

# PENINGKATAN KADAR PATI RESISTEN TIPE III TEPUNG SINGKONG TERMODIFIKASI MELALUI FERMENTASI DAN PEMANASAN BERTEKANAN-PENDINGINAN

*(Improvement Level of Resistant Starch Type III on Modified Cassava Flour Using Fermentation and Autoclaving-Cooling)*

**R. Haryo Bimo Setiarto<sup>1</sup>, Nunuk Widhyastuti<sup>1</sup> dan Arumsyah Sumariyadi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Kawasan CSC Cibinong 16911, Jawa Barat, Indonesia

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Institut Sains dan Teknologi Nasional, Jl. Moh Kahfi II, Srengseng Sawah,

Jagakarsa, Kota Jakarta Selatan, Daerah Khusus Ibukota Jakarta 12630, Indonesia

e-mail: haryobimo88@gmail.com

Naskah diterima 18 Oktober 2018, revisi akhir 24 Februari 2018, disetujui untuk diterbitkan 26 Februari 2018

**ABSTRAK.** Tepung singkong termodifikasi (*Mocaf*) merupakan produk turunan dari tepung singkong yang menggunakan prinsip modifikasi sel singkong secara fermentasi selama 12-72 jam. Penelitian ini bertujuan meningkatkan kadar pati resisten tepung singkong melalui fermentasi bakteri asam laktat dan pemanasan bertekanan-pendinginan. Irisan singkong difermentasi dengan kultur campuran bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum* B-307:*Leuconostoc mesenteroides* SU-LS 67 = 1:1) selama 18 jam pada suhu 37°C. Irisan singkong fermentasi selanjutnya di autoklaf (121°C, 15 menit) dan didinginkan (4°C, 24 jam) untuk 1-3 siklus. Irisan singkong kemudian dikeringkan (70°C, 16 jam), digiling dan diayak (80 mesh) untuk mendapatkan tepung singkong termodifikasi. Kombinasi pemanasan bertekanan-pendinginan dengan fermentasi mampu meningkatkan kadar pati resisten pada tepung singkong termodifikasi. Perlakuan fermentasi dengan 2 siklus pemanasan bertekanan-pendinginan (FAC-2S) menghasilkan kadar pati resisten tertinggi (12,51%) dibanding perlakuan lainnya dan meningkatkan kadar pati resisten sebesar 4,5 kali lipat dibandingkan perlakuan kontrol (2,81%). Peningkatan kadar pati resisten menyebabkan terjadinya penurunan daya cerna pada tepung singkong termodifikasi.

**Kata kunci:** bakteri asam laktat, fermentasi, pati resisten, pemanasan bertekanan-pendinginan, tepung singkong termodifikasi

**ABSTRACT.** Modified Cassava flour (*Mocaf*) is a product derived from cassava flour that uses principles of cassava cell modification through fermentation for 12-72 hours. This study aims to improve the levels of resistant starch in cassava flour using lactic acid bacteria fermentation and autoclaving-cooling. Cassava slices fermented with mixed cultures of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* B-307:*Leuconostoc mesenteroides* SU-LS 67=1:1) for 18 hours at 37°C. The fermented cassava then autoclaved (121°C, 15 min) and cooled (4°C, 24 hours) for 1-3 cycles. Cassava slices was dried (70°C, 16 hours), grounded and sieved (80 mesh) to obtain modified cassava flour. Combination of autoclaving-cooling and fermentation could increase resistant starch level of *Mocaf*. Fermentation with 2 cycles of autoclaving-cooling (FAC-2S) produced the highest resistant starch content (12.51%) compared to other treatments. This value was around 4.5-fold higher than the control (2.81%). Increased levels of resistant starch could contribute to decrease the digestibility of *Mocaf*.

**Keywords:** autoclaving-cooling, fermentation, lactic acid bacteria, modified cassava flour, resistant starch

## 1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan keanekaragaman hayati termasuk tanaman pangan. Tanaman singkong merupakan salah satu tanaman pangan yang banyak tumbuh di Indonesia karena mudah ditanam dan dipelihara. Produksi singkong di Indonesia dari tahun ke tahun terus meningkat. Menurut Badan Pusat Statistik, produksi singkong di Indonesia pada tahun 2015 mencapai 22 juta ton dan produksi singkong pada tahun 2016 diprediksikan mencapai 23 juta ton (BPS, 2016). Salah satu produk olahan singkong yang sudah banyak dikembangkan adalah tepung singkong termodifikasi (Mocaf). Mocaf merupakan produk turunan dari tepung singkong yang menggunakan prinsip modifikasi sel singkong secara fermentasi selama 12-72 jam. Penggunaan tepung Mocaf sebagai pensubstitusi tepung terigu sudah banyak dilakukan. Mocaf dapat digunakan sebagai bahan baku dari berbagai jenis produk makanan, mulai dari mie, *bakery*, *cookies*, makanan semi basah dan campuran produk lain berbahan baku tepung terigu dengan karakteristik produk yang dihasilkan tidak jauh berbeda dengan penggunaan tepung terigu (Subagio, *et al.*, 2008). Saat ini kapasitas produksi Mocaf di Indonesia baru mencapai 360.000 ton per tahun. Dengan penanaman singkong sebagai bahan baku pembuatan Mocaf sekitar 2 juta ha, pemerintah optimistis bisa mengurangi ketergantungan pada tepung terigu impor. Tren pengembangan Mocaf saat ini terus meningkat karena teknologinya sederhana namun bernilai ekonomi tinggi.

Tepung singkong termasuk bahan pangan yang jika dilakukan modifikasi terhadap patinya akan menambah nilai fungsional. Salah satu produk modifikasi tepung singkong adalah pati resisten (Onyango, *et al.*, 2006). Pati resisten didefinisikan sebagai fraksi pati atau produk degradasi pati yang tidak terabsorpsi dalam usus halus individu yang sehat karena masih diperoleh setelah melewati degradasi enzim secara sempurna (Prangdimurti, *et al.*, 2007). Secara garis

besar, pati resisten mempunyai tiga sistem terkait dengan efek metabolisme dan nilai fungsional dalam tubuh yaitu sebagai bahan untuk fortifikasi serat, penurunan kalori dan oksidasi lemak (Birt, *et al.*, 2013). Pati resisten juga dapat membakar lemak melalui proses  $\beta$ -oksidasi sehingga menurunkan jumlah lemak yang disimpan dalam tubuh. Hal ini terkait dengan proses metabolisme karbohidrat dan protein dalam tubuh (Higgins, *et al.*, 2004).

Onyango, *et al.* (2006) menyatakan bahwa pati resisten memiliki beberapa manfaat diantaranya dapat berperan dalam metabolisme lemak dan kolesterol, mengurangi penyebab kanker kolon, penyakit jantung koroner, sembelit dan diabetes tipe II, mengikat racun, asam empedu dan karsinogen. Pati resisten (RS) dapat dikelompokkan menjadi lima tipe, yaitu pati resisten yang secara fisik terperangkap dalam matriks dinding sel bahan pangan (RS I), pati resisten yang secara alami tahan terhadap enzim pencernaan (RS II), pati resisten yang dimodifikasi secara fisik melalui proses retrogradasi (RS III), pati resisten yang dimodifikasi secara kimia (RS IV) dan pati resisten yang terbentuk karena interaksi pati dengan asam lemak (RSV) (Jenie, *et al.*, 2012). Diantara kelima jenis pati resisten tersebut, RS III yang paling sering digunakan dalam pemanfaatan bahan pangan dikarenakan pati jenis ini relatif tahan panas sehingga dapat mempertahankan sifatnya selama proses pengolahan pangan (Sugiyono, *et al.*, 2009).

