

# RESISTEN\_DARI\_TEPUNG\_UMBI \_UWI\_Dioscorea\_alata\_TERMO DIFIKASI.pdf

*by*

---

**Submission date:** 06-Apr-2023 11:33AM (UTC+0700)

**Submission ID:** 2057270956

**File name:** RESISTEN\_DARI\_TEPUNG\_UMBI\_UWI\_Dioscorea\_alata\_TERMODIFIKASI.pdf (422.88K)

**Word count:** 6070

**Character count:** 36928

1  
**KARAKTERISTIK DAN AKTIVITAS PREBIOTIK PATI RESISTEN DARI TEPUNG UMBI UWI (*Dioscorea alata*) TERMODIFIKASI**

*Characteristics and Prebiotics Activity of Resistent Starch from Modified Yam Flour (*Dioscorea alata*)*

Sri Winarti, Jariyah dan Riski Ayu Anggreini

Food Technology Program, Faculty of Engineering, Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur, Surabaya

\*Corresponding author: winarti.srwing@gmail.com

**ABSTRAK**

Prebiotik merupakan bahan pangan yang tahan cerna sampai ke colon dan dapat meningkatkan jumlah bakteri menguntungkan dalam mikroflora usus. Pati resisten (RS) memiliki sifat sulit cerna sehingga dapat digolongkan sebagai salah satu sumber prebiotik. Salah satu komoditas lokal yang berpotensi untuk dijadikan prebiotik adalah uwi legi, hal ini dikarenakan kandungan patinya yang tinggi. Pati uwi legi dimodifikasi sehingga kandungan amilosa nya meningkat, sehingga dapat meningkatkan kadar pati resistennya setelah dilakukan autoclaving-cooling. Modifikasi bisa dilakukan dengan cara fermentasi pada perlakuan awal dengan menggunakan *Lactobacillus plantarum*. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui karakteristik dan aktifitas prebiotik pati resisten-tepung uwi legi (*Dioscorea alata*) termodifikasi. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor, yaitu faktor perlakuan pertama adalah lama fermentasi (0, 24, 48, 72 jam) dan faktor kedua jumlah autoclaving-cooling (1, 2, 3 siklus), dengan 2 ulangan analisa. Data yang diperoleh kemudian dianalisa ANOVA dan DMRT 95% menggunakan SPSS 19. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat interaksi yang nyata antara waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling, serta masing-masing perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap kadar pati, amilosa dan pati resisten (RS) tepung uwi termodifikasi. Terjadi perubahan kristalinitas dan struktur granula pati pada tepung uwi termodifikasi yang ditunjukkan dari hasil analisa dengan X-Ray Diffractometer. Pati resisten (RS) pada perlakuan terbaik yaitu lama fermentasi 24 jam dan 3 siklus autoclaving-cooling memiliki aktivitas prebiotik 0,11 terhadap *Lactobacillus acidophilus* dan 0,51 terhadap *Bifidobacterium breve*. Terjadi peningkatan 81,83% dan 50,98% pada masing-masing bakteri tersebut dibandingkan dengan tepung uwi yang belum termodifikasi.

