



**MODIFIKASI PATI SINGKONG SECARA FERMENTASI
OLEH *Lactobacillus manihotivorans* DAN *Lactobacillus
fermentum* INDIGENUS GATOT**

SKRIPSI

Oleh
Heru Widyatmoko
NIM 111710101069

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**MODIFIKASI PATI SINGKONG SECARA FERMENTASI
OLEH *Lactobacillus manihotivorans* DAN *Lactobacillus
fermentum* INDIGENUS GATOT**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh
Heru Widyatmoko
NIM 111710101069

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibu Sofiyatun, dan Bapak Asmu'i tercinta yang tidak pernah berhenti mendoakan dan memberi kasih sayangnya sejak Heru dilahirkan;
2. Adik tersayang Raditya;
3. Mas Agus, Mbak Husna, dan keponakanku Almeira Jasmine Azzahra;
4. Drs. K. H. Misrawi M.M., sekeluarga di Jember;
5. Bapak dan Ibu guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi;
6. Almamater TK-Bunga, Banyuwangi; SDN 1 Kalibarukulon, Banyuwangi; SMPN 2 Kalibaru, Banyuwangi, SMA NU Kalibaru, Banyuwangi; dan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
7. Teman-teman Heru sejak TK hingga SMA di Banyuwangi;
8. Mas Choirul Anam, Edy, Rahman, dan Ahmad Saiti, serta teman-teman Pondok Pesantren Islam Mahasiswa Ath-Thoybah;
9. Mbak Astriani, Mbak Nurma, Mbak Iga, Lulus Kartika, Dani, Susi, Diana, Iin, Desi, Fahriski, Alfiyah, Febri;
10. Jajaran Dekanat Fakultas Teknologi Pertanian dan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian beserta perangkat administrasinya;
11. Keluarga besar Laboratorium Mikrobiologi FTP (Bapak Soni, Mbak Neni, Ibu Nurhayati, dan lain-lain);
12. Keluarga besar CDAST (Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D.; Mbak Frida, Mbak NH, Mas Aryo, Mbak Melati dan rekan-rekan peneliti tercinta);
13. Rekan-rekan penelitian Heru, Nia Novi Lina Wati, Faizah, Gozali, Dwika yang selalu memberi semangat, dukungan dan saran yang membangun;
14. Teman Heru kuliah, khususnya angkatan 2011, kakak angkatan, adik angkatan, dan lain-lain;
15. Rekan KKN Heru (Mas Yugas, Anang, Velina, Mbak Maulida, Tonda, Retno, Ayu, Afi, dan Mas fendi) yang telah memberikan pelajaran dan pengalaman baru dalam menjalani kehidupan yang sebenarnya serta mengajarkan pentingnya kebersamaan dan silaturahmi.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Heru Widyatmoko

Nim : 111710101069

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Modifikasi Pati Singkong Secara Fermentasi oleh *Lactobacillus manihotivorans* dan *Lactobacillus fermentum* Indigenus Gatot” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 12 November 2015

Yang menyatakan,

Heru Widyatmoko

NIM 111710101069

SKRIPSI

**MODIFIKASI PATI SINGKONG SECARA FERMENTASI
OLEH *Lactobacillus manihotivorans* DAN *Lactobacillus
fermentum* INDIGENUS GATOT**

Oleh
Heru Widyatmoko
NIM 111710101069

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Ir. Achmad Subagio M. Agr.,Ph.D.
Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Nurhayati S.TP.,M.Si

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Modifikasi Pati Singkong Secara Fermentasi oleh *Lactobacillus manihotivorans* dan *Lactobacillus fermentum* Indigenus Gatot” , karya Heru Widyatmoko NIM 111710101069 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

Hari/Tanggal : 21 Desember 2015

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Prof. Ir. Achmad Subagio M.Agr.,Ph.D.

Dr. Nurhayati S.TP., M.Si

NIP 196905171992011001

NIP 197904102003122004

Tim Penguji

Ketua

Anggota

Ir.Giyarto M.Sc.

Nurul Isnaini Fitriyana S.TP., M.P.

NIP 196607181993031013

NIP 197809202012122001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Universitas Jember

Dr. Yuli Witono S.TP., M.P.

NIP 196912121998021001

RINGKASAN

Modifikasi Pati Singkong Secara Fermentasi oleh *Lactobacillus manihotivorans* dan *Lactobacillus fermentum* Indigenus Gatot; Heru Widyatmoko; 2015; 45halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Modifikasi pati singkong merupakan alternatif yang dapat dilakukan untuk meningkatkan sifat polimer pati, sehingga pati memiliki karakteristik aplikasi pada industri. Pati modifikasi dapat digunakan sebagai salah satu *ingredien* pangan. Produk pangan yang memerlukan *ingredien* pangan diantaranya produk mie, roti, minuman, puding. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisikokimia pati singkong termodifikasi secara fermentasi oleh *L. manihotivorans* dan *L. fermentum* indigenus gatot.

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap perubahan-perubahan yang terjadi dengan adanya pengaruh fermentasi menggunakan *L. manihotivorans* dan *L. fermentum*, dan waktu fermentasi pati singkong, serta analisis sifat fisik, analisis kimia, dan makrostruktur granula pati. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak dua kali. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik disertai *error bars*.

Hasil penelitian menunjukkan modifikasi pati singkong oleh *L. manihotivorans* atau *L. fermentum* mempengaruhi karakteristik fisikokimia pati singkong. Perubahan karakteristik fisiko kimia pati singkong nampak nyata dengan semakin lama waktu fermentasi. Karakteristik pati singkong berubah setelah difermentasi yaitu kadar amilosa dari 15.91%, menjadi 17.24% (A1B1), 17.31% (A1B2) dan 19.04% (A1B3) oleh *L. manihotivorans* dan 17.86% (A2B1), 18.28% (A2B2), 18.39% (A2B3) oleh *L. fermentum*. Derajat keasaman pati singkong alami yaitu 4.8 dan pati singkong terfermentasi *L. manihotivorans* yaitu 4.26 (A1B1), 4.08 (A1B2), 3.94 (A1B3) dan pati singkong terfermentasi *L. fermentum* yaitu 4.23 (A2B1), 4.31 (A2B2), 4.35 (A2B3). Daya kembang pati singkong kontrol pada suhu 65°C yaitu 6,97g/g, dan pati singkong terfermentasi *L. manihotivorans* yaitu 8.29 g/g (A1B1), 7.8 g/g (A1B2), 7.6 g/g (A1B3) dan pati

singkong terfermentasi *L. fermentum* yaitu 8.31 g/g (A2B1), 8.24 g/g (A2B2), 8.07 g/g (A2B3). Sifat amilografi (viskositas puncak pati singkong kontrol yaitu 4784 cP, dan viskositas puncak pati singkong terfermentasi *L. manihotivora*s yaitu 5387 cP (A1B1), 5332 cP (A1B2), 5453 cP (A1B3), dan viskositas puncak pati singkong terfermentasi *L. fermentum* yaitu 5320 cP (A2B1), 5462 cP (A2B2), 3426 cP (A2B3). *Setback* pati singkong kontrol yaitu 918 cP, dan pati singkong terfermentasi *L. manihotivora*s yaitu 795 cP (A1B1), 737 cP (A1B2), 676 cP (A1B3), dan pati singkong terfermentasi *L. fermentum* yaitu 747 cP (A2B1), 738 cP (A2B2), 659 cP (A2B3).

Untuk memperbaiki sifat-sifat pati singkong perlu dilakukan penelitian pembandingan yaitu modifikasi secara biokimiawi enzimatis (enzim komersil). Hal ini untuk mengetahui efisiensi modifikasi patisingkong secara fermentasi dan secara biokimiawi enzimatis.