Penelitian Juliana (2007) juga menunjukkan bahwa singkong memiliki kadar pati resisten tipe III yang cukup baik. Pati resisten tipe III ini diproses dengan pemanasan (gelatinisasi) yaitu pada suhu 121°C selama 15 menit, yang diikuti dengan proses pendinginan pada suhu ruang (Garcia-Alonso, *et al.*, 1999). Pati resisten tipe III dapat diperoleh dalam gel pati, tepung, adonan, produk yang dipanggang dan amilosa hasil fragmentasi. Sifat resisten tersebut disebabkan oleh adanya pati yang teretrogradasi. Pati resisten tipe III yang diperoleh dari hasil retrogradasi merupakan salah satu jenis

pati resisten yang banyak digunakan dalam pemanfaatan pangan karena dapat mempertahankan karakteristik organoleptik suatu makanan. Selain itu, pati resisten tipe III ini tahan panas sehingga sifatnya tetap terjaga selama proses pengolahan (Sugiyono, 2009). Pembuatan pati resisten tipe III yang berasal dari singkong dengan fermentasi bakteri asam laktat dan pemanasan bertekanan-pendinginan belum pernah dilakukan sebelumnya.

Penelitian ini bertujuan melakukan optimasi pembuatan tepung singkong (*Manihot esculenta* Crantz) modifikasi dengan metode fermentasi bakteri asam laktat dan pemanasan bertekanan-pendinginan untuk meningkatkan kadar pati resisten tipe III sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan fungsional. Hipotesis penelitian ini adalah perlakuan fermentasi bakteri asam laktat dan pemanasan bertekanan-pendinginan dapat meningkatkan kadar pati resisten tipe III pada tepung singkong termodifikasi.

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Bogor, Jawa Barat pada bulan Oktober 2016 hingga Januari 2017. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini berupa autoklaf Hirayama HVE, spektrofotometer UV-VIS, Biospec 160i, pH meter TOA, sentrifus *high speed* Kubota, *refrigerator*, *pin disc mill* (mesin penggiling tepung), inkubator Isuzu Himawari, neraca analitik TOA, *water bath*, oven Shimidzu, mikropipet Eppendorf (100-1000  $\mu$ L), mikropipet Sibata (1000-5000  $\mu$ L). Bahan baku yang digunakan adalah umbi singkong berumur 8 bulan dari daerah Megamendung Bogor, Jawa Barat. Kultur bakteri *Lactobacillus plantarum* B-307 dan *Leuconostoc mesenteroides* SU-LS 67, koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan Pusat Penelitian Biologi LIPI.

Media dan bahan kimia yang digunakan antara lain media MRS (*de Mann Rogosa Sharpe*) Agar dan *Broth*, m-

MRSB, m-TSB, TSB, TSA, *yeast extract* (Difco), *beef extract* (Difco), bacto agar (Difco), enzim  $\alpha$ -amilase Sigma A6380, enzim pepsin Sigma P6887, pankreatin Sigma P-1750, enzim amiloglukosidase Sigma A-9913, inulin Sigma I2255, glukosa, maltosa, 3,5-dinitrosalisilat (Merck), Na-K-tartarat (Merck), fenol (Merck), asam sulfat pekat, natrium dodesilsulfat, etanol, aseton, eter, NaCl, CaCO<sub>3</sub>, amonium sitrat, natrium asetat, magnesium sulfat, manganase sulfat, kalium fosfat, tween 80, NaOH (25% dan 1 N), HCl, akuades, buffer Na fosfat 0,05 M dan 0,01 M pH 6,9 dan pH 7, buffer sodium asetat 0,1 M pH 5,2 dan pH 6,0 dan 0,4 M pH 4,75, kertas saring Whatman No. 41.

### **Pretreatment Pada Umbi Singkong Untuk Menghilangkan Sianida (HCN)**

Kulit umbi singkong dikupas lalu diiris dengan ketebalan  $\pm 1$  cm kemudian direndam dalam larutan NaCl 1% (b/v) selama sehari semalam dan diganti setiap 3 jam untuk menghilangkan kandungan sianida pada umbi singkong. Setelah itu irisan umbi singkong dicuci dengan air bersih mengalir selama 2 jam dan ditiriskan (Setiarto, *et al.*, 2015).

### **Perlakuan Fermentasi dan Pemanasan Bertekanan-pendinginan Untuk Produksi Tepung Singkong Termodifikasi**

Fermentasi dilakukan pada irisan singkong menggunakan kultur campuran bakteri asam laktat (*Leuconostoc mesenteroides* SU-LS 67:*Lactobacillus plantarum* B-307 dengan rasio 1:1),  $10^8$  cfu/mL, 2% (v/v) pada suhu 37°C selama 18 jam. Fermentasi dihentikan setelah 18 jam kemudian cairan fermentasi dibuang dan irisan singkong dicuci dengan akuades steril lalu ditiriskan. Selanjutnya irisan singkong diberi perlakuan pemanasan bertekanan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan rasio irisan singkong:akuades = 1:2. Tujuan autoklaf adalah melakukan gelatinisasi pada sampel irisan singkong. Setelah diautoklaf, dilanjutkan dengan pendinginan menggunakan *refrigerator* pada suhu 4°C



Gambar 1. Pembuatan tepung singkong modifikasi dengan fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan

selama 24 jam yang bertujuan untuk memberikan efek retrogradasi pada sampel irisan singkong. Selanjutnya irisan singkong dikeringkan dengan oven pada suhu 70°C selama 16 jam lalu ditepungkan dengan *pin disk mill* dan diayak sehingga diperoleh sampel tepung singkong berukuran 80 mesh (Setiarto, 2015).

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan fermentasi bakteri asam laktat dan jumlah siklus pemanasan bertekanan-pendinginan (*autoclaving-cooling/AC*) terhadap kadar pati resisten yang terbentuk maka dilakukan pengelompokan tepung

singkong. Kelompok tanpa fermentasi yaitu: 1) Kode K (kontrol), 2) Kode AC-1S (1 siklus pemanasan bertekanan-pendinginan), 3) Kode AC-2S (2 siklus pemanasan bertekanan-pendinginan), 4) Kode AC-3S (3 siklus pemanasan bertekanan-pendinginan). Kelompok dengan fermentasi yaitu: 1) Kode F (fermentasi, tanpa siklus pemanasan bertekanan-pendinginan), 2) Kode FAC-1S (fermentasi, dengan 1 siklus pemanasan bertekanan-pendinginan), 3) Kode FAC-2S (fermentasi, dengan 2 siklus pemanasan bertekanan-pendinginan). Desain riset

yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf signifikansi 5% (Setiarto, 2015). Prosedur dan tahapan pembuatan tepung singkong modifikasi dengan perlakuan fermentasi dan pemanasan bertekanan-pendinginan ditunjukkan pada Gambar 1.