**Kata kunci:** pati resisten, *Dioscorea alata*, aktivitas prebiotik, autoclaving-cooling

**ABSTRACT**

Prebiotics are foods that are digestible to the colon and can increase the number of beneficial bacteria in the intestinal microflora. Resistant starch (RS) has difficult to digest properties that can be classified as a source of prebiotics. One of the local commodities that has the potential to be used as prebiotics is uwi legi, this is due to its high starch content. Uwi legi starch was modified so that the amylose content increased, so that it could increase the levels of resistant starch after autoclaving-cooling. Modification can be done by fermentation in the initial treatment using *Lactobacillus plantarum*. The purpose of this study was to determine the characteristics and activities of prebiotic resistant starch of Uwi legi flour (*Dioscorea alata*) modified. The research design used was a factorial Complete Randomized Design (CRD) with 2 factors, namely the first treatment factor was fermentation time (0, 24, 48, 72 hours) and the second factor was the amount of autoclaving-cooling (1, 2, 3 cycles), with 2 repetitions of analysis. The data obtained were then analyzed ANOVA and DMRT 95% using SPSS 19. The results showed that there was a real interaction between the fermentation time and the number of autoclaving-cooling cycles, and each treatment gave a real influence on the levels of starch, amylose and resistant starch (RS) modified uwi flour. There was a change in the crystallinity and structure of the starch granules in the modified uwi flour which was shown from the results of the analysis using X-Ray Diffractometer. Resistant starch (RS) at the best treatment is 24 hours fermentation time and 3 autoclaving-cooling cycles having prebiotic activity 0.11 against *Lactobacillus acidophilus* and 0.51 against *Bifidobacterium breve*. An increase of 81.83% and 50.98% in each of these bacteria compared with unmodified uwi flour.

**Keywords:** resistant starch, *Dioscorea alata*, prebiotics activity, autoclaving-cooling

## PENDAHULUAN

Kesadaran masyarakat akan pentingnya kesehatan semakin meningkat, dan hal ini bisa ditandai dari tingginya permintaan prebiotik. Data yang didapatkan dari Anonim (2019), menyebutkan bahwa permintaan pasar global akan prebiotik diperkirakan meningkat lebih dari 3,2%, yaitu dari 2350 juta dolar di tahun 2019 menjadi 2840 juta dolar di tahun 2024. Prebiotik merupakan bahan makanan yang tidak bisa dicerna dan dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri kolon (Cho and Finocchiaro, 2010). Prebiotik yang sudah banyak dikomersialisasikan adalah golongan oligosakarida, rafnosa dan inulin dalam bentuk ingredien, suplemen dan makanan (Anonim, 2018). Selain golongan-golongan tersebut, terdapat jenis prebiotik lain yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai sumber prebiotik, yaitu pati resisten.

Pati resisten atau Resisten Starch (RS) adalah jenis pati yang tahan terhadap asam lambung dan tidak tercerna di dalam usus halus sehingga dapat masuk ke dalam kolon. Di dalam kolon RS dapat digunakan sebagai substrat bagi pertumbuhan mikroorganisme probiotik (Lu, et al., 2005; Sajlata, et al., 2006). Salah satu sumber pangan lokal yang kaya akan kandungan pati dan dapat dimanfaatkan sebagai pati resisten adalah uwi legi. Uwi legi (*Dioscorea alata*) adalah salah satu umbi lokal di Indonesia yang mempunyai kandungan pati dalam jumlah besar yaitu 83,38%-86,68% (Widyawati, 2017). Keberadaan pati dalam jumlah besar pada uwi dapat dimanfaatkan dalam bentuk pati resisten yang dapat digunakan sebagai prebiotik. Masyarakat umum biasanya memanfaatkan dan menyimpan umbi uwi dalam bentuk tepung (Winarti dan Saputro, 2013).

Secara alamiah, kandungan pati resisten (RS) pada bahan pangan alami sangat rendah (Faridah, dkk, 2013) sehingga diperlukan peningkatan jumlah RS. Peningkatan kadar RS

10 dapat dilakukan dengan modifikasi fisik yang dapat menghasilkan RS tipe 3 dan modifikasi kimia yang dapat menghasilkan RS tipe 4 (Setiarto, dkk, 2015). Namun sampai saat ini jenis RS yang telah diteliti aktivitas prebiotiknya secara in vitro maupun in vivo pada tikus dan babi serta pada manusia adalah RS tipe 2 dan tipe 3 (Dimitris and Robert, 2009). RS tipe 2 adalah RS yang secara alami terdapat pada tanaman dan tahan terhadap enzim  $\alpha$ -amilase pada pencernaan, sementara itu RS tipe 3 adalah RS yang terbentuk karena proses retrogradasi (Zaragoza, et al. 2010). RS tipe 3 dapat ditingkatkan menggunakan beberapa teknik modifikasi diantaranya adalah autoclaving-cooling (Setiarto dkk, 2015).

