viskositas

Hasil pengukuran kadar pati sisa setelah reaksi berlangsung menunjukkan semakin tinggi konsentrasi substrat yang digunakan, semakin tinggi pula kadar pati sisa yang diperoleh (Gambar 4). Kadar pati sisa tertinggi diperoleh pada perlakuan konsentrasi substrat 40% b/v (29,71 g/L), sedangkan kadar pati sisa terendah diperoleh pada perlakuan konsentrasi substrat 20% b/v (7,91 g/L).



Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat tapioka terhadap kadar pati sisa (KPS) dan viskositas (Vis) setelah reaksi berlangsung 210 menit

Hasil analisa sidik ragam menunjukkan pengaruh yang sangat nyata pada taraf 5% terhadap kadar pati sisa. Hasil uji lanjutan BNJ menunjukkan konsentrasi substrat 30% b/v berbeda nyata terhadap perlakuan konsentrasi 20 dan 25% (b/v), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 35 dan 40% (b/v). Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi substrat di atas 30% b/v tidak efisien digunakan. Fenomena ini menunjukkan bahwa konsentrasi substrat di atas 30% merupakan kondisi terjadinya penjenjuran enzim, yakni seluruh sisi aktif enzim berikatan dengan substrat. Menurut Vasanthan dan Bhatti (1996) substrat dengan konsentrasi rendah menyebabkan enzim tidak semuanya berikatan dengan substrat, sehingga kecepatan maksimum tidak dapat tercapai. Sebaliknya pada substrat konsentrasi tinggi, semua molekul enzim dapat membentuk ikatan kompleks dengan substrat, sehingga kecepatan reaksi menjadi lebih lama.

Hasil pengukuran viskositas menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat menyebabkan viskositas juga semakin tinggi (Gambar 4). Viskositas tertinggi diperoleh pada penggunaan pati dengan konsentrasi 40% b/v (500 cP) dan terendah pada penggunaan pati konsentrasi 20% b/v (215 cP). Hasil analisa sidik ragam menunjukkan pengaruh konsentrasi substrat yang sangat nyata pada taraf 5% terhadap viskositas. Hasil Uji BNJ menunjukkan viskositas pada penggunaan konsentrasi 30% b/v berbeda nyata terhadap perlakuan konsentrasi

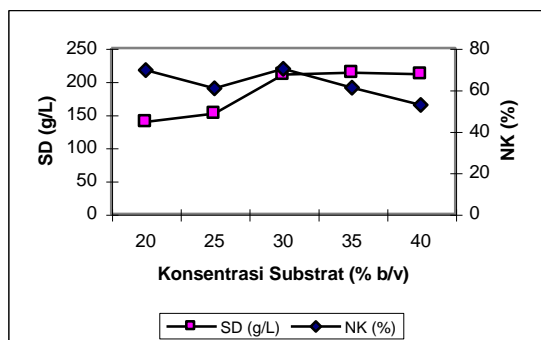
substrat 20 dan 25% b/v, tetapi tidak berbeda nyata pada perlakuan 35 dan 40% b/v.

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

Peningkatan viskositas disebabkan karena 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).

#### Perolehan Siklodekstrin dan Nilai Konversi

Hasil perolehan siklodekstrin pada penggunaan konsentrasi substrat yang bervariasi, menunjukkan peningkatan pemakaian konsentrasi substrat juga meningkatkan perolehan siklodekstrin, tetapi pada peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut (40% b/v) perolehan siklodekstrin kembali menurun (Gambar 5). Siklodekstrin tertinggi diperoleh pada perlakuan 35% (213,04 g/L). Nilai konversi pembentukan produk siklodekstrin tertinggi diperoleh pada penggunaan substrat 30% b/v yakni 69,96%. Perolehan siklodekstrin pada taraf konsentrasi tersebut menunjukkan hasil yang lebih baik, dibandingkan dengan penggunaan pati jagung terlikuifikasi pada konsentrasi 30% (b/v) yang dilaporkan Mattsson (1991), yakni 146,5 g/l dengan nilai konversi sebesar 48,83%. Demikian pula halnya nilai konversi 66% yang diperoleh Blackwood dan Bucke (2000) pada penggunaan substrat 50 g/l dengan lama reaksi 24 jam.