### Analisis Kimia Terhadap Tepung Singkong Termodifikasi Kaya Pati Resisten

Ketujuh sampel tepung singkong termodifikasi dari 2 kelompok perlakuan dilakukan analisis kadar total pati dengan metode spektrofotometri yang dilakukan oleh Dubois, *et al.* (1956), kadar gula pereduksi dengan metode spektrofotometri yang dilakukan oleh Miller (1959), kadar amilosa dan amilopektin dengan metode spektrofotometri yang dilakukan oleh Faridah, *et al.*, (2013), kadar pati cepat cerna (*Rapid Digestible Starch/RDS*), pati lambat cerna (*Slowly Digestible Starch/SDS*) dan kadar pati resisten (*Resistant Starch*) dengan metode spektrofotometri yang dilakukan oleh Engyst, *et al.* (1992), daya cerna pati *in-vitro* menggunakan metode yang dilakukan oleh Anderson, *et al.* (2002) sebanyak tiga kali ulangan (triplo).

### Analisis Statistika

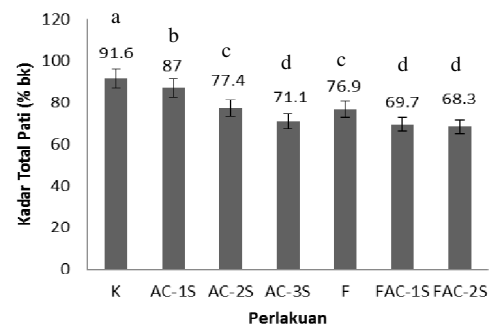
Data hasil penelitian untuk analisis kadar total pati, kadar amilosa, gula pereduksi, pati cepat cerna, pati lambat cerna, pati resisten dan daya cerna pati pada tepung singkong modifikasi diolah secara statistik dengan analisis sidik ragam (ANOVA) menggunakan Software SPSS 17.0.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kadar Total Pati Tepung Singkong

Hasil analisis kadar total pati (%bk) tepung singkong termodifikasi dapat dilihat pada Gambar 2 yang menunjukkan pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar total pati tepung singkong termodifikasi. Huruf yang berbeda pada diagram batang menunjukkan nilai yang berbeda nyata

dengan taraf nyata 95% ( $\alpha= 5\%$ ), setelah dilakukan uji Duncan pada SPSS 17.0.



Gambar 2. Pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar total pati tepung singkong modifikasi

Kadar total pati tepung singkong termodifikasi menunjukkan penurunan setelah diberi perlakuan fermentasi, pemanasan bertekanan-pendinginan beberapa siklus dan kombinasi fermentasi dengan pemanasan bertekanan-pendinginan. Semakin banyak jumlah siklus pemanasan bertekanan-pendinginan yang diaplikasikan berdampak terhadap penurunan kadar total pati tepung singkong termodifikasi secara signifikan ( $p<0,05$ ). Perlakuan pemanasan bertekanan-pendinginan meningkatkan jumlah pati terdegradasi sehingga menyebabkan kerusakan pada struktur fisik maupun kimia pati (Faridah, *et al.*, 2013).

Sementara itu, perlakuan fermentasi juga berperan menurunkan kadar total pati singkong karena bakteri asam laktat (BAL) memanfaatkan komponen pati singkong yaitu amilosa dan amilopektin sebagai nutrisi sumber karbon untuk pertumbuhannya. Kombinasi perlakuan fermentasi dan pemanasan bertekanan-pendinginan pada singkong dapat menurunkan kadar total pati singkong dengan sangat signifikan dan paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya. Pada penelitian lainnya, Jenie, *et al.* (2012) dan Nurhayati, *et al.* (2014) juga melaporkan bahwa proses fermentasi yang dilanjutkan dengan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan menyebabkan penurunan kadar total pati secara signifikan pada tepung pisang tanduk.

Berdasarkan hasil analisa statistik ANOVA diketahui bahwa kadar total pati pada tepung singkong kontrol menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dari tepung singkong AC-1S, AC-2S, AC-3S, FAC-1S dan FAC-2S. Berdasarkan uji beda nyata Duncan diketahui bahwa perlakuan FAC-2S memberikan dampak penurunan kadar total pati yang tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan perlakuan FAC-1S dan AC-3S.

Pada umumnya pati mengandung 15-30% amilosa, 70-85% amilopektin dan 5-10% bahan lain seperti lipid, protein dan mineral. Amilosa merupakan komponen pati yang mempunyai rantai lurus dan larut dalam air. Umumnya pati tersusun dari 17-21% amilosa, terdiri dari satuan glukosa yang bergabung melalui ikatan  $\alpha$ -(1-4) D-glukosa. Sementara, amilopektin merupakan komponen pati yang mempunyai rantai cabang, terdiri dari satuan glukosa yang bergabung melalui ikatan  $\alpha$ -(1-4) D-glukosa dan  $\alpha$ -(1-6) D-glukosa (Kusnandar, 2011). Pati singkong adalah salah satu sumber karbohidrat yang memiliki beberapa keunggulan yaitu suhu gelatinisasi yang rendah dan pasta yang jernih (Kasemsuwan, *et al.*, 1998). Pembentukan pati singkong dipengaruhi oleh beberapa faktor yang berpengaruh terhadap penyusunan amilum diantaranya temperatur yang rendah mempunyai pengaruh baik bagi perubahan amilum menjadi gula, persediaan air yang berlebihan akan menambah produksi untuk penyusunan amilum, perubahan pH terutama pada pH di atas 7 akan meningkatkan produksi pati dan intensitas sinar matahari (Kusnandar, 2011).

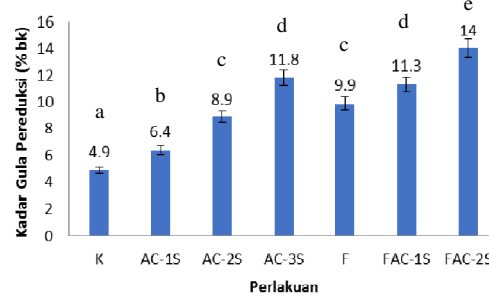
Kadar total pati pada tepung singkong menurun akibat perlakuan fermentasi oleh kultur BAL *Lactobacillus plantarum* B-307 dan *Leuconostoc mesenteroides* SU-LS67 yang mampu menghidrolisis pati singkong. Kedua kultur BAL tersebut diketahui memiliki aktivitas enzim amilase dan pululanase yang tinggi (Setiarto, *et al.*, 2015). Menurut Bhanwar dan Ganguli (2014), amilase menghidrolisis ikatan linier  $\alpha$ -1,4 glikosidik pada amilosa secara acak menghasilkan campuran dekstrin, maltosa

dan glukosa sedangkan menurut Vatanasuchart, *et al.* (2010), pululanase menghidrolisis ikatan percabangan  $\alpha$ -1,6 penghubung amilopektin sehingga dihasilkan amilosa rantai pendek. Selain itu, Zaragoza, *et al.* (2010) dan Vatanasuchart, *et al.* (2012) melaporkan bahwa penurunan kadar total pati juga dapat terjadi akibat putusnya ikatan glikosidik pada fraksi pati baik pada ikatan linier  $\alpha$ -1,4 amilosa dan ikatan percabangan  $\alpha$ -1,6 amilopektin oleh pemanasan autoklaf.