Proses autoclaving-cooling berulang dapat meningkatkan fraksi amilosa, dengan cara retrogradasi (Sagulan, et al., 2005). Hal ini didukung oleh Sajlata, et al., (2010) dan Asbar (2014), bahwa penggunaan 3 siklus pada autoclaving-cooling dapat menghasilkan kadar RS tertinggi. Sugiyono dkk (2009) menambahkan, perlakuan autoclaving-cooling 3 siklus menghasilkan kenakan jumlah RS yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan autoclaving-cooling 5 siklus. Namun demikian, teknik autoclaving-cooling memiliki kekurangan diantaranya adalah kurang efisien, karena butuh waktu produksi yang lebih lama, energi panas yang lebih besar, dan biaya produksi yang tinggi. Kekurangan dari teknik ini dapat diatasi dengan adanya perlakuan awal. Perlakuan awal yang dapat dilakukan adalah hidrolisis asam, debranching (pemutusan cabang amilopektin) dengan enzim pululanase dan fermentasi oleh bakteri asam laktat (BAL) (Setiarto dkk, 2015).

Fermentasi sebagai perlakuan awal dapat menurunkan jumlah siklus pada autoclaving-cooling (Setiarto dkk, 2015). Perlakuan fermentasi awal 2 menggunakan BAL dapat menghidrolisis pati dan inaktivasi amilopektin

sehingga dihasilkan polisakarida rantai pendek. Pati akan lebih mudah mengalami retrogradasi pada teknik autoclaving-cooling bila berada dalam bentuk molekul amilosa rantai pendek (Schmiedl, et al., 2000).

Proses fermentasi sebagai teknik modifikasi pati resisten dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah lama waktu fermentasi (Reddy, et al., 2008). Semakin lama waktu fermentasi maka semakin meningkat pula aktivitas amilase dan pululanase (Asha, et al. 2013). Semakin tinggi konsentrasi enzim pululanase yang digunakan maka semakin besar penurunan persentase distribusi rantai glukosa dengan DP 25-30 dan semakin besar pula peningkatan persentase distribusi rantai glukosa dengan DP 9-12 (Faridah dkk, 2010). Waktu fermentasi terbaik untuk meningkatkan kadar RS adalah 24 jam (Setiarto, 2015). Jenie dkk (2012) dalam penelitiannya menyatakan bahwa fermentasi tepung selama 72 jam tidak memberikan pengaruh terhadap kadar RS yang dihasilkan.

Untuk mengetahui kemampuan dari RS berfungsi sebagai prebiotik perlu dilakukan evaluasi sifat prebiotik RS tersebut. Metode yang dapat digunakan untuk mengevaluasi sifat prebiotik antara lain adalah pengujian indeks prebiotik, efek prebiotik dan pengujian aktivitas prebiotik dengan mengukur pertumbuhan bakteri prebiotik dan bakteri patogen (Setiarto, 2015).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh lama fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling terhadap karakteristik pati resisten (RS) dari tepung uwi legi (*Dioscorea alata*) termodifikasi dan mengevaluasi aktifitas prebiotik RS yang berasal dari tepung uwi legi (*Dioscorea alata*) termodifikasi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah uwi legi (*Dioscorea alata*) diperoleh dari Tuban, glukosa, etanol 80%, buffer sodium asetat (0,1 M pH 5,2), buffer KCl-HCl (pH 1,5), pepsin, porcine  $\alpha$ -amilase, KOH, amiloglukosidase, reagen DNS, larutan Luff Schoorl, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,01 N, HCl, NaOH, larutan iod, MRS Broth, dan MRS Agar, alcohol 70%, NaOH, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, phenolphthaleine, kultur bakteri *Lactobacillus plantarum* FNCC0027, *Lactobacillus casei* NCC-90 dan *Bifidobacterium breve* BRL-131 dan *E. coli* yang diperoleh dari Pusat Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain autoclaf, inkubator, cawan petri, neraca analitik, cawan petridish, spektrofotometer, pH-meter, termometer, colony counter, spektrofotometer, tensile strength tipe ZP-200N, Scanning Electron Mikroskop, X-Ray Difraktometer.