SUMMARY

Cassava Starch Modification In Fermentation by *Lactobacillus manihotivorans* and *Lactobacillus fermentum* Indigenus Gatot; Heru Widyatmoko; 2015; 45 pages; Department of Agricultural Technology Faculty of Agriculture, University of Jember

Modification of cassava starch is an alternative that can be done to improve the properties of the starch polymer, so that the starch has the characteristics of applications in the industry. Modified starch can be used as a food ingredient. Food products that require ingredien food including noodles, bread, drinks, pudding. This study aims to determine the physicochemical characteristics of modified cassava starch is fermented by *L. manihotivorans* and *L. fermentum* indigenus gatot.

In this study, carried out observations of changes that occur with the influence of fermentation using *L. manihotivorans* and *L. fermentum*, and time fermentation cassava starch, as well as the analysis of physical properties, chemical analysis, and macrostructure starch granules. Each treatment was repeated twice. Data were presented in tables and graphs with error bars.

The results showed cassava starch modification by *L. manihotivorans* or *L. fermentum* influence physicochemical characteristics of cassava starch. Changes in the physico chemical characteristics of cassava starch is obvious with the longer time fermentaion. Characteristics changed after fermented cassava starch is amylose content from which 15.91% to 17.24% (A1B1), 17.31%, (A1B2) and 19.04% (A1B3) by *L. manihotivorans* and 17.86 % (A2B1), 18.28% (A2B2), 18.39% (A2B3) by *L. fermentum*. Natural acidity is 4.8 cassava starch and cassava starch is fermented *L manihotivorans* 4.26 (A1B1), 4.08 (A1B2), 3.94 (A1B3) and *L. fermentum* fermented cassava starch is 4.23 (A2B1), 4.31 (A2B2), 4.35 (A2B3). Swelling power control cassava starch at a temperature of 65°C is 6,97 g/g, and cassava starch is fermented *L. manihotivorans* 8.29 g/g (A1B1), 7.8 g/g (A1B2), 7.6 g/g (A1B3) and fermented cassava starch *L. fermentum* is 8.31 g/g (A2B1), 8.24 g/g (A2B2), 8.07 g/g (A2B3). Amilograpy properties (viscosity

peak control cassava starch is 4784 cP, and fermented cassava starch *L. manihotivorans* peak viscosity is 5387 cP (A1B1), 5332 cP (A1B2), 5453 cP (A1B3), and peak viscosity of cassava starch is fermented *L. fermentum* 5320 cP (A2B1), 5462 cP (A2B2), 3426 cP (A2B3). Setback cassava starch control that is 918 cP, and cassava starch fermented *L. manihotivorans* is 795 cP (A1B1), 737 cP (A1B2), 676 cP (A1B3), and cassava starch fermented *L. fermentum* is 747 cP (A2B1), 738 cP (A2B2), 659 cP (A2B3).

To improve the properties of cassava starch is necessary to study comparative biochemical enzymatic modification (commercial enzyme) .This is to determine the modification efficiency cassava starch biochemical fermentation and enzymatic.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ Modifikasi Pati Singkong Secara Fermentasi oleh *Lactobacillus manihotivorans* dan *Lactobacillus fermentum* Indigenus Gatot”. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, karena dengan perjuangan beliau kami berada dalam tuntunan yang benar. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Ir. Achmad Subagio M. Agr.,Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Nurhayati STP. M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota, Prof. Dr. Ir. Tejasari M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik, Ir. Giyarto M.Sc., selaku Dosen Penguji I dan Nurul Isnaini Fitriyana S.TP, M.P., selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penyusunan skripsi ini;
2. Penelitian Penguatan Biomaterial dan Bioproses, CDAST Universitas Jember;
3. Ayah, ibu dan kakak serta adikku yang telah memberikan kasih sayang, perhatian serta doa demi terselesaikannya skripsi ini;
4. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN PEMBIMBINGAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
RINGKASAN	vi
SUMARRY	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat.....	2
BAB 2. TINJUAN	
2.1 Bakteri Asam Laktat (BAL)	3
2.2 Fermentasi Pati oleh BAL.....	5
2.3 Sifat-sifat Asam Laktat	6
2.4 Pati Singkong	7
2.5 Pati Singkong Termodifikasi	10
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	13
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	13
3.3 Pelaksanaan Penelitian.....	14
3.3.1 Rancangan Penelitian.....	14

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	15
3.3.3 Analisa Hasil	17
3.4 Variabel Pengamatan	17
3.5 Prosedur Analisis	18
3.5.1 Pengukuran Derajat Keasaman (pH) Pati Singkong.....	18
3.5.2 Penghitungan Total BAL.....	18
3.5.3 Analisis Amilosa	19
3.5.4 Analisis Gugus Fungsi Pati Singkong	20
3.5.5 Pengamatan Bentuk Pati (Mikroskop Polarisasi)	20
3.5.6 Pengamatan Makrostruktur Pati (SEM)	20
3.5.7 Analisis Daya Kembang Pati Singkong.....	21
3.5.8 Profil Amilografi Pati Singkong.....	21
3.5.9 Pengukuran Derajat Putih Pati Singkong	21
3.5.10 Sifat Termal Pati Singkong.....	22

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Fermentasi Pati Singkong oleh <i>L. manihotivorans</i> dan <i>L. fermentum</i> Indigenus Gatot.....	23
4.1.1 Nilai pH Air Rendaman Pati Singkong Terfermentasi BAL ...	23
4.1.2 Populasi BAL	24
4.1.3 Kadar Air Pati Singkong Terfermentasi	26
4.2 Fermentasi oleh <i>L. manihotivorans</i> dan <i>L. fermentum</i> terhadap Karakteristik Kimiawi Pati Singkong.....	26
4.2.1 Fermentasi BAL Pada Kadar Amilosa Pati Singkong	26
4.2.2 Fermentasi BAL Pada Gugus Fungsi Pati Singkong.....	28
4.2.3 Makrostruktur Pati Singkong.....	30
4.3 Fermentasi oleh <i>L. manihotivorans</i> dan <i>L. fermentum</i> terhadap Karakteristik Fisikokimia Pati Singkong	33
4.3.1 Daya kembang.....	33
4.3.2 Profil Amilografi Pati Singkong Terfermentasi	35
4.3.3 Derajat Putih Pati Singkong	41
4.3.4 Sifat Termal Pati Singkong Terfermentasi	42

BAB 5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimia pati singkong per 100 (g)	8
2.2 Standar sifat-sifat fisiko kimia dan rheologi pati singkong	10
3.1 Rancangan penelitian	12
4.1 Daya kembang pati singkong terfermentasi	28
4.2 Pengaruh fermentasi terhadap karakteristik amilografi pati singkong	30
4.3 Sifat termal pati terfermentasi	38

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
3.1 Diagram alir pembuatan pati singkong	14
3.2 Tahap penelitian pati singkong terfermentasi	15
4.1 Nilai pH pati singkong	18
4.2 Populasi BAL pati singkong	20
4.3 Kadar air pati singkong	21
4.4 Kadar amilosa pati singkong.....	22
4.5 Gugus fungsi pati singkong.....	24
4.6 Struktur granula pati singkong (mikroskop polarisasi).....	26
4.7 Struktur permukaan pati singkong (SEM)	28
4.8 Profil amilografi pati singkong	35
4.9 Derajat putih pati singkong terfermentasi	36
4.10Sifat termal pati singkong terfermentasi	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Jumlah Bakteri Asam Laktat dan Nilai pH Air Rendaman Pati Singkong Terfermentasi	50
B. Kadar Air Pati Singkong Terfermentasi	51
C. Kurva Standar Amilosa.....	54
D. Kadar Amilosa Pati Singkong Terfermentasi	55
E. Gugus Fungsi Pati Singkong Terfermentasi	58
F. Makrostruktur Granula Pati Singkong Terfermentasi.....	61
G. Foto <i>Scanning Microscope Electrone</i> Granula Pati Singkong Terfermentasi	63
H. Daya Kembang Pati Singkong Terfermentasi.....	65
I. Sifat Amilografi Pati Singkong.....	66
J. Derajat Putih Pati Singkong Terfermentasi	69
K. Sifat Termal Pati Singkong Terfermentasi	70

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pemanfaatan pati singkong sangat luas untuk berbagai aplikasi industri pangan dan non-pangan. Sebagai contoh, penggunaan pati singkong dalam industri pangan untuk bahan pengental, dan sebagai agen penstabil makanan, sedangkan pada industri non-pangan seperti kertas, tekstil, kimia, farmasi, dan produksi *biofuel*, etanol (Lu *et al.*, 2011; Koswara, 2006). Namun, penggunaan pati alami (*native*) sebagai bahan utama dalam industri memiliki kelemahan dan kendala, karena sifat dan karakteristiknya yang terbatas. Keterbatasan fungsi pati alami disebabkan kestabilan dan ketahanan pasta yang rendah akibat sifat pati yang tidak tahan terhadap panas dan kondisi asam (Singh *et al.*, 2004). Modifikasi pati merupakan alternatif yang dapat dilakukan untuk meningkatkan sifat polimer pati, sehingga pati memiliki karakteristik untuk aplikasi pada industri (Syamsir, 2012).