### Kadar Gula Pereduksi Tepung Singkong

Perlakuan fermentasi, pemanasan bertekanan-pendinginan beberapa siklus dan kombinasi fermentasi dengan pemanasan bertekanan-pendinginan secara umum memberikan pengaruh yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dalam meningkatkan kadar gula pereduksi tepung singkong. Semakin banyak jumlah siklus pemanasan bertekanan-pendinginan yang diberikan maka semakin tinggi kadar gula pereduksi pada tepung singkong termodifikasi.

Kadar gula pereduksi tertinggi pada penelitian ini adalah tepung singkong termodifikasi dengan perlakuan kombinasi fermentasi dengan dua siklus pemanasan bertekanan-pendinginan (FAC-2S) yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar gula pereduksi tepung singkong modifikasi

Gambar 3 menunjukkan pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar gula pereduksi tepung singkong



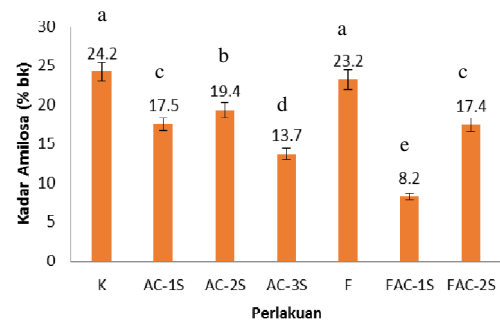
termodifikasi. Huruf yang berbeda pada diagram batang menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95% ( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji Duncan pada SPSS 17.0.

Peningkatan kadar gula pereduksi selama pemanasan bertekanan-pendinginan terjadi akibat terbentuknya komponen monosakarida dan disakarida seperti maltosa dan glukosa. Hal tersebut terjadi karena putusannya ikatan glikosidik linier  $\alpha$ -1,4 pada komponen amilosa dan ikatan glikosidik percabangan  $\alpha$ -1,6 pada komponen amilopektin pati akibat pemanasan autoklaf. Perlakuan fermentasi dapat meningkatkan kadar gula pereduksi secara signifikan karena kultur campuran bakteri asam laktat menghasilkan enzim amilase yang dapat menghidrolisis ikatan linier  $\alpha$ -1,4 glikosidik pada amilosa menjadi glukosa dan maltosa. Berdasarkan hasil analisa statistik dengan ANOVA, diketahui bahwa perlakuan kontrol menghasilkan kadar gula pereduksi yang berbeda nyata ( $p<0,05$ ) jika dibandingkan perlakuan fermentasi, AC-1S, AC-2S, AC-3S, FAC-1S, FAC-2S.

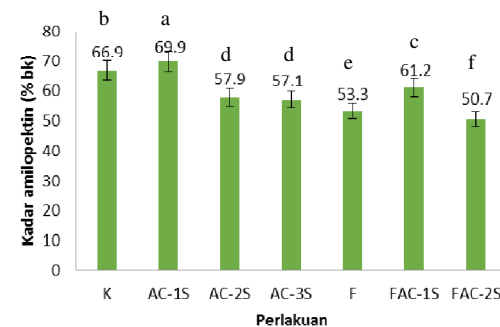
Gula pereduksi adalah gula atau monosakarida dan disakarida yang mempunyai gugus hidroksi bebas dan reaktif. Pada glukosa (aldose) dan biasanya terikat pada karbon nomor satu (anomerik) sedangkan pada fruktosa (ketosa) dengan gugus hidroksi reaktifnya terletak pada karbon nomor dua. Sementara itu, laktosa mempunyai gugus hidroksi bebas pada atom C nomor satu pada rantai glukosanya (Winarno, 2007). Peningkatan kadar gula pereduksi dipengaruhi oleh peningkatan kadar amilosa rantai pendek yang terbentuk sebagai akibat degradasi pati selama proses pemanasan autoklaf berlangsung yang ikut terukur sebagai gula pereduksi (Zaragoza, *et al.*, 2010; Moongarm, 2013). Penelitian lain yang dilaporkan oleh Vatanasuchart, *et al.*, (2010) menyebutkan bahwa amilase dan pululanase yang dihasilkan selama proses fermentasi oleh bakteri asam laktat akan menghidrolisis amilosa dan amilopektin menjadi glukosa dan maltosa yang merupakan gula pereduksi.

### Kadar Amilosa dan Amilopektin Tepung Singkong

Perlakuan fermentasi, siklus pemanasan bertekanan-pendinginan dan kombinasi keduanya diketahui dapat menurunkan kandungan amilosa dan amilopektin pada tepung singkong (Gambar 4 dan Gambar 5).



Gambar 4. Pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar amilosa tepung singkong modifikasi



Gambar 5. Pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar amilopektin tepung singkong modifikasi

Gambar 4 menunjukkan pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar amilosa tepung singkong termodifikasi dan Gambar 5 menunjukkan pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar amilopektin tepung singkong termodifikasi. Huruf yang berbeda pada diagram batang menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95%

( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji Duncan pada SPSS 17.0. Semakin banyak jumlah siklus pemanasan bertekanan-pendinginan yang diaplikasikan maka kadar amilosa dan amilopektin semakin menurun pada pati singkong akibat terjadinya kerusakan pada ikatan linier  $\alpha$ -1,4 glikosidik maupun ikatan percabangan  $\alpha$ -1,6 glikosidik akibat pemanasan autoklaf. Perlakuan fermentasi dengan kultur campuran bakteri asam laktat dapat menurunkan kandungan amilopektin pada tepung singkong secara signifikan ( $p<0,05$ ).

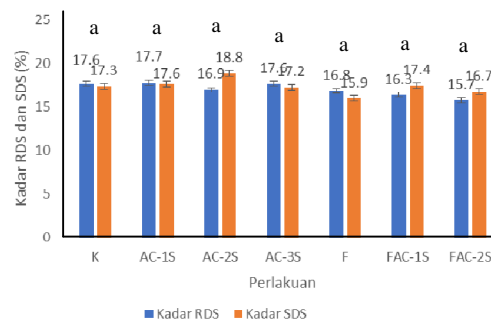
Sementara itu, perlakuan fermentasi relatif tidak signifikan dalam menurunkan kadar amilosa pada pati singkong. Hal tersebut menunjukkan bahwa kultur campuran bakteri asam laktat yang digunakan yaitu *L. plantarum* B-307 dan *Leu. mesenteroides* SU-LS 67 lebih aktif untuk memproduksi enzim pululanase dengan aktivitas yang tinggi selama fermentasi singkong. Enzim pululanase yang dihasilkan oleh kultur campuran BAL menghidrolisis amilopektin pada ikatan percabangan  $\alpha$ -1,6 selama fermentasi singkong (Bhanwar dan Ganguli, 2014). Berdasarkan hasil analisa statistik dengan ANOVA diketahui bahwa perlakuan fermentasi, pemanasan bertekanan pendinginan dan kombinasi fermentasi dengan pemanasan bertekanan-pendinginan cenderung menurunkan kadar amilosa dan amilopektin secara signifikan ( $p<0,05$ ) pada tepung singkong modifikasi.