### Metode Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor, yaitu faktor perlakuan pertama adalah lama fermentasi (0, 24, 48, 72 jam) dan faktor kedua jumlah autoclaving-cooling (1, 2, 3 siklus), dengan 2 ulangan analisa. Data yang diperoleh kemudian dianalisa ANOVA dan DMRT 95% menggunakan SPSS 19.

### Prosedur Penelitian

#### a. Pembuatan Tepung Uwi

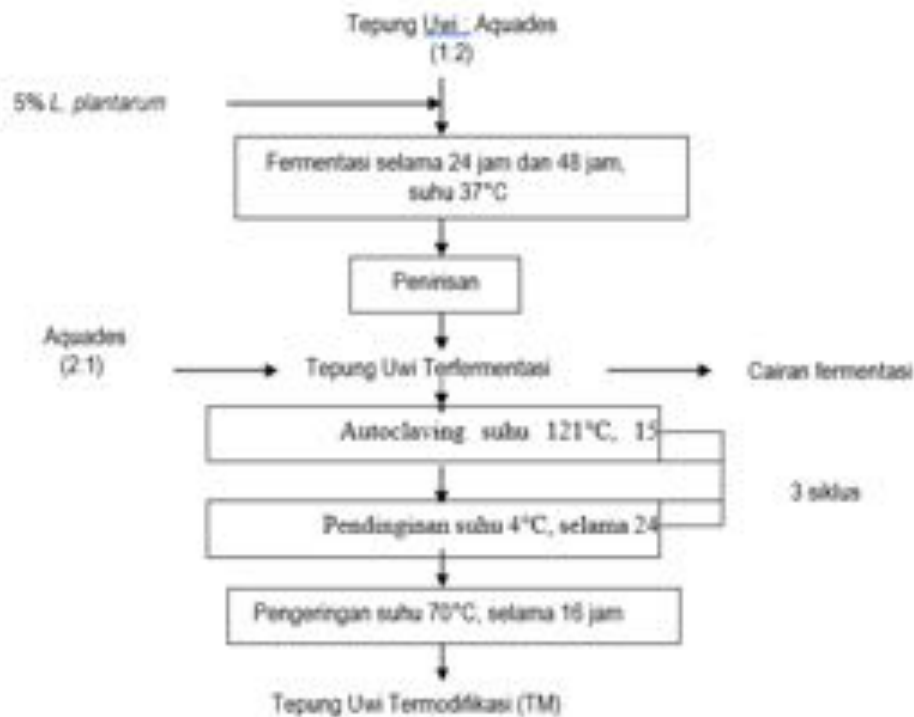
Pembuatan tepung uwi mengacu pada penelitian Nadia, (2013). Uwi dikupas terlebih dahulu, kemudian dilakukan pencucian dan penyusutan. Uwi yang telah disusut kemudian diberi perlakuan perendaman dengan garam 15% selama 1 jam.

Selanjutnya dilakukan blanching selama 10 menit dengan suhu 80°C. Uwi kemudian dikeringkan selama 16 jam menggunakan suhu 60°C, dilanjutkan dengan penggilingan dan pengayakan 80 mesh. Tepung uwi yang diperoleh kemudian dianalisa total pati, kadar amilosa dan pati resistennya.

#### b. Persiapan Starter (Suseno dkk, 2016)

Pembuatan starter diawali dengan memasukkan 0,1 ml *L. plantarum* FNCC0027 ke dalam 10 ml MRS Broth steril, kemudian dikubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. 10 ml kultur kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi media (tepung : aquades 1:10 (b/v)) dan MRS Broth (1:1) steril.