Pati singkong termodifikasi dapat digunakan sebagai salah satu bahan pangan (ingredien pangan) dengan penggunaan yang lebih luas. Produk pangan yang memerlukan ingredien pangan, diantaranya seperti produk mie, roti, minuman, puding dan sebagainya. Penelitian tentang pati modifikasi telah dilakukan oleh Suhery (2013) yaitu pati singkong yang difermentasi menggunakan *Lactobacillus sp* yang sama dengan fermentasi pada tepung MOCAF. Hasilnya menunjukkan bahwa pati singkong termodifikasi menjadi berongga pada permukaan granulanya. BAL seperti *L. manihotivorans* dan *L. fermentum* telah dilaporkan memiliki sifat amilolitik yaitu mampu menghasilkan enzim amilase untuk mendegradasi pati (Reddy *et al.*, 2008). Mikroba BAL menghasilkan enzim-enzim yang menghidrolisis pati menjadi gula dan selanjutnya mengubahnya menjadi asam-asam organik, terutama asam laktat.

Salah satu makanan khas Indonesia berbasis singkong terfermentasi adalah gatot. Makanan ini memiliki karakteristik kenyal, dengan warna umumnya adalah hitam. Isolasi BAL pada gatot yang direndam sebelum dikukus menghasilkan

bahwa BAL yang tumbuh adalah jenis *L. manihotivorans* yang bersifat homofermentatif dan *L. fermentum* yang bersifat heterofermentatif (Astriani dan Nurhayati, 2014). Oleh karena itu, perlu dikaji karakteristik fisikokimia pati singkong yang terfermentasi oleh *L. manihotivorans*, dan *L. fermentum*.

1.2 Rumusan Masalah

Modifikasi pati singkong dengan fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis bakteri dan lama fermentasi. Berkaitan dengan ini, Astriani (2014) berhasil mengisolasi bakteri dari perendaman singkong kupas pada pembuatan gatot, dan menemukan dua strain *L. manihotivorans*, dan *L. fermentum*. *Lactobacillus* sp. tersebut selanjutnya akan digunakan pada fermentasi pati singkong. Peran bakteri asam laktat amilolitik yaitu untuk memodifikasi karakteristik granula pati singkong karena kemampuannya menghasilkan asam laktat dan mendegradasi pati. Evaluasi karakteristik pati yang berkaitan dengan perubahan sifat fisikokimia dan mikrostrukturnya dilakukan untuk mengetahui efek fermentasi asam laktat. Oleh karena itu, perlu dikaji bagaimana pengaruh penggunaan *L. manihotivorans* dan *L. fermentum* terhadap sifat fisikokimia pati singkong terfermentasi.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik fisiko kimia pati singkong terfermentasi oleh *L. manihotivorans* dan *L. fermentum* indigenus gatot.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah meningkatkan nilai guna dari pati singkong. Sebagai bahan pangan (ingredien pangan) sehingga diharapkan dipergunakan lebih lanjut dalam aplikasi pada produk pangan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan memanfaatkan pati sebagai substrat dikenal sebagai bakteri asam laktat amilolitik (Putri *et al.*, 2012). Aktivitas bakteri asam laktat pada fermentasi bahan berpati berperan terhadap perubahan karakteristik produk, untuk memproduksi asam laktat, enzim spesifik, dan senyawa aromatik. Bakteri asam laktat dapat menghasilkan amilase ekstraseluler dan memfermentasi pati secara langsung menjadi asam laktat. Hal ini disebabkan fermentasi dengan BAL amilolitik akan menggabungkan dua proses yaitu hidrolisis enzimatis substrat karbohidrat (pati) sekaligus memanfaatkan gula yang dihasilkan menjadi asam laktat. Kajian mikrobiologis pada fermentasi alami pati singkong asam di Columbia mengarah pada isolasi BAL amilolitik, *L. manihotivorans*, yang bersifat homolaktik dan menghasilkan lebih dari 98% L(+)-asam laktat.

Penelitian Lacerda *et al.*, (2005) menemukan *L. plantarum* dan *L. fermentum* yang dominan pada fermentasi alami singkong di Brazil, selain juga menemukan *L. perolans* dan *L. brevis*. Salah satu makanan khas Indonesia berbasis singkong terfermentasi adalah Gatot. Uji mikrobiologis yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa BAL yang tumbuh adalah jenis *L. manihotivorans* yang bersifat homofermentatif dan *L. fermentum* yang bersifat heterofermentatif. (Astriani dan Nurhayati, 2014).

Gatot umumnya dibuat melalui beberapa tahap yaitu pengupasan, pencucian, pengeringan awal, fermentasi spontan, pengeringan lanjutan, perendaman, pengecilan ukuran, dan pengukusan. Fermentasi spontan dilakukan dalam karung dan pengeringan secara tradisional menggunakan sinar matahari. Gatot memiliki ciri-ciri dengan warna hitam dan teksturnya kenyal (Astriani, 2014).

Fermentasi menyebabkan terjadinya perubahan karakteristik pati yang disebabkan terjadinya penyerangan granula-granula pati oleh enzim sekaligus

asam yang dikeluarkan oleh mikroorganisme yang terlibat. Degradasi pati oleh BAL terjadi karena sumber karbon dibutuhkan bagi pertumbuhannya sehingga bakteri menghasilkan enzim amilase ekstraseluler. Enzim ini memecah ikatan polimer pati menjadi lebih pendek, oligosakarida atau molekul gula sederhana, sehingga uji iodin yang dilakukan menyebabkan terjadinya perubahan warna yang berbeda. Identifikasi diperkuat dengan hasil penggunaan iodin untuk mewarnai amilosa menunjukkan warna biru gelap, yang terjadi karena pembentukan kompleks. Kompleks tersebut terjadi akibat amilosa membentuk kumparan heliks disekeliling molekul iodin. Apabila polimer amilosa terputus menjadi lebih pendek maka terjadi perubahan ikatan kompleks dengan iodin sehingga warna menjadi lebih muda, merah, atau coklat. Asam laktat juga dapat menyebabkan degradasi pati selama fermentasi dengan mengoksidasi bagain amorf dan selanjutnya secara simultan menghidrolisis amilosa dan amilopektin. Waktu yang dibutuhkan asam laktat untuk mendegradasi pati lebih panjang dibandingkan pemutusan ikatan oleh enzim (Putri *et al.*, 2012).

Jenis dan kondisi media menjadi penentu jenis dan kemampuan mikroorganisme dalam memfermetasi atau menggunakan pati sebagai substrat bagi pertumbuhannya. Hal ini nenjadi penyebab beragamnya jenis isolat amilolitik yang diisolasi dari jenis dan media atau bahan yang berbeda. Spesies *L. manihotivorans* diisolasi dari fermentasi pati singkong, *L. amylovorus* dari jagung, *L. plantarum* dari kentang dan singkong, *L. fermentum* dari adonan jagung dan *L. amylophylus* dari substrat yang diperoleh dari bahan berpati lainnya.