Sudarmonowati, *et al.* (2007) melaporkan bahwa kandungan amilosa dari 160 genotip singkong yang ada di Indonesia berkisar antara 22,65-32,4% dan dikelompokkan berdasarkan kandungan amilosa sebagai berikut: sangat rendah (22,6-22,8%), rendah (23,8-24,9%), medium (25,4-29,6%), tinggi (30-31,2%) dan sangat tinggi (32,4-32,5%). Sementara itu, kadar amilosa pada tepung Mocaf adalah sebesar 34,75%, sedangkan kadar amilopektinnya adalah sebesar 39,55% (Purba, 2010). Zaragoza, *et al.* (2010) melaporkan bahwa penurunan kadar amilosa dan amilopektin dapat terjadi karena pemanasan autoklaf yang menyebabkan putusnya ikatan glikosidik

linier  $\alpha$ -1,4 pada amilosa dan ikatan percabangan  $\alpha$ -1,6 pada amilopektin.

### Kadar Pati Cepat Cerna (*Rapid Digestible Starch/RDS*) dan Pati Lambat Cerna (*Slowly Digestible Starch/SDS*) Tepung Singkong

Pengaruh perlakuan fermentasi kultur campuran bakteri asam laktat dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan maupun kombinasi kedua perlakuan tersebut terhadap kadar pati cepat cerna (RDS) dan pati lambat cerna (SDS) tepung singkong termodifikasi disajikan dalam Gambar 6.



Gambar 6. Pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar RDS dan SDS tepung singkong modifikasi

Gambar 6 menunjukkan pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar RDS dan SDS tepung singkong termodifikasi. Huruf yang berbeda pada diagram batang menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95% ( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji Duncan pada SPSS 17.0. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa kadar RDS dan SDS tepung singkong kontrol relatif tidak berubah secara signifikan ( $p>0,05$ ) jika dibandingkan dengan tepung singkong termodifikasi akibat perlakuan fermentasi, pemanasan bertekanan-pendinginan maupun kombinasi keduanya.

Pati dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu pati yang cepat dicerna atau *rapid digestible starch* (RDS) dan pati yang lambat dicerna atau *slowly digestible starch* (SDS). Pati cepat cerna adalah fraksi pati yang menyebabkan kenaikan



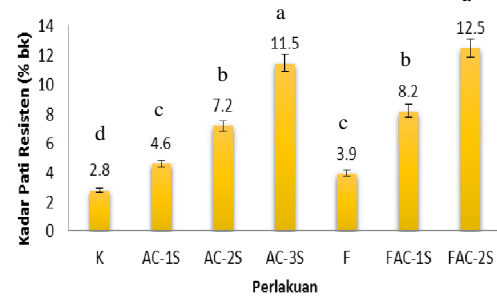
glukosa darah setelah makanan masuk ke dalam saluran pencernaan sedangkan pati lambat cerna adalah fraksi pati yang dicerna sempurna dalam usus halus dengan kecepatan yang lebih lambat dibandingkan pati cepat cerna (Kusnandar, 2011). Saguilan, *et al.*, (2005) melaporkan bahwa peningkatan kadar pati lambat cerna (SDS) dan penurunan jumlah pati cepat cerna (RDS) akan mengubah karakteristik bahan pangan menjadi lebih sulit dicerna. Proses *autoclaving-cooling* (AC) secara berulang pada penelitian ini telah menyebabkan peningkatan jumlah SDS karena terjadi pembentukan fraksi amilosa teretrogradasi atau terkristalisasi meskipun nilainya tidak signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian Saguilan, *et al.* (2005) yang melaporkan bahwa perlakuan *autoclaving-cooling* menyebabkan terjadinya peningkatan SDS dan penurunan RDS pada bahan pangan. Sementara itu, penurunan kadar pati cepat cerna (RDS) pada penelitian ini disebabkan oleh perlakuan fermentasi bakteri asam laktat. Jenie, *et al.*, (2012) melaporkan bahwa selama fermentasi telah terjadi pemanfaatan pati cepat cerna (RDS) oleh kultur campuran BAL. Bakteri asam laktat cenderung memanfaatkan RDS sebagai sumber karbon utama dan nutrisi untuk pertumbuhannya karena struktur RDS yang lebih mudah dihidrolisis oleh enzim amilase dan pululanase jika dibandingkan dengan struktur SDS (Jenie, *et al.*, 2012).

#### Kadar Pati Resisten Tepung Singkong

Hasil analisis kadar pati resisten terhadap tepung singkong termodifikasi dapat dilihat pada Gambar 7 yang menunjukkan pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar pati resisten tepung singkong termodifikasi. Huruf yang berbeda pada diagram batang menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95% ( $\alpha=5\%$ ), setelah dilakukan uji Duncan pada SPSS 17.0.

Secara umum terjadi peningkatan kadar pati resisten secara signifikan ( $p<0,05$ ) pada tepung singkong termodifikasi akibat perlakuan pemanasan bertekanan-pendinginan (AC-1S, AC-2S,

AC-3S) maupun kombinasi fermentasi dengan pemanasan bertekanan-pendinginan (FAC-1S, FAC-2S) jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol.



Gambar 7. Pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap kadar pati resisten tepung singkong modifikasi

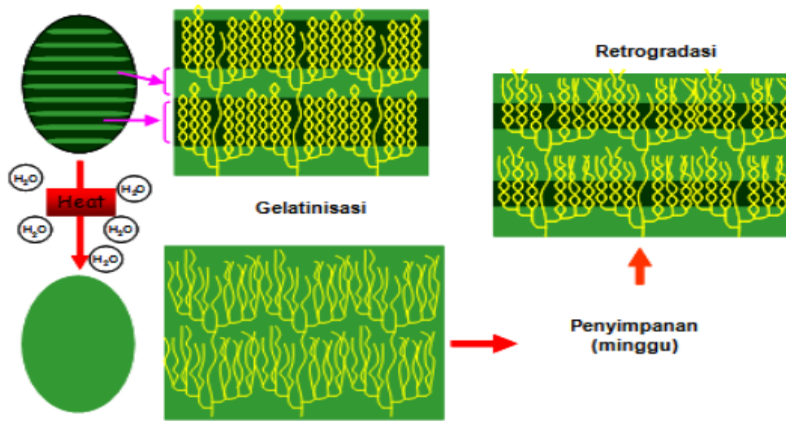
Semakin banyak jumlah siklus pemanasan bertekanan-pendinginan yang diaplikasikan berpengaruh signifikan ( $p<0,05$ ) terhadap peningkatan kadar pati resisten tepung singkong termodifikasi. Fenomena ini sesuai dengan penelitian Sugiyono, *et al.* (2009) dan Faridah, *et al.* (2013) pada pati garut serta penelitian Jenie, *et al.* (2012) dan Nurhayati *et al.* (2014) pada tepung pisang. Sementara itu pada perlakuan fermentasi terjadi peningkatan kadar pati resisten namun nilainya tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Hal ini akibat hidrolisis pati resisten alami pada singkong yaitu pati resisten tipe 1 (RS1) dan pati resisten tipe 2 (RS2) oleh enzim amilase dan pululanase yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (Jenie, *et al.*, 2012).