#### c. Pembuatan Tepung Uwi Termodifikasi (TM)



Gambar 1. Diagram Alir Pembuatan Tepung Uwi Termodifikasi (Setianto dkk., 2015).

### 3. Evaluasi Prebiotik Tepung Uwi Termodifikasi Terpilih (Huebner et al., 2007).

Tahapan ini dilakukan pada TM dengan kandungan RS tertinggi. Adapun pengujian yang dilakukan adalah aktivitas prebiotik, indeks prebiotik (Roberfroid, 2007), efek prebiotik (Roberfroid, 2007), granula pati dengan SEM dan kristalinitas dengan X-Ray (Wang et al., 2008). Selain tepung uwi terpilih, evaluasi prebiotik juga dilakukan pada tepung uwi (kontrol) dan inulin (prebiotik komersial). Derajat kristalinitas inulin diukur menggunakan X-Ray Diffractometer Rigaku DImax 2500 untuk powder (Rigaku, Tokyo, Japan) dengan radiasi Nickel filtered Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ ) pada voltase 40 kV dan arus listrik 200 mA. Hamburan cahaya radiasi dideteksi pada sudut rata-rata 5°–60° (2 $\theta$ ), dengan kecepatan scanning 8° (2 $\theta$ )/min dan langkah 0.05° (2 $\theta$ ). Derajat kristalinitas dapat dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut :

$X_c$  = derajat kristalinitas;  $A_c$  = luas area kristalin (selisih luas total area-luas area amorf);  $A_m$  = luas area amorf pada difraktogram (Gambar 1).

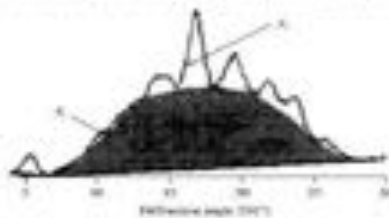


Figure 1. Calculation of degree of crystallinity of the starch.

Gambar 1. Perhitungan luas area difraktogram (Wang et al., 2008)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Total Bakteri Asam Laktat

Nilai rata-rata total koloni BAL (Bakteri Asam Laktat) selama fermentasi dapat dilihat pada Tabel 1. Bakteri dihitung dari cairan dan tepung setelah fermentasi.

Pada Tabel 1. Diketahui bahwa rata-rata total BAL medium fermentasi dari 6,29 log cfu/ml meningkat menjadi 12,22 log cfu/ml pada jam ke-24, dan 13,13 log cfu/ml pada jam ke 48, tetapi tidak terjadi peningkatan pada jam ke 72. Peningkatan total BAL selama fermentasi disebabkan bahwa bakteri yang digunakan yaitu *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027, merupakan bakteri asam laktat yang menghasilkan enzim amilase dan pululanase sehingga dapat menghidrolisis pati baik amilopektin maupun amilosa sebagai sumber energi. Menurut Petrova, et al.(2012), menyatakan bahwa *L.plantarum* menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase dan pululanase. Kim (2008), juga melaporkan bahwa *L.plantarum* yang disolasi dari beras dan ikan memiliki gen yang dapat mengkode enzim amilase dan pululanase. Hasil hidrolisis pati oleh enzim pululanase adalah amilosa, sedangkan hasil hidrolisis amilosa oleh enzim  $\alpha$ -amilase berupa oligosakarida, maltosa dan gula sederhana (glukosa) yang selanjutnya diubah menjadi asam laktat.

Tabel 1. Nilai rata-rata total bakteri asam laktat selama fermentasi

Lama fermentasi (jam)	Total BAL (log cfu/ml)
0	6,29± 0,03
24	12,22± 0,01
48	13,13± 0,02
72	13,22± 0,02

**Tabel 2.** Nilai rata-rata pH medium selama fermentasi tepung uwi legi oleh *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027.