Menurut Putri *et al.*, (2012) bakteri asam laktat yang tumbuh selama fermentasi growol merupakan bakteri yang indigenus tumbuh pada media berbasis singkong yaitu bakteri *L. plantarum* dan *L. rhamnorus*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat adalah bakteri asam laktat dengan karakteristik gram positif, katalase negatif, tidak menghasilkan gas selama fermentasi, dan bersifat amilolitik.

2.2 Fermentasi Pati oleh BAL

Penggunaan kultur starter lokal dari produk aslinya akan memudahkan dalam mengendalikan fermentasi serta memberikan hasil fermentasi yang lebih baik dan sesuai dengan karakteristik produk yang diinginkan (Nurhayati, 2011). Diantaranya yaitu *L. manihotivorans* dan *L. fermentum* yang diisolasi dari air rendaman gatot (Astriani, 2014). Pati singkong merupakan potensi yang besar untuk dikembangkan menjadi produk yang lebih bernilai guna. Fermentasi berperan dalam memicu pati singkong menghasilkan asam laktat. Isolat BAL bersifat mesofilik karena tumbuh optimum pada suhu 37°C dan tidak dapat tumbuh pada suhu 10°C dan 50°C. Nurhayati (2011) menjelaskan bahwa BAL dapat tumbuh baik pada suhu 35°C. Isolat BAL *L. fermentum*, dan *L. manihotivorans* membutuhkan waktu tumbuh selama 48 jam (Astriani, 2014).

Sifat *L. manihotivorans*, dan *L. fermentum* yaitu, katalase negatif, bersifat anaerob, dapat memfermentasikan substrat sakarida yaitu glukosa, sukrosa, manitol, arabinosa, fruktosa, dan maltotriosa (Astriani, 2014). Menurut Astriani (2014) menyebutkan bahwa BAL mampu menghasilkan enzim amilase dan pululanase sehingga bersifat amilolitik. BAL akan menghidrolisis sebagian pati alami menjadi gula sederhana ataupun oligosakarida lain. Selanjutnya BAL akan memfermentasi gula sederhana tersebut untuk metabolisme dan pertumbuhan BAL. Berdasarkan referensi yang telah dilaporkan oleh (Guyot *et al.*, 2000) bahwa BAL *L. manihotivorans* merupakan spesies BAL yang diisolasi dari pati singkong dan dapat menghasilkan enzim amilase selama fermentasi pati singkong. *L. manihotivorans* merupakan jenis bakteri asam laktat homofermentatif yang menghasilkan L-laktat sehingga dapat dimanfaatkan sedangkan *L. fermentum* adalah bakteri asam laktat yang mampu menghasilkan asam laktat melalui metabolisme glukosa (Axelsson, 2004), memproduksi enzim pemecah pati (amilase) (Sanni, 2002) dan amilase yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat mengakibatkan terjadinya perubahan struktur granula pada pati menjadi semakin kristal (Reddy *et al.*, 2008). Selain itu, pemanfaatan bakteri asam laktat juga bertujuan agar selama fermentasi, asam laktat dihasilkan secara alami dan mengakibatkan terjadinya linierisasi amilopektin (Jenie, *et al.*, 2012). Astriani dan

Nurhayati (2014) mengisolasi BAL yang berperan selama fermentasi gatot yaitu *L. manihotivorans* dan *L. fermentum*

Berdasarkan uji menggunakan KIT BBL *Crystal* menunjukkan isolat BAL dapat memfermentasikan substrat sakarida yaitu glukosa, sukrosa, manitol, arabinosa, fruktosa, dan maltotriosa. Hasil penelitian Astriani (2014) menunjukkan bahwa *L. manihotivorans* memiliki ciri-ciri tipikal koloni bulat putih, gram (+), selnya berbentuk batang, tidak memiliki enzim katalase dan dapat tumbuh pada suhu 37°C selama inkubasi 24-48 jam. *L. fermentum* (C1) memiliki ciri-ciri tipikal koloni bulat putih, elevansi cembung, gram (+), selnya berbentuk batang, tidak memiliki enzim katalase, dapat tumbuh pada suhu 37°C selama inkubasi 48 jam. *L. manihotivorans* dan *L. fermentum* bersifat anaerob fakultatif.

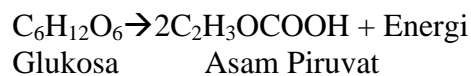
2.3 Sifat-sifat Asam Laktat

Asam laktat merupakan asam karboksilat dengan rumus kimia $C_3H_6O_3$ atau $CH_3COHCOOH$ dan dengan nama sistematik asam 2-hidroksipropionat. Dalam larutan, asam laktat dapat kehilangan sebuah proton dari $COOH$ (gugus karboksil) menjadi ion laktat $CH_3CHOHCOO^-$. Terdapat dua isomer optik dari asam laktat karena atom karbon utamanya mengikat pada empat gugus yang berbeda. Isomer yang pertama disebut L(+) asam laktat atau (S)-asam laktat dan yang kedua disebut D(-)-asam laktat atau (R)-asam laktat (Komaria, 2013).

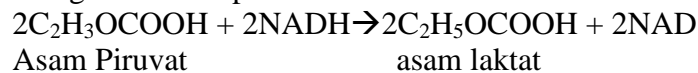
Asam laktat dihasilkan melalui glikolisis anaerob (pada manusia dan hewan) serta melalui fermentasi (pada mikroorganisme). Pada kedua proses tersebut, L-asam laktat diproduksi dari piruvat dengan bantuan enzim laktat dehidrogenase. Saat konversi piruvat menjadi L-asam laktat akan terjadi juga oksidasi satu molekul NADH menjadi NAD^+ , selanjutnya NAD^+ ini akan digunakan kembali dalam proses glikolisis sehingga proses tersebut dapat berlangsung terus menerus. Sifat fisik asam laktat yaitu berbentuk cairan, berat molekul 90,08, titik didih 149,08°C, titik leleh 52,7-52,8°C, tidak berwarna, larut dalam pelarut organik dan sifat kimianya dapat terjadi reaksi substitusi dengan gugus alkohol (Komaria, 2013).

Fermentasi asam laktat telah banyak dipelajari oleh peneliti terdahulu dengan menggunakan berbagai jenis mikroorganisme, sumber karbon, sumber nitrogen, dan kondisi operasi (pH, suhu, volume dan konsentrasi inokulum). Jenis mikroorganisme yang menghasilkan asam laktat adalah bakteri (*Lactobacillus*, *Streptococcus* dan *Pediococcus*) dan jamur (*Rhizopus*). Produksi asam laktat secara fermentasi dilakukan melalui jalur sebagai berikut:

(1) Proses glikolisis



(2) Dehidrogenasi asam piruvat



Fermentasi asam laktat berlangsung ditandai dengan timbulnya gas dan meningkatnya jumlah asam laktat yang diikuti dengan penurunan pH. Sifat bakteri laktat tumbuh pada pH 3-8 serta mampu memfermentasi monosakarida dan disakarida sehingga menghasilkan asam laktat. Bakteri asam laktat memfermentasi gula melalui jalur-jalur yang berbeda sehingga dikenal sebagai homofermentatif dan heterofermentatif.

Bakteri homofermentatif memecah gula terutama menjadi asam laktat. Berbagai media fermentasi telah dikembangkan untuk menghasilkan formulasi media fermentasi yang tepat untuk suatu proses fermentasi skala kecil lebih mudah dilakukan dengan penggunaan senyawa-senyawa murni. Asam laktat disintesis ketika mikroba dalam fase logaritmik. Sebab pada fase logaritmik sel-sel bakteri akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial sampai jumlah maksimum sehingga menghasilkan asam laktat yang tinggi (Komaria, 2013).