Perlakuan AC-1S meningkatkan kadar pati resisten sebanyak 1,6 kali lipat dibandingkan kontrol. Sementara itu, perlakuan AC-2S dan AC-3S semakin meningkatkan kadar RS berturut-turut menjadi 2,5 dan 4,1 kali lipat dibandingkan dengan kontrol seperti yang dapat dilihat pada Gambar 8 yaitu mekanisme pembentukan pati resisten (Sajilata, *et al.*, 2006). Perlakuan kombinasi fermentasi dengan 2 siklus pemanasan bertekanan-pendinginan (FAC-2S) menghasilkan kadar pati resisten tertinggi pada tepung

singkong modifikasi jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Perlakuan tersebut terbukti mampu meningkatkan kadar pati resisten sebesar 4,5 kali lipat jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Sementara itu, tepung singkong modifikasi dengan perlakuan FAC-1S meningkatkan kadar pati resisten secara signifikan menjadi 2,9 kali lipat jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Gambar 7).

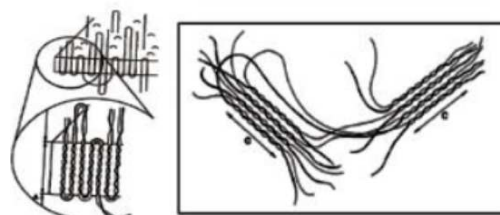
Sajilata, *et al.* (2006) melaporkan bahwa perlakuan pemanasan dengan menggunakan metode *autoclaving* dapat meningkatkan produksi pati resisten hingga 9%. Proses modifikasi ini terdiri atas dua tahap yaitu gelatinisasi dan

retrogradasi. Pada tahap awal, pati digelatinisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dengan proses *autoclaving* yang bertujuan untuk pembengkakan granula pati melalui pemanasan menggunakan air sehingga amilosa keluar. Proses gelatinisasi granula pati juga sangat dipengaruhi oleh nisbah pati dan air. Penambahan air yang terlalu sedikit ke dalam suspensi pati menyebabkan jumlah amilosa yang keluar dari granula tidak optimum. Hal ini dapat mengurangi kadar pati resisten yang terbentuk yang disebabkan oleh menurunnya peluang terjadinya reasosiasi amilosa-amilosa dan amilosa-amilopektin (Sajilata, *et al.* 2006).



Gambar 8. Mekanisme pembentukan pati resisten (Sajilata, *et al.*, 2006)

Peningkatan pati resisten terutama diakibatkan oleh terjadinya retrogradasi pada pati singkong. Pada saat tahap retrogradasi, molekul pati berupa amilosa maupun amilopektin akan saling berikatan kembali secara *double helix* sehingga membentuk struktur yang rapat dan stabil oleh ikatan hidrogen (Sajilata, *et al.*, 2006; Vatanasuchart, *et al.*, 2012). Granula pati yang kaya akan amilosa mempunyai kemampuan mengkristal yang lebih besar yang disebabkan oleh lebih intensifnya ikatan hidrogen (Gambar 8 dan 9). Pada saat pendinginan, rantai polimer terpisah sebagai ikatan ganda (*double helix*) dan mengalami pembentukan kembali ke struktur awalnya secara perlahan membentuk struktur kompak yang distabilkan oleh ikatan hidrogen (Karim, *et al.*, 2000).



Gambar 9. Ikatan ganda akibat retrogradasi pada pati resisten (Sajilata, *et al.*, 2006)

Modifikasi pati menggunakan metode *autoclaving-cooling*, proses gelatinisasi dan retrogradasi sangat berpengaruh terhadap naiknya kadar pati resisten seperti yang diperoleh dalam penelitian ini. Retrogradasi menyebabkan perubahan sifat-sifat gel pati diantaranya meningkatkan ketahanan pati terhadap hidrolisis enzim amilolitik, menurunkan

kemampuan transmisi cahaya dan kehilangan kemampuan untuk membentuk kompleks berwarna biru dan iodine (Ratnayake, *et al.*, 2002; Jane, 2004). Faktor-faktor yang mendukung terjadinya retrogradasi adalah suhu yang rendah, pH netral dan derajat polimerisasi yang relatif rendah tidak adanya percabangan ikatan dari molekul, konsentrasi amilosa yang tinggi dan adanya ion-ion organik tertentu (Jane, 2004). Dengan demikian terbukti dalam penelitian ini bahwa suhu yang rendah menghasilkan kadar pati resisten yang tinggi karena proses retrogradasi.

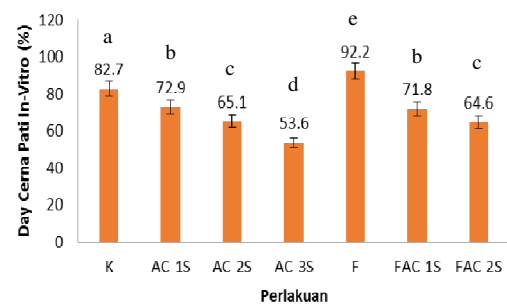
Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi proses pembentukan pati resisten menurut Sajilata, *et al.* (2006) diantaranya nisbah pati dan air atau konsentrasi pati, suhu *autoclaving*, jumlah siklus *autoclaving-cooling*, nisbah amilosa dan amilopektin, panjang rantai amilosa, hidrolisis asam (*lintnerisasi*) dan *debranching* amilopektin. Semakin banyak nisbah air yang ditambahkan pada saat proses gelatinisasi pati maka jumlah amilosa rantai pendek sebagai bahan baku pati resisten yang dihasilkan juga semakin banyak sehingga dapat meningkatkan kadar pati resisten pada bahan pangan (Faridah, *et al.*, 2013). Peningkatan kadar pati resisten dapat juga dilakukan dengan pemutusan ikatan cabang  $\alpha$ -1,6 amilopektin (*debranching*) oleh enzim pululanase yang dihasilkan selama fermentasi bakteri asam laktat yang dilanjutkan dengan siklus *autoclaving-cooling* (Ozturk, *et al.*, 2009; Pongjanta, *et al.*, 2009). Pemutusan ikatan percabangan (*debranching*) oleh pululanase terjadi pada ikatan  $\alpha$ -1,6 secara acak pada bagian dalam. Enzim pululanase bersifat stabil terhadap panas, bekerja pada rantai sisi cabang terluar dua atau lebih unit glukosa (Harianie, 2009).