Lama fermentasi (jam)	Total BAL (log cfu/ml)
0	6,5± 0,012
24	4,2± 0,02
48	4,1± 0,03
72	3,8± 0,02

## 2. Nilai Rata-rata pH

*Lactobacillus plantarum* merupakan kelompok bakteri asam laktat yang menghasilkan asam laktat dan asam-asam organik lain selama fermentasi. Asam yang dihasilkan oleh kelompok bakteri tersebut dapat menurunkan pH medium pertumbuhannya. Hasil analisa pH selama fermentasi tepung uwi legi (*Dioscorea alata*) dapat dilihat pada Tabel 2.

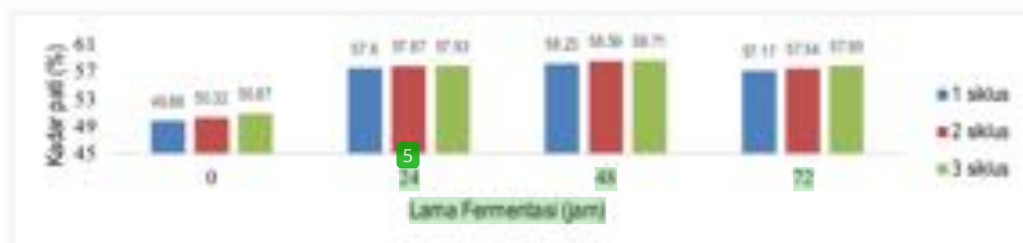
Pada Tabel 2, dapat diketahui bahwa semakin lama fermentasi nilai rata-rata pH semakin turun. Hal ini disebabkan karena semakin lama fermentasi terjadi peningkatan total BAL yaitu *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027, dimana bakteri tersebut menghasilkan enzim amilase dan pullulanase sehingga dapat menghidrolisis pati baik amilpektin maupun amilosa menghasilkan gula-gula sederhana, yang selanjutnya gula tersebut dirombak menjadi asam laktat maupun asam asetat yang dapat menurunkan pH medium. Menurut Haryono (2011), penurunan pH terjadi karena proses fermentasi terhadap karbohidrat, glukosa dan laktosa yang menghasilkan asam laktat oleh bakteri asam laktat. Menurut Utami, dkk, (2010), kenaikan asam laktat dalam fermentasi seimbang

13

dengan penurunan pH, dengan kata lain semakin besar kadar asam laktat semakin rendah pula nilai pH.

## 3. Kadar Pati

Berdasarkan analisis ragam dapat diketahui bahwa terdapat interaksi yang nyata ( $p < 0,05$ ) antara lama fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling, serta masing-masing perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap kadar pati tepung uwi temodifikasi. Terdapat kenaikan kadar pati tepung uwi temodifikasi dari kadar pati tepung uwi awal yaitu 49,57%. Rata-rata nilai kadar pati tepung uwi temodifikasi berkisar antara 49,88 – 58,71%. Perlakuan fermentasi selama 48 jam dan 3 siklus autoclaving-cooling menghasilkan tepung uwi dengan kadar pati tertinggi yaitu 58,71%, sedangkan perlakuan fermentasi 0 jam dan 1 siklus autoclaving-cooling menghasilkan tepung dengan kadar pati terendah yaitu 49,88%. Grafik perlakuan waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling terhadap kadar pati tepung uwi temodifikasi dapat diamati pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Kadar pati pada tepung uwi temodifikasi dengan perlakuan lama fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling

Pada Gambar 2, dapat diketahui bahwa kadar pati tepung uwi temodifikasi meningkat seiring dengan meningkatnya waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling. Namun kadar **5** pati tepung uwi yang difermentasi selama 48 jam lebih tinggi dibandingkan dengan kadar pati tepung uwi yang difermentasi selama 24 dan 72 jam. Hal ini disebabkan karena selama proses fermentasi bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* menghasilkan enzim selulolitik dan pektinolitik yang dapat mendegradasi dinding sel pada granula pati, menyebabkan pati dapat keluar dari granula pati, sehingga kadar pati meningkat. Namun, semakin lama fermentasi sebagian pati akan terhidrolisis menjadi gula-gula sederhana selanjutnya digunakan sebagai sumber energi oleh bakteri tersebut. Menurut Zalan, et al. (2010), menyatakan bahwa BAL dapat memfermentasi atau memecah karbohidrat (lebih utama glukosa) melalui dua jalur yaitu Embden-Meyerhof pathway dan 6-phosphogluconate pathway. Menurut Fried and George, (2006), kedua pathway ini menghasilkan ATP sebagai energi yang tersimpan di dalam sel. ATP adalah molekul universal yang berperan sebagai sumber energi pada sel. ATP dan prekursor-prekursornya digunakan sebagai medium pertukaran energi antar sel.

Kadar pati tepung uwi meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah siklus autoclaving-cooling. Hal ini disebabkan semakin tinggi suhu pemanasan dan dikusi tekanan tinggi menyebabkan sebagian molekul pati mengalami pemutusan rantai menjadi molekul yang lebih sederhana.

#### 4. Kadar Amilosa

Berdasarkan analisis ragam dapat diketahui bahwa terdapat interaksi yang nyata ( $p < 0,05$ ) antara waktu fermentasi dan **12** siklus autoclaving-cooling, serta masing-masing perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap kadar amilosa tepung uwi temodifikasi. Nilai rata-rata kadar amilosa tepung uwi temodifikasi dengan perlakuan waktu **5** fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling dapat dilihat pada Gambar 3.

Tepung uwi temodifikasi memiliki kadar amilosa yang lebih tinggi dibandingkan dengan tepung uwi sebelum temodifikasi. Rata-rata nilai kadar amilosa tepung uwi temodifikasi berkisar antara 16,77–21,79%. Perlakuan fermentasi selama 24 jam dan 1 siklus autoclaving-cooling menghasilkan tepung uwi dengan kadar amilosa tertinggi yaitu 21,79 %, sedangkan perlakuan fermentasi 72 jam dan 1 siklus autoclaving-cooling menghasilkan tepung dengan kadar amilosa terendah yaitu 16,77%.

Pada tabel 3 dapat diketahui bahwa kadar amilosa tepung uwi meningkat seiring dengan meningkatnya waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling. Namun kadar amilosa tepung uwi yang difermentasi selama 24 jam lebih tinggi **5** dibandingkan dengan kadar amilosa tepung uwi yang difermentasi selama 48 dan 72 jam. Kadar amilosa tepung uwi meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah siklus autoclaving-cooling. Namun kadar amilosa tepung uwi terfermentasi selama 48 dan 72 jam mengalami penurunan pada siklus ke 2 dan ke 3. Grafik perlakuan waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling terhadap kadar amilosa tepung uwi temodifikasi dapat diamati pada Gambar 3.





Gambar 3. Kadar amilosa pada tepung uwi termodifikasi dengan perlakuan lama fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling.

Pada Gambar 3, dapat diketahui bahwa semakin lama waktu fermentasi dan semakin banyak jumlah siklus autoclaving-cooling kadar amilosa tepung uwi meningkat. Namun kadar amilosa tepung uwi yang difermentasi selama 48 jam lebih tinggi dibandingkan dengan kadar amilosa tepung uwi yang difermentasi selama 24 dan 72 jam. Kadar amilosa tepung uwi meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah siklus autoclaving-cooling. Namun kadar amilosa tepung uwi terfermentasi selama 48 dan 72 jam mengalami penurunan pada siklus ke 3. Selama fermentasi *Lactobacillus plantarum* menghasilkan enzim pululanase yang dapat memutus ikatan 1,6-glikosidik atau rantai cabang amilopektin sehingga dihasilkan rantai lurus amilosa. Semakin lama fermentasi pertumbuhan *L. plantarum* semakin meningkat sehingga enzim yang dihasilkan juga semakin tinggi yang dapat meningkatkan kadar amilosa. Pada fermentasi yang lebih lama yaitu 72 jam terjadi penurunan kadar amilosa. Hal ini disebabkan sebagian amilosa yang terbentuk didegradasi oleh enzim  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*, sehingga terbentuk senyawa-senyawa yang lebih kecil yaitu oligosakarida, gula sederhana dan maltosa. Gula-gula sederhana tersebut selanjutnya dirombak sebagai sumber energi dan dihasilkan asam laktat. Menurut Setiarto dkk, (2015), bahwa teknik fermentasi dilakukan dengan menggunakan bakteri asam laktat (BAL) yang telah dilaporkan memiliki enzim amilase dan