2.4 Pati Singkong

Pati adalah polisakarida yang dibentuk dari sejumlah molekul glukosa dengan ikatan -glikosidik. Pati merupakan salah satu bentuk utama dari karbohidrat dalam makanan, pati dapat disebut sebagai karbohidrat kompleks. Pati merupakan hasil olahan yang kadar airnya cukup rendah sekitar (10-14%)

(Ariyanti, 2013). Pati terdiri dari dua fraksi yang dapat dipisahkan dengan air panas. Fraksi terlarut disebut amilosa dan fraksi yang tidak terlarut disebut amilopektin. Amilosa tersusun dari molekul D-glukopiranososa berkaitan $-(1,4)$ dalam struktur rantai lurus. Molekul amilosa lengkap dapat terdiri dari beberapa sampai 3000 unit D-glukopiranososa. Amilopektin terdiri dari molekul D-glukosa yang berikatan $-(1,4)$ dan juga mengandung ikatan silang $-(1,6)$. Ikatan ini menyebabkan penampilan molekul amilopektin bercabang-cabang biasanya 24-30 unit D-glukopiranososa berada di titik percabangan amilopektin. Kandungan pati dari singkong yaitu 90,21 g/100 g bahan (Permana, 2012). Singkong mempunyai proporsi amilosa 17%. Namun secara umum rasio antara amilosa dan amilopektin berbeda antar pati, tetapi untuk pati yang normal terdiri dari 25% amilosa dan 75% amilopektin (Wulan, 2006). Komposisi kimia pati singkong dapat dilihat pada **Tabel 2.1**

Tabel 2.1 Komposisi kimia pati singkong per 100 g

Komponen	Jumlah
Energi (kal)	362
Protein(g)	0,29
Lemak (g)	0,30
Karbohidrat (g)	86,90
Air	12,00

Sumber: Ariyanti, 2013.

Dalam Standar Nasional Indonesia (SNI), nilai pH pati singkong tidak dipersyaratkan. Namun demikian, beberapa institusi mensyaratkan nilai pH untuk mengetahui mutu pati singkong berkaitan dengan proses pengolahan. Salah satu proses pengolahan pati singkong yang berkaitan dengan pH adalah pada proses perendaman. Pembentukan gel optimum terjadi pada pH 4-7. Bila pH terlalu tinggi, pembentukan pasta makin cepat tercapai tetapi cepat turun lagi. Sebaliknya, bila pH terlalu rendah, pembentukan pasta menjadi lambat dan viskositasnya akan turun bila proses pemanasan dilanjutkan. *The Cassava Institute of America (TIA)* menetapkan standar pH pati singkong sekitar 4.5-6.5. Kehalusan pati juga penting untuk menentukan mutu pati singkong.

Pati singkong merupakan granula berwarna putih dengan ukuran diameter yang bervariasi dari 4-35 μ m dan rata-rata 20 μ m. Granula ini berbentuk mangkuk (cup) dan sangat kompak, tetapi selama pengolahan granula tersebut akan pecah menjadi komponen yang tidak teratur bentuknya. Granula pati tidak larut dalam air dingin, tetapi mengembang dalam air panas atau hangat. Pengembangan granula pati tersebut bersifat bolak-balik (*refersible*) jika tidak melewati suhu gelatinisasi dan menjadi tidak bolak-balik (*irreversible*) jika telah mencapai suhu gelatinisasi. Pengembangan granula pati dalam air dingin dapat mencapai 25-30% dari berat semula. Pada keadaan tersebut granula pati tidak larut dalam air dingin tapi berbentuk suspensi. Dengan makin naiknya suhu suspensi pati dalam air, maka pengembangan granula semakin besar. Pengembangan tersebut disebabkan karena molekul-molekul amilosa dan amilopektin secara fisiknya hanya dipertahankan oleh ikatan hidrogen yang lemah. Atom hidrogen dari gugus hidroksil akan tertarik pada muatan negatif atom oksigen dari gugus hidroksil yang lain. Dengan makin naiknya suhu suspensi, maka ikatan hidrogen tersebut makin melemah.

Dilain pihak molekul air memiliki kinetik yang lebih tinggi sehingga mudah berpenetrasi kedalam granula, tetapi ikatan hidrogen antar molekul air juga semakin melemah. Akhirnya suhu suspensi mulai menurun maka air akan terikat secara simultan dalam sistem amilosa-amilopektin sehingga menghasilkan ukuran granula yang semakin besar. Jika suhu suspensi masih tetap naik, maka granula akan pecah sehingga molekul-molekul pati akan keluar terlepas dari granula masuk dalam sistem larutan. Perbandingan antara amilosa dan amilopektin akan berpengaruh terhadap sifat kelarutan dan derajat gelatinisasi. Kelarutan pati singkong dalam air adalah 4.2% b/b dan suhu gelatinisasi 84°C.

Penelitian yang dilakukan oleh Imanningsih (2012) pati singkong memiliki viskositas puncak yang paling tinggi dibandingkan dengan tepung lainnya dan memiliki waktu gelatinisasi yang lebih cepat dibandingkan dengan tepung beras dan tepung terigu, tetapi hampir bersamaan dengan tepung ketan. Setiap jenis tepung memiliki karakteristik gelatinisasi yang berbeda-beda. Sifat gelatinisasi

dan pembengkakan dari suatu pati, salah satunya ditentukan oleh struktur amilopektin, komposisi pati, dan ukuran granula pati.

Menurut Imanningsih (2012) pati singkong memiliki viskositas suhu rendah (*set-back*) yang agak rendah. Dalam aplikasinya, pati singkong dapat digunakan untuk memberi kekentalan pada waktu pemasakan yang singkat, tetapi kurang dapat memberikan kekentalan pada produk yang dingin. Sifat fisikokimia dan rheologi pati singkong termodifikasi seperti: daya larut, daya kembang, gugus karbonil, dan gugus karboksil memiliki standar tertentu berdasarkan pada penelitian yang sudah dilakukan terdahulu, seperti terlihat pada **Tabel 2.2**

Tabel 2.2 Standar sifat-sifat fisikokimia dan rheologi pati singkong

Sifat Fisikokimia	Nilai
Daya kembang (g/g)	28,70± 1,5
Daya larut(%)	29,71± 1,3
Gugus Karbonil (%)	0,03
Gugus Karboksil (%)	0,07
Viskositas	400

Sumber: Imanningsih (2012).

2.5 Pati Singkong Termodifikasi

Pembuatan pati singkong termodifikasi pada dasarnya menggunakan prinsip modifikasi enzimatik. BAL, selama fermentasi berperan dalam peruraian sebagian pati, pengasaman, detoksifikasi, dan pengembangan cita-rasa. BAL berperan dalam pembentukan aroma. Modifikasi pati singkong karena keberadaan asam laktat bersamaan dengan pengeringan matahari, terbukti meningkatkan volume spesifik biskuit yang dibuat dari pati singkong termodifikasi tersebut, tetapi tidak terjadi jika digunakan pati hasil pengeringan dengan oven. Fenomena ini mungkin karena akibat gabungan reaksi asam laktat dan penyinaran ultra violet (UV) matahari pada pati singkong dengan akibat degradasi pati yang berkaitan dengan kemampuan pati untuk mengembang pada *baking*. Pati dapat dimodifikasi melalui cara hidrolisis, oksidasi, *cross-linking* atau *cross bonding*, dan substitusi (Koswara, 2006).

Pati singkong yang diasamkan dengan penambahan asam laktat dan disinari dengan lampu merkuri pada panjang gelombang 250-620 nm, berpengaruh nyata

terhadap kemampuan pengembangan. Penemuan ini menegaskan bahwa baik pati singkong asam maupun pati singkong yang diberi asam laktat dan disinari UV, mengakibatkan degradasi yang ditunjukkan oleh penurunan viskositas berdasar pengukuran menggunakan viskometer, dan penurunan viskositas akhir yang sangat besar berdasarkan pengukuran dengan *Rapid Visco Analyzer* (Haryadi, 2011).