Gambar 5. Hubungan konsentrasi substrat tapioka terhadap perolehan siklodekstrin (SD) dan nilai konversi (NK) setelah reaksi berlangsung 210 menit

Pembentukan siklodekstrin dengan nilai konversi yang relatif tinggi pada penggunaan substrat

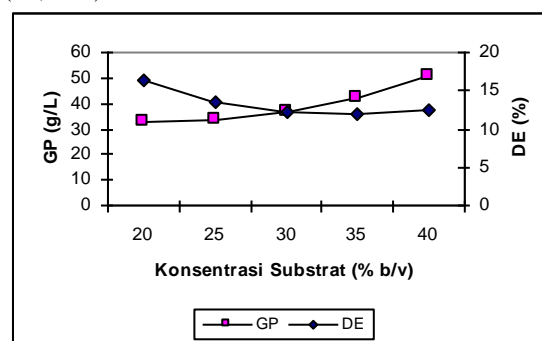
tapioka konsentrasi tinggi, menunjukkan bahwa pemakaian *pullulanase* sangat efektif. *Pullulanase* merupakan jenis enzim yang spesifik melakukan pemotongan rantai cabang pada ikatan  $\alpha$ -1,6. Fraksi amilopektin tapioka selain menyebabkan viskositas pasta tinggi, juga mempunyai struktur ikatan  $\alpha$ -1,6, sehingga sulit dikonversi oleh *CGTase* menjadi siklodekstrin. Peranan *pullulanase* dalam pemotongan rantai cabang amilopektin adalah membentuk fraksi rantai lurus, sehingga memudahkan aktifitas *CGTase* mengkonversi menjadi siklodekstrin.

Penggunaan substrat dengan konsentrasi yang tinggi umumnya menunjukkan produktivitas siklodekstrin yang rendah. Hal tersebut seperti yang 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% dan 65 g/l (Lee dan Kim, 1992), serta konversi 40% dari 15% (b/v) pada penggunaan substrat terlikuifikasi (Matzuzawa *et al.*, 1975).

Peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut menyebabkan nilai konversi cenderung menurun yakni 60,87% pada pemakaian substrat 35% b/v dan 52,61% untuk substrat 40% b/v. Kecenderungan penurunan nilai konversi untuk menghasilkan produk siklodekstrin pada pemakaian substrat konsentrasi tinggi, menunjukkan bahwa pemakaian substrat lebih dari 35% b/v aktifitas enzim terhambat oleh substrat tersebut. Menurut Mangunwidjaja dan Suryani (1994), pada reaksi yang dikatalisis enzim, laju kinetik pada konsentrasi substrat yang rendah merupakan garis lurus dan akan terhambat atau bahkan hilang pada konsentrasi substrat yang lebih tinggi.

#### Kadar Gula Pereduksi dan Dekstrosa Equivalen

Hasil pengukuran kadar gula pereduksi pada penggunaan konsentrasi substrat yang bervariasi, menunjukkan peningkatan konsentrasi substrat cenderung meningkatkan gula pereduksi, sedangkan nilai dekstrosa equivalen cenderung menurun (Gambar 6). Kadar gula pereduksi tertinggi diperoleh pada perlakuan konsentrasi substrat 40% b/v (50,35 g/L), sedangkan dekstrosa equivalen tertinggi pada perlakuan konsentrasi substrat 20% b/v (16,25%).



Gambar 6. Hubungan konsentrasi substrat tapioka terhadap kadar gula pereduksi (GP) dan dekstrosa equivalen (DE)

Peningkatan gula pereduksi tersebut merupakan dampak aktifitas siklisisasi *CGTase* pada pembentukan siklodekstrin. Pada proses siklisisasi, akan disisakan sejumlah fraksi rantai pendek yang tidak dapat disiklisisasi menjadi siklodekstrin. Fraksi rantai pendek tersebut seperti glukosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentosa dan maltoheksosa. Peningkatan aktifitas siklisisasi pembentukan siklodekstrin menyebabkan produk samping gula pereduksi tersebut juga cenderung meningkat. Akan tetapi pembentukan gula pereduksi jika dibandingkan dengan jumlah substrat yang digunakan, menunjukkan aktifitasnya katalitik yang cenderung menurun. Hal ini nampak pada penurunan dekstrosa ekuivalen dengan peningkatan konsentrasi substrat.

Akumulasi gula pereduksi yang terbentuk selama reaksi siklisisasi pada konsentrasi tertentu bersifat sebagai aseptor yang menghambat aktifitas reaksi siklisisasi. Pada kondisi demikian maka *CGTase* akan mengkatalisis reaksi non-siklisisasi (disproporsionasi dan *coupling*). Kitahata (1988) menjelaskan bahwa G2 (maltosa) dan G3 (maltotriosa) bersifat aseptor kuat yang menyebabkan siklodekstrin terdekomposisi. Menurut Okada *et al.* (1994) molekul-molekul yang bersifat aseptor kuat untuk terjadinya reaksi *coupling* adalah berturut-turut glukosa > sukrosa > maltosa. Sedangkan maltotriosa dan maltotetraosa berperan aktif pada reaksi disproporsionasi.