enzim pululanase. Vatanasuchart *et al.*, (2010) menyatakan bahwa enzim pululanase yang dihasilkan dapat memutus ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosidik (amilopektin) secara acak pada bagian  $\alpha$ -1,6, sehingga dihasilkan polimer glukosa rantai lurus yang merupakan polisakarida dengan DP (Derajat Polimerisasi) lebih kecil. Aktivitas amilase dan pululanase semakin meningkat dengan lamanya waktu fermentasi (Asha, *et al.*, 2013).

#### 5. Kadar Pati Resisten (RS)

Berdasarkan analisis ragam dapat diketahui bahwa terdapat interaksi yang nyata ( $p \leq 0.05$ ) antara waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling, serta masing-masing perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap kadar RS tepung uwi termodifikasi. Nilai rata-rata kadar RS tepung uwi termodifikasi dengan perlakuan waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling dapat dilihat pada Tabel 4.

Rata-rata kadar RS tepung uwi termodifikasi kisar antara 0.96–5.48%. Perlakuan fermentasi selama 24 jam dan 3 siklus autoclaving-cooling menghasilkan tepung uwi dengan kadar RS tertinggi yaitu 5.48 %, sedangkan perlakuan fermentasi 72 jam dan 1 siklus autoclaving-cooling menghasilkan tepung dengan kadar RS terendah yaitu 0.96 %. Grafik hubungan antara perlakuan waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling terhadap kadar RS tepung uwi termodifikasi dapat diamati pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Kadar RS tepung ubi termodifikasi pada perlakuan lama fermentasi dan siklus autoclaving-cooling

Pada **Gambar 3**, dapat diketahui bahwa kadar RS tepung ubi termodifikasi meningkat seiring dengan meningkatnya waktu fermentasi dan jumlah siklus autoclaving-cooling. Namun kadar RS tepung ubi yang difermentasi selama 24 jam lebih tinggi dibandingkan dengan kadar RS tepung ubi yang difermentasi selama 48 dan 72 jam. Selama fermentasi *Lactobacillus plantarum* menghasilkan enzim pululanase yang dapat memutus ikatan 1,6-glikosidik atau rantai cabang amilopektin sehingga dihasilkan rantai lurus amilosa. Semakin lama fermentasi pertumbuhan *L.plantarum* semakin meningkat sehingga enzim yang dihasilkan juga semakin tinggi yang dapat meningkatkan kadar amilosa. Semakin tinggi kadar amilosa maka pada proses autoclaving-cooling maka suspensi pati pada suhu gelatinisasi dapat menyebabkan terjadinya pemutusan (disosiasi) ikatan hidrogen dari struktur double helix amilopektin, pelepasan (melting) bagian kristalin dan pelepasan amilosa dari granula (amylose leaching). Selanjutnya pasta pati didinginkan (cooling) yang dapat menyebabkan fraksi amilosa mengalami retrogradasi. Proses autoclaving-cooling secara berulang dapat menyebabkan semakin banyaknya pembentukan fraksi amilosa teretrogradasi atau terkristalisasi, sehingga semakin banyak siklus semakin meningkat jumlah kadar RS.