Salah satu cara memodifikasi karakteristik pati singkong yaitu dengan cara memodifikasi sifat-sifat fungsional pati. Salah satu teknik yang telah diterapkan adalah fermentasi menggunakan bakteri asam laktat. Mikroba yang tumbuh menghasilkan enzim-enzim pektinolitik dan selulolitik yang dapat menghancurkan dinding sel singkong sedemikian rupa, sehingga terjadi pembebasan granula pati (Subagio, 2008). Hal ini yang akan menyebabkan perubahan karakteristik dari tepung yang dihasilkan.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (C-DAST), Laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi, Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan April 2015 sampai bulan November 2015.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat utama yang digunakan antara lain yaitu: *USA standart testing seive ASTM E-11* ukuran (100 mesh), otoklaf (*Tomy autoclave High Pressure Steam Sterilizer ES-315*), alat pengering (oven) (*Air Concept Froilabo*), *laminar air flow*, mikropipet, *shaker waterbath* (SBS40, Stuard), vortek (*Genie 2, Scientific Industries*), sentrifus (*Hitachi High speed Refrigerated Centrifuges CR 226 III/ CR 216 G III*), neraca analitik (*Precisa, ES 2200 C*). Alat untuk analisis meliputi *Rapid Visco Analyzer* (RVA Tec Master, Perten, Swedia), Spektroskopi FT-IR (*Fourier Transform Infrared Alpha, Brucker, USA*), *Differential Scanning Calorimetry* (*DSC Thermo Plus Evo Rigaku DSC2830, Jepang*), *colour reader* (*Minolta CR-10*), pH meter (*Hanna*), Spektrofotometer (merk Mapada V-1100 D *Spectrophotometer*), *Microscope* Polarisasi (merk Leica DM2500 M), *Scanning Electrone Microscope (SEM)* (merk Hitachi TM3000).

Bahan utama yang digunakan antara lain yaitu pati singkong alami. Starter yang digunakan yaitu kultur *L. manihotivorans* dan *L. fermentum* indigenus gatot koleksi yang diisolasi dari air rendaman gatot oleh Astriani dan Nurhayati (2014), MRSB(Merck), Bacto Agar (Oxoid), NaCl (Merck), akuades, larutan Iod (I₂) 1 N, NaOH 1 N, Asam asetat 1 N, Etanol 95%.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor yaitu jenis starter (A) dan lama fermentasi (B). Sebagai kontrol pati singkong tanpa perlakuan. Tahap pertama dalam penelitian ini yaitu pembuatan pati singkong dan fermentasi pati singkong menggunakan kultur *L. manihotivorans* dan *L. fermentum* selama 24 jam, 48 jam, 72 jam pada suhu 37°C, dengan 0 jam pati singkong tanpa fermentasi sebagai kontrol. Kombinasi perlakuan diulang sebanyak dua kali. Kombinasi perlakuan meliputi pada **Tabel 3.1**

Tabel 3.1 Rancangan penelitian

Jenis Starter (A) 1% v/v	Lama Fermentasi (B) Jam			
	0 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
<i>L. manihotivorans</i>		A1B1	A1B2	A1B3
<i>L. fermentum</i>	Kontrol	A2B1	A2B2	A2B3

Pati singkong alami tanpa perlakuan (kontrol).

pati difermentasi *L. manihotivorans* dengan lama fermentasi 24 jam (A1B1)

pati difermentasi *L. manihotivorans* dengan lama fermentasi 48 jam (A1B2)

pati difermentasi *L. manihotivorans* dengan lama fermentasi 72 jam (A1B3)

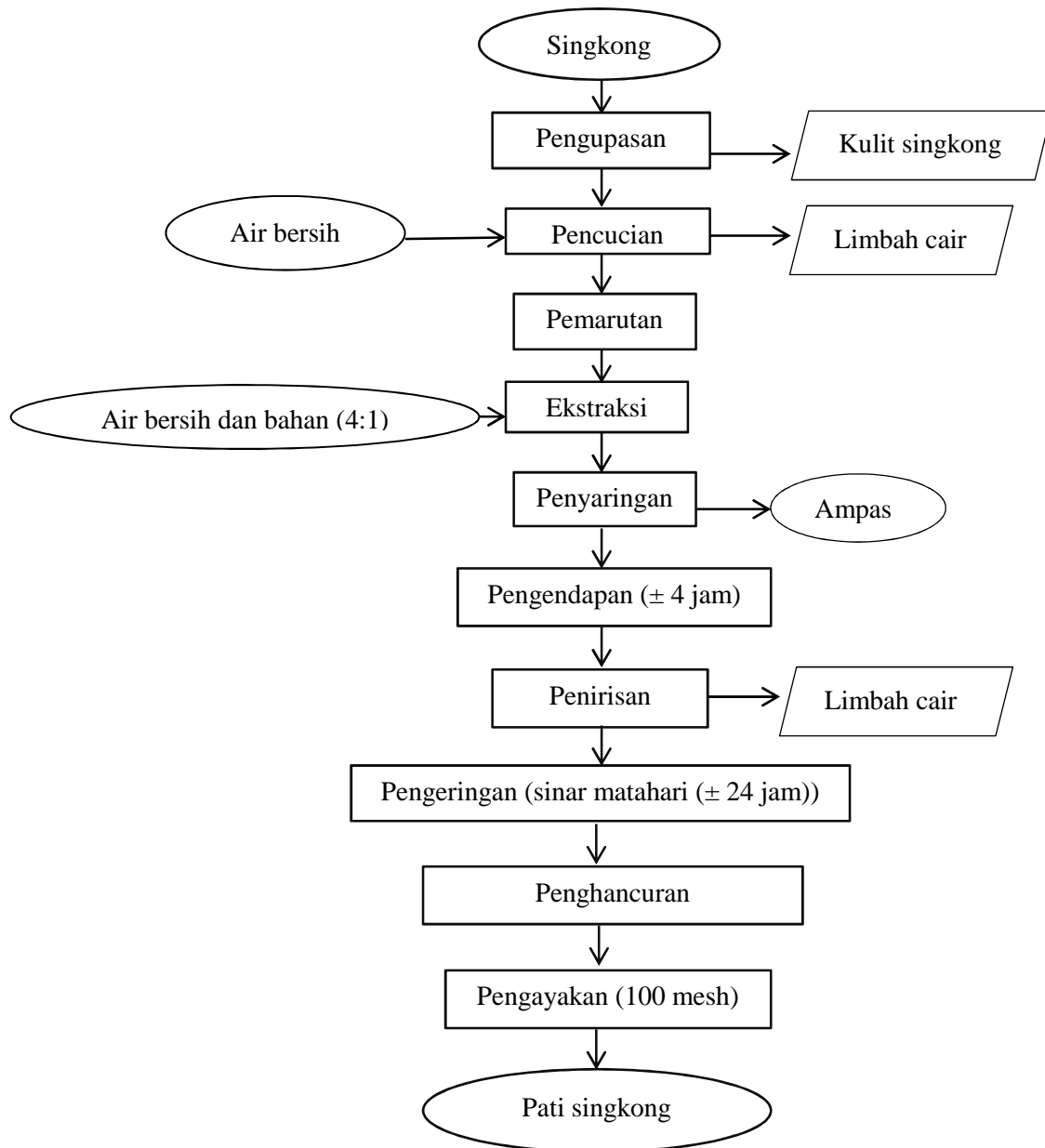
pati difermentasi *L. fermentum* dengan lama fermentasi 24 jam (A2B1)

pati difermentasi *L. fermentum* dengan lama fermentasi 48 jam (A2B2)