Beberapa penelitian lainnya telah dilakukan terkait modifikasi berbagai jenis pati dengan beragam teknik untuk pembuatan pati resisten tipe III diantaranya modifikasi pati singkong dengan *autoclaving-cooling cycling* untuk menghasilkan pati resisten tipe III (Sugiyono, *et al.*, 2009), hidrolisis asam secara lambat yang dilanjutkan dengan

siklus *autoclaving-cooling* pada singkong (Onyango, *et al.*, 2006) dan hidrolisis menggunakan pululanase pada jagung (Zhang, 2011). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa modifikasi pati dengan pululanase dapat meningkatkan kadar pati resisten. Zhang (2011) melaporkan bahwa modifikasi dengan pululanase dapat meningkatkan kadar pati resisten sebesar 44,7%. Soto (2007) melaporkan bahwa *debranching* terhadap pati pisang dapat meningkatkan kadar pati resisten pisang tersebut.

### Daya Cerna Pati *in-vitro* Tepung Singkong

Perlakuan fermentasi berpengaruh signifikan ( $p < 0,05$ ) dalam meningkatkan daya cerna tepung singkong jika dibandingkan dengan kontrol. Gambar 10 menunjukkan pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap daya cerna *in-vitro* tepung singkong modifikasi. Huruf yang berbeda pada diagram batang menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan taraf nyata 95% ( $\alpha = 5\%$ ), setelah dilakukan uji Duncan pada SPSS 17.0. Sebaliknya perlakuan AC-1S, AC-2S, AC-3S, FAC-1S dan FAC-2S berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) menurunkan daya cerna tepung singkong jika dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 10. Pengaruh fermentasi dan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terhadap daya cerna *in-vitro* tepung singkong modifikasi

Daya cerna pati singkong berbanding terbalik dan berkorelasi negatif dengan kadar pati resistennya sehingga perlakuan fermentasi yang meningkatkan daya cerna pati justru menyebabkan

rendahnya kadar pati resistennya (Gambar 7). Daya cerna pati singkong pada perlakuan AC-1S menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata ( $p>0,05$ ) jika dibandingkan dengan perlakuan FAC-1S. Demikian halnya dengan daya cerna singkong pada perlakuan AC-2S yang juga menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata ( $p>0,05$ ) dengan perlakuan FAC-2S. Semakin banyak jumlah siklus pemanasan bertekanan-pendinginan yang diaplikasikan selama pembuatan tepung singkong modifikasi berdampak terhadap penurunan daya cerna tepung singkong secara signifikan.

Daya cerna pati dapat diartikan sebagai kemampuan pati untuk dapat dicerna dan diserap dalam tubuh. Semakin tinggi daya cerna pati menunjukkan semakin tinggi pati untuk diubah menjadi glukosa sehingga semakin tinggi pula kemampuan pati untuk menaikkan glukosa darah (Lestari, 2009). Analisis daya cerna pati merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan modifikasi pati karena daya cerna pati dapat berkorelasi dengan kadar pati resisten yang dihasilkan (Anderson, *et al.*, 2002). Semakin rendah daya cerna pati maka pati resisten yang terkandung di dalam bahan pangan semakin tinggi. Peningkatan daya cerna pada perlakuan fermentasi disebabkan oleh hidrolisis pati singkong oleh amilase dan pululanase sehingga terbentuk amilosa rantai pendek, oligosakarida, maltosa, maltotriosa, glukosa yang lebih mudah dicerna dengan indeks glikemik yang tinggi. Tepung singkong fermentasi dapat diaplikasikan sebagai bahan pangan yang mudah dicerna dan cepat diabsorpsi oleh tubuh sebagai sumber energi. Penurunan daya cerna pada perlakuan pemanasan bertekanan-pendinginan berhubungan dengan meningkatnya kadar pati resisten dan serat pangan akibat proses retrogradasi sebagaimana penelitian Vatanasuchart, *et al.* (2012) pada tepung pisang dan Faridah *et al.* (2013) pada pati garut.

Siklus *autoclaving-cooling* menyebabkan penurunan daya cerna pati melalui mekanisme penyusunan ulang molekul-molekul pati antara amilosa-

amilosa, amilosa-amilopektin, amilopektin-amilopektin yang berdampak pada penguatan ikatan pada pati dan membuat pati lebih sulit untuk tercerna (Shin, 2004). Perubahan struktur dan sifat pati karena siklus *autoclaving-cooling* sangat bergantung pada jenis tanaman. Jenis umbi-umbian lebih rentan jika diberi perlakuan siklus *autoclaving-cooling* dibandingkan dengan jenis biji-bijian dan kacang-kacangan (Shin, 2004).