### KESIMPULAN

1. Suhu dan lama reaksi terbaik dalam pembentukan siklodekstrin pada penggunaan *pullulanase* dan *CGTase* secara simultan adalah suhu 60°C dengan lama reaksi 210 menit. Siklodekstrin yang diperoleh pada reaksi tersebut dengan penggunaan substrat 20% b/v adalah sebanyak 140,20 g/L (konversi 70,10%).
2. Konsentrasi substrat terbaik yang diperoleh dari variasi penggunaan substrat 20 – 40% b/v adalah konsentrasi 30% (b/v) dengan perolehan siklodekstrin sebanyak 209,89 g/L (konversi 69,96%).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M Dikti atas pembiayaan penelitian ini melalui Riset Fundamental. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Irma Dwianti atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian berlangsung.

### DAFTAR PUSTAKA

Blackwood A.D. and C. Bucke. 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.

- Hamilton L.M., C.T. Kelly dan W.M. Fogarty. 2000. Review: Cyclodextrin and their literation with amyolytic enzymes. *J. Enzymes and Microbial Technol.* 26: 561-567.
- Hashimoto H. 1988. Application of cyclodextrin, p 235-237. *Di dalam* The amylyase research society of Japan (ed). Handbook of amylyases and related enzymes. Pergamon Press. Oxford.
- Jane J.L. dan J.F. Chen. 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 amylyase research soceity of Japan (ed). Handbook of amylyases and related enzymes. Pergamon Press. Oxford.
- Laga A. 2001. Produksi siklodekstrin menggunakan substrat tapioka terlikuifikasi dengan aseptor minimal, Disertasi Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Lee Y.D. dan H.S. Kim. 1991. Enzymatic production of cyclodextrin from unliquefied corn starch in an Attrition Bioreactor. *J. Biotechnol. and Bioeng.* 37(4): 795-891.
- Lee J.H., K.H. Choi, J.Y. Choi, Y.S. Lee, I.B. Kwon dan J.H. Yu. 1992. Enzymatic production of  $\alpha$ -cyclodextrin with the cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. *Enzymes Microb. Technol.* 14(12): 1017-1020.
- Mangunwidjaja D. dan A. Suryani. 1994. Teknologi Bioproses. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Mattsson P., T. Korpela, S. Pavilainen dan M. Makela. 1991. Enhanced conversion of starch to cyclodextrin in ethanolic solutions by *Bacillus circulans* var *alkalophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase. *App. Bichem. and Biotechnol.* 30: 17-28.
- Matzuzawa M., M. Kawano, N. Nakamura, K. Horikoshi dan Wakoshi. 1975. An improved method for the preparation of schardinger  $\beta$ -dextrin on industrial scale by cyclodextrin glycosyl transferase of an *Alakalophilic bacillus* Sp. (ATCC 21783). *Die Starke Starch.* 27: 410-413.
- Nakamura N., N. Sashihara, H. Nagayama, dan K. Horikoshi. 1989. Characterization of Pullulanase and  $\alpha$ -amylase Activities of a *Thermus* sp AMD33. *Die Starke.* 41: 112-117.
- Okada T., M. Ito dan K. Hibino. 1994. Intermolecular transglycosylating reaction of cyclodextrin glucanotransferase immobilized on capillary membrane. *J. Fermentation and Bioengineering.* 77(3): 264-267.
- Pomeranz Y. 1985. Fungsional properties of food component. Academic Press, Inc. Sydney.
- Schmid G. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production: Yield Enhancement by Over-expression of Cloned Genes. *TIBTECH.* 7(9): 244-247.

- Swinkels J.J.M. 1985. Source of starch, its chemistry and physics. *Di dalam* G.M.A. van Beynum dan J.A. Roels (eds.). Starch conversion technology. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Szejtli J. 1988. Cyclodextrin technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Taji N. 1988. Industrial utilization of  $\alpha$ -amylases. p 196-198. *Di dalam* The amylase research society of Japan (ed). Handbook of amylases and related enzymes. Pergamon Press, Toronto.
- Tankova A. 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *J. Enzyme and Microbial Technol.* 22: 678-686.
- Vasanthan T. dan R.S. Bhatti. 1996. Physicochemical properties of small and large granula starches of waxy, regular and high amylose barleys. *Cereal Chem.* 73(2): 199.
- Whistler R.L., J.N. Bemiler dan E.F. Paschall. 1984. Starch: Chemistry and technology (2nd edition). Academic Press. Inc. New York.