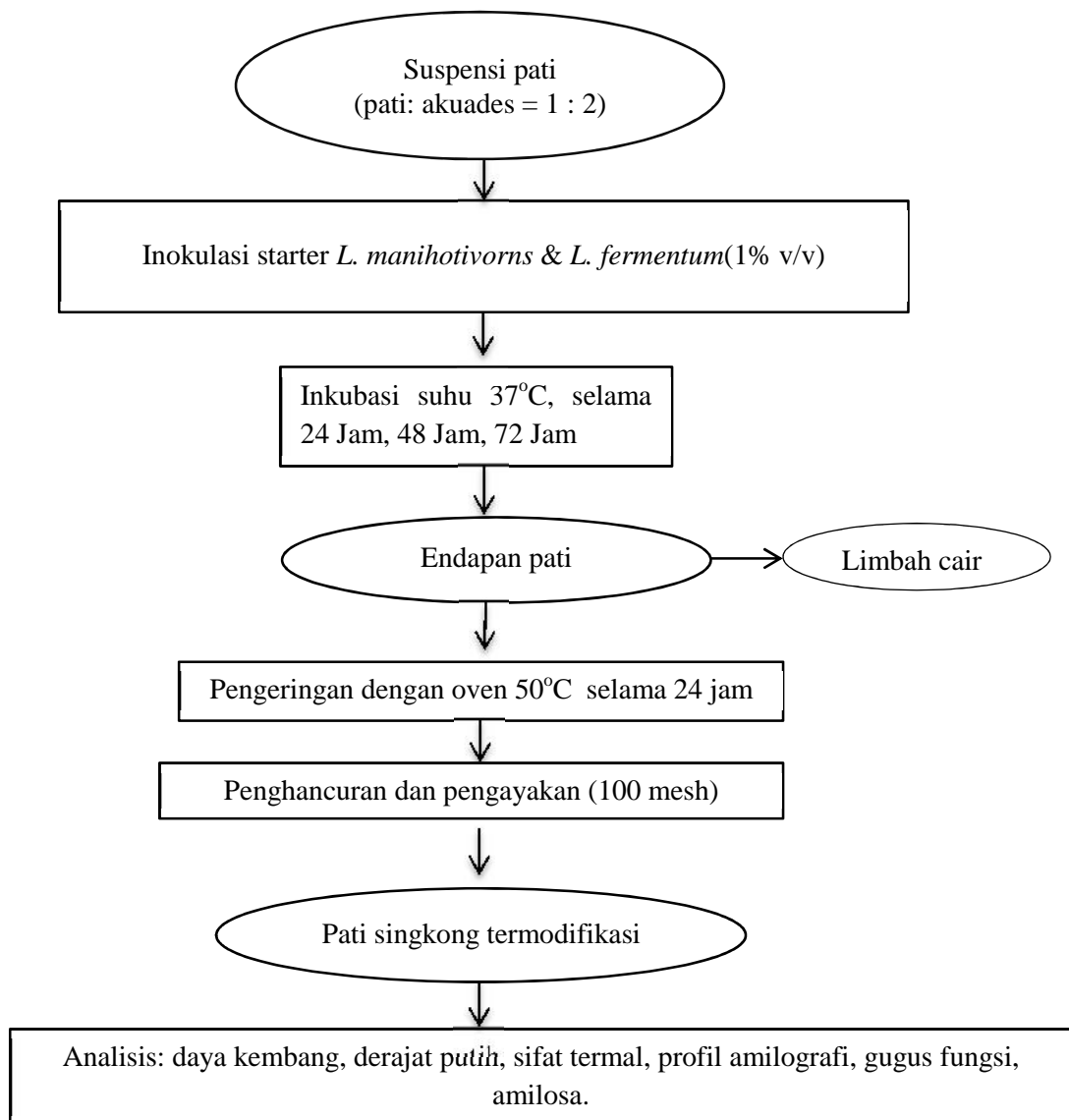
pati difermentasi *L. fermentum* dengan lama fermentasi 72 jam (A2B3)

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian meliputi tiga tahap yaitu tahap pertama adalah pembuatan pati singkong dan fermentasi pati singkong oleh kultur *L. manihotivorans* dan *L. fermentum*. Starter yang digunakan 1% (v/v), dengan perbandingan pati singkong dan akuades 1:2. Fermentasi dilakukan selama 24, 48, dan 72 jam. Tahap kedua adalah pengeringan pada pengering (oven) suhu 50°C selama 24 jam dan pengayakan pati singkong menjadi ukuran 100 mesh dan disimpan dalam botol gelas tertutup. Tahap ketiga adalah analisis karakteristik fisiko kimia, meliputi analisis, total BAL, pengukuran pH, daya kembang, pengukuran derajat putih, transisi gelas, profil gelatinisasi (RVA), gugus fungsi pati (FTIR), kadar amilosa, bentuk granula pati (mikroskop polarisasi), bentuk permukaan granula pati (*Scanning Electrone Microscope*). Pembuatan pati singkong dapat dilihat pada **Gambar 3.1** dan tahap penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.2**



Gambar 3.1 Diagram alir pembuatan pati singkong



Gambar 3.2 Tahap penelitian pati singkong terfermentasi

3.3.3 Analisis Data

Data hasil penelitian total BAL dianalisis secara deskriptif. Data lainnya dianalisis menggunakan prosedur *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila ada perbedaan dilakukan uji lanjut beda nyata terkecil pada taraf uji 5% ($p < 0,05$).

3.4 Variabe Pengamatan

Parameter fisik:, analisis daya kembang (Darmawan, 2013), pengukuran derajat putih (*Manual Book Colour Reader*,2001), sifat termal pati dengan menggunakan alat *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) (Chinsamran, 2005).

Analisis kimia meliputi: profil amilografi pati dengan menggunakan alat *Rapid Visco Analyze* (USWA, 2007), pengukuran derajat keasaman (pH), Analisis gugus fungsi pati menggunakan alat *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR) (Kwon *et al.*, 2014), analisis amilosa (Apriyantono,1998). Analisis Populasi BAL (BAM, 2001) dengan metode agar tuang. Analisis polarisasi pati singkong (*Manual Book*, Leica Microsystem). Analisis makrostruktur pati dengan alat *Scanning Electrone Microscope* (SEM).

3.5 Prosedur Analisis

3.5.1 Pengukuran Derajat Keasaman Cairan Fermentasi Pati Singkong (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sampel pH cairan fermentasi diambil setelah perlakuan perendaman pati singkong, hasil fermentasi pati singkong selama 24, 48 dan 72 Jam. Sampel yang berbentuk cairan diambil sekitar 50 ml lalu diaduk hingga rata kemudian diukur pH nya. pH meter yang telah dinyalakan dan distabilkan, sebelumnya distandarisasi dengan larutan buffer pada pH 4 dan pH 7. Elektroda dibilas dan dikeringkan dengan tisu kemudian dicelupkan dalam sampel. pH sampel langsung dapat diketahui dengan membaca angka yang ditunjukkan oleh alat tersebut.

3.5.2 Perhitungan Populasi Bakteri Asam Laktat (BAL) (metode BAM, 2001)

Populasi awal sebelum fermentasi dihitung, dan populasi setelah fermentasi dihitung. Cairan fermentasi diambil 1 ml pada jam ke-24, 48, 72 untuk menghitung populasi mikrobia. Selanjutnya ditambah dengan 9 ml larutan fisiologis dan dilakukan pengenceran berseri 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} . Dua seri hasil pengenceran 10^{-7} dan 10^{-8} di pipet sebanyak 1 ml dan dilakukan penumbuhan dengan metode tuang pada media *deMann Rogosa Sharp Agar* (MRSA), kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 48 Jam. Koloni BAL dihitung dengan standar *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) pada jumlah 25-250 cfu/ml. Sampling dilakukan pada jam ke-24, jam ke-48, dan jam ke-72.

$$N = \frac{\Sigma C}{[(1 * n1) + (0,1 * n2)] * (d)}$$

Keterangan:

- C = Total seluruh koloni pada cawan yang dapat dihitung
N = Jumlah sel dalam satuan colony forming unit (CFU) per ml bahan
n1 = Jumlah cawan dalam pengenceran pertama yang dihitung
n2 = Jumlah cawan dalam pengenceran kedua yang dihitung
d = Jumlah pengenceran terendah

3.5.3 Analisis Amilosa (Apriyantono, 1998)

a. Pembuatan kurva standar

Sebanyak 40 mg amilosa murni dilarutkan dalam 10 ml NaOH alkoholik (1 ml etanol 95% dan 9 ml NaOH 1 N). Lalu campuran ini dipanaskan dalam air mendidih selama ± 10 menit sampai semua bahan terlarut, lalu didinginkan. Kemudian campuran tadi (larutan amilosa) dipindahkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan aquades sampai tanda tera. Setelah itu, dipipet masing-masing 1, 3, 5, 7, dan 9 ml larutan amilosa, masing-masing dimasukkan kedalam labu takar 100 ml. Larutan diasamkan dengan asam asetat 1 N masing-masing sebanyak 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 dan 1.0 ml. Lalu ditambahkan 2.0 ml larutan iodine (0.2 g iodin dan 2 g KI dalam 100 ml air) Kemudian diencerkan dengan aquades sampai tanda tera, dikocok dan dibiarkan selama 20 menit. Larutan dianalisis dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Lalu data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva standar hubungan antara konsentrasi amilos dengan absorbansi.

b. Penentuan amilosa

Sebanyak 100 mg sampel ditimbang dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, kemudian 1 ml etanol 95% dan 9 ml NaOH 1 N ditambahkan ke dalam sampel. Larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit (sampai pati tergelatinisasi). Setelah itu, labu ukur yang berisi sampel didinginkan selama 1 jam dan ditambahkan aquades sampai tanda tera, kemudian dikocok. Sebanyak 5 ml larutan sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml yang telah diisi 40 ml aquades. Sebanyak 1 ml asam asetat 1 N dan 2 ml larutan, kemudian ditambahkan aquades sampai tanda tera. Larutan sampel dikocok dan dibiarkan selama 20 menit. Larutan sampel diambil untuk dianalisis dengan spektrofotometer. Selain itu, dibuat juga larutan blanko dengan cara

mencampurkan semua bahan kecuali sampel. Kadar amilosa diukur dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Kadar amilosa (\%)} = \frac{A \times F_p \times V}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

A : Konsetrasi amilosa dari kurva standar (mg/ml)

F_p : Faktor pengenceran

V : Volume awal (ml)

W : bobot awal (mg)

3.5.4 Analisis Gugus Fungsi Pati (Kwon *et al.*, 2014).

Analisis gugus fungsi pati dengan menggunakan alat *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR). Analisa spektroskopi FTIR, 5µl sampel diletakkan pada wadah silikon, wadah tersebut kemudian diletakkan pada unit pembaca mikro (HTS-XT, Bruket Optics GbH, Ettlinger, Jerman). Kemudian sinar inframerah akan dilewatkan ke sampel pada panjang gelombang 4000 cm⁻¹ sampai 400 cm⁻¹. Gelombang yang diteruskan oleh sampel akan ditangkap oleh detektor yang terhubung ke komputer yang akan memberikan gambaran spektrum sampel yang diuji. Analisis gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan program OPUS (versi 6,5; Bruket, Ettingen, Jerman).

3.5.5 Pengamatan bentuk dan ukuran pati yang diamati dengan menggunakan mikroskop polarisasi (spesifikasi Olympus BX-05 *Polarized Light Microscope*). Pati singkong diletakkan pada gelas preparat dan ratakan. Setelah itu ditetaskan aquades pada sampel, kemudian ditutup dengan *cover glass*, dan diamati sampel pada perbesaran 400X, selanjutnya diambil gambar yang terlihat.

3.5.6 Pengamatan makrostruktur pati meliputi bentuk dan permukaan partikel dengan alat *Scanning Electrone Microscope* (SEM). Pati singkong ditempelkan pada *set holder* dengan perekat ganda. Setelah itu sampel dimasukkan pada tempatnya di dalam SEM, kemudian gambar diamati dan dilakukan perbesaran 1000 kali.

3.5.7 Analisis Daya Kembang Pati Singkong (Darmawan, 2013).

Daya kembang; 0,4 g pati singkong termodifikasi dilarutkan dalam 10 ml akuades, larutan tersebut dimasukkan kedalam *waterbath* kemudian larutan dipanaskan dengan temperatur 65°C selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit lalu diambil 10 ml kemudian dikeringkan dalam oven. Catat berat endapan keringnya.

$\% \text{ daya larut} = \text{berat endapan} / \text{volume supernatan} \times 100\%$.

3.5.8 Profil Amilografi Pati (USWA, 2007)

Profil gelatinisasi pati singkong termodifikasi dianalisis menggunakan *Rapid Visco Analyzer* (RVA). Sebanyak 3 g sampel (berat kering) ditimbang dalam wadah RVA, lalu ditambahkan 25 ml akuades. Pengukuran dengan RVA mencakup fase pemanasan dan pendinginan pada wadah sampel dengan kecepatan putar 160 rpm. Pada satu menit pertama dilakukan pemanasan awal sampai suhu mencapai 50°C. Selanjutnya, suhu pemanasan dinaikkan hingga 95°C. Pada menit 8,5 dan dijaga konstan pada 95°C selama 5 menit. Lalu, suhu diturunkan kembali ke 50°C (pada menit ke 13) dan dipertahankan di 50°C selama 2 menit (sampai menit ke 14). Dari sini diperoleh viskositas puncak, suhu pasta (suhu awal naiknya viskositas), suhu viskositas puncak, viskositas panas (viskositas setelah pemanasan 95°C selama 5 menit), viskositas akhir (viskositas setelah pendinginan di suhu 50°C selama 2 menit), viskositas *breakdown* relatif (rasio antara selisih viskositas puncak, dinyatakan dalam persen) dan viskositas balik relatif (rasio antara selisih viskositas akhir dan viskositas panas dengan viskositas panas, dinyatakan dalam persen). Viskositas *breakdown* adalah selisih antara viskositas puncak dengan viskositas panas; sementara viskositas balik adalah selisih antara viskositas akhir dengan viskositas panas.

3.5.9 Pengukuran Derajat Putih terhadap Pati Singkong (*Manual Book Colour Reader*, 2001)

Penentuan derajat putih dari pati singkong termodifikasi dilakukan berdasarkan metode *Colour Reader*. Sebelum digunakan, *Colour Reader* dikalibrasi dengan standar. Sejumlah pati diletakkan dalam cawan, kemudian

menarget sampel di tujuh titik untuk mengetahui nilai dL, da dan db. Nilai L, a, dan b sampel ditentukan dengan menambah nilai dL, da dan db terukur dengan nilai L, a, dan b standar. Derajat putih diperoleh berdasarkan rumus:

$$W=100-\{(100-L)^2 + (a^2 + b^2)\}^{0,5}$$

$$L = 94,35 + dL$$

$$a^* = -5,75 + da$$

$$b^* = 6,51 + db$$

L = kecerahan warna, berkisar antara 0-100 menunjukkan warna hitam hingga putih

a* = nilai berkisar antara -80-(+ 100) menunjukkan warna hijau hingga merah

b* = nilai berkisar antara -50-(+ 70) menunjukkan warna biru hingga kuning

W = derajat keputihan (*whiteness*)

3.5.10 Sifat Termal Pati (Chinsamran, 2005)

Pengukuran transisi gelas menggunakan alat *Differential Scanning Calorimetry* (DSC). Sebelum pengukuran, dikalibrasi menggunakan indium (titik leleh 156.78°C). Sebanyak 2 mg sampel dimasukkan kedalam pan aluminium dan dilakukan penutupan hermetis. Pengukuran dilakukan pada kisaran suhu: 30-140°C dengan *heating rate*:10°C/menit.