#### 4. KESIMPULAN

Perlakuan pemanasan bertekanan-pendinginan beberapa siklus maupun kombinasi fermentasi dengan siklus pemanasan bertekanan-pendinginan terbukti mampu meningkatkan kadar pati resisten pada tepung singkong modifikasi. Peningkatan terhadap jumlah siklus pemanasan bertekanan-pendinginan yang diaplikasikan akan meningkatkan kadar pati resisten pada tepung singkong termodifikasi. Perlakuan fermentasi dengan 2 siklus pemanasan bertekanan-pendinginan (FAC-2S) menghasilkan kadar pati resisten tertinggi (12,51%) dibanding dengan perlakuan lainnya dan meningkatkan kadar pati resisten sebesar 4,5 kali lipat dibandingkan perlakuan kontrol (2,81%). Peningkatan kadar pati resisten pada tepung singkong modifikasi berdampak pada penurunan daya cernanya. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengevaluasi sifat prebiotik dari pati resisten tepung singkong modifikasi serta memanfaatkan *strain* bakteri asam laktat lain untuk dikaji potensinya dalam meningkatkan kadar pati resisten pada tepung singkong termodifikasi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan penelitian ini didanai oleh DIPA Tematik Pusat Penelitian Biologi LIPI 2016. Terima kasih yang sebesar-besarnya Penulis sampaikan kepada Syarah Sukmawati, Ibu Kasirah dan Nety Agustini yang telah membantu baik secara teknis maupun non teknis sehingga penelitian ini berjalan lancar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, A.K., Guraya, H.S., James, C. & Salvaggio, L. (2002). Digestibility and pasting properties of rice starch heat-moisture treated at the melting temperature (T<sub>m</sub>). *Journal Starch/Stärke*, 54, 401-409.
- Badan Pusat Statistik (BPS) Indonesia. (2016). *Berita Resmi Statistik*. Jakarta: Badan Pusat Statistik.
- Bhanwar, S. & Ganguli, A. (2014).  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase production on potato starch waste by *Lactococcus lactis subsp lactis* isolated from pickled yam. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 73, 324-330.
- Birt, D.F., Boylston, T., Hendrich, S., Lane, J., Hollis, J., Li, L., McClelland, J., Moore, S., Phillips, G.J., Rowling, M., Schalinske, K., Scott, M.P. & Whitley, M.P. (2013). Resistant Starch: Promise for Improving Human Health. *Advances in Nutrition*, 4(6), 587-601.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Journal Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M. & Cummings, J.H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, 533-550.
- Faridah, D.N., Rahayu, W.P. & Apriyadi, M.S. (2013). Modifikasi Pati Garut (*Marantha arundinacea*) dengan Perlakuan Hidrolisis Asam dan Siklus Pemanasan-Pendinginan Untuk Menghasilkan Pati Resisten Tipe 3. *Jurnal Teknologi Industri Pangan*, 23 (1), 61-69.
- Garcia-Alonso, Jimenez-Escrig, A., Martin-Carron, N., Bravo & Saura-Calixto, F. (1999). Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. *Food Chemistry*, 66, 181-187.
- Harianie, L., Yuniarta & Argo, B.D. (2009). Pembuatan pati tinggi amilosa secara enzimatik dari pati ubi kayu (*Manihot esculenta*) dan aplikasinya untuk pembuatan maltosa. *El-Hayah*, 1(1), 14-24.
- Higgins, J.A., Higbee, D.R., Donahoo, W.T., Brown, I.L., Bell, M.L. & Bessesen, D.H. (2004). Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutrition Metabolism*, 1, 8-16.
- Jane, J.I. (2004). *Starch: Structure and Properties*. CRC Press LLC.
- Jenie, B.S.L., Reski, P.P. & Kusnandar, F. (2012). Fermentasi Kultur Campuran Bakteri Asam Laktat dan Pemanasan Otoklaf dalam Meningkatkan Kadar Pati Resisten dan Sifat Fungsional Tepung Pisang Tanduk (*Musa parasidiaca formatypica*). *Jurnal Pascapanen*, 9 (1), 18-26.
- Juliana, R. (2007). *Resisten starch tipe III dan tipe IV pati singkong (Manihot esculenta Crantz), suweg (Amorphophallus campanulatus), dan ubi jalar (Ipomoea batatas L.) sebagai prebiotik*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Karim, A.A., Norziah, M.H. & Seow, C.C. (2000). Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chemistry*, 71, 9-36.
- Kasemsuwan, T., Bailey & T., Jane, J. (1998). Preparation of clear noodles with mixtures of tapioca and high-amylose starches. *Carbohydrate Polymer*, 32, 301-312.
- Kusnandar, F. (2011). *Kimia pangan komponen makro*. Jakarta: PT. Dian Rakyat.
- Lestari, O.A. (2009). *Karakterisasi sifat fisiko-kimia dan evaluasi nilai gizi biologis mi jagung kering yang disubstitusi tepung jagung termodifikasi*. Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Journal Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Moongngarm, A. (2013). Chemical Compositions and Resistant Starch Content in Starchy Foods. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 8 (2), 107-113.
- Nurhayati, Jenie, B.S.L., Widowati, S., & Kusumaningrum, H.D. (2014). Komposisi Kimia dan Kristalinitas Tepung Pisang Termodifikasi Secara Fermentasi Spontan dan Siklus

- Pemanasan Bertekanan-Pendinginan. *Agritech*, 34 (2), 146-150.
- Onyango, C., Bley, T., Jacob, A., Henle, T. & Rohm, H. (2006). Influence of incubation temperature and time on resistant starch type III formation from autoklaf and acid-hydrolysed cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 66, 494-499.
- Ozturk, S., Koksel, H. & Kahraman, K. (2009). Effect of debranching and heat treatments on formation and functional properties of resistant starch from highamylose corn starch. *Europe Food Test Technology*, 229, 115-125.
- Pongjanta, J., Utaipattanaceep, O., Naivikul & Piyachomkwan, K. (2009). Effect of preheated treatments on physicochemical properties of resistant starch type III from pululanase hydrolysis of high amylose rice starch. *American Journal of Food Technology*, 4(2), 79-89.
- Prangdimurti, E., Palupi, N.S. & Zakaria, F.R. (2007). *Metode evaluasi nilai biologis karbohidrat dan lemak*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Purba, S.F. (2010). *Pendugaan komposisi kimia Modified cassava flour (Mocaf) dengan metode Near Infra Red (NIR)*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ratnayake, W.S., Hoover, R. & Warkentin, T. (2002). Pea starch: composition, structure and properties: a review. *Starch/Starke*, 54, 217-234.
- Saguilan, A.A., Flores-Huicochea, E., Tovar, J., Garcia-Suarez, F., Guiterrez-Meraz, F. & Bello-Perez, L.A. (2005). Resistant starch rich-powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: partial characterization. *J Starch/Starke*, 57, 405-412.
- Sajilata, M.G., Rekha, S.S. & Puspha, R.K. (2006). Resistant starch a review. *Journal Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 5, 1-17.
- Setiarto, R.H.B., Jenie, B.S.L., Faridah, D.N., Saskiawan, I. & Sulistiani. (2015). Seleksi Bakteri Asam Laktat Penghasil Amilase dan Pululanase dan Aplikasinya Pada Fermentasi Talas. *J. Teknol dan Industri Pangan*. 26 (1): 82-91.
- Setiarto, R.H.B., Jenie, B.S.L., Faridah, D.N. & Saskiawan, I. (2015). Kajian Peningkatan Pati Resisten yang Terkandung dalam Bahan Pangan Sebagai Sumber Prebiotik. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 20(3),191-200.
- Setiarto, R.H.B. (2015). *Peningkatan Pati Resisten Tepung Talas Melalui Fermentasi dan Pemanasan Bertekanan-Pendinginan serta Evaluasi Sifat Prebiotiknya*. Tesis. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Shin, S.I., Byun, J., Park, K.H. & Moon, T.W. (2004). Effect of partial acid hydrolysis and heat-moisture treatment on formation of resistant tuber starch. *Cereal Chemistry*, 81, 194-198.
- Soto, R.A.G., Escobedo, R.M., Sanchez, H.H., Rivera, M.S. & Perez, L.A.B. (2007). The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoklaf debranched banana starch. *Food Research International*, 40, 304-310.
- Subagio, A., Windrati, W.S., Witono, Y. & Fahmi, F. (2008). *Prosedur Operasi Standar (POS) Produksi Mocal Berbasis Klaster*. Bogor: SEAFast Center IPB.
- Sudarmonowati, E., Hartati, N.S., Hartati & Sukmarini, L. (2007). *Amylose content variation of Indonesian cassava genotypes and its correlation with RAPD and AFLP Markers*. Bogor: Research Centre for Biotechnology-LIPI.
- Sugiyono, Pratiwi, R. & Faridah, D.N. (2009). Modifikasi Pati Garut dengan Perlakuan Siklus Pemanasan Suhu Tinggi-Pendinginan Untuk Menghasilkan Pati Resisten Tipe III. *Jurnal Teknologi Industri Pangan*, 20 (1), 17-24.
- Vatanasuchart, N., Niyomwit, B. & Wongkrajang, K. (2012). Resistant starch content, in vitro starch digestibility and physico-chemical properties of flour and starch from Thai bananas. *Maejo International Journal Science Technology*, 6(2), 259-271.
- Winarno, F.G. (2007). *Kimia pangan dan gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Zaragoza, E.F., Riquelme-Navarrete, M.J., Sanchez-Zapata, E. & Perez-Alvarez,



J.A. (2010). Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*, 43 (4), 931-942.

Zhang, H. & Jin, Z. (2011). Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pululanase. *Carbohydrate Polymers*, 83, 865-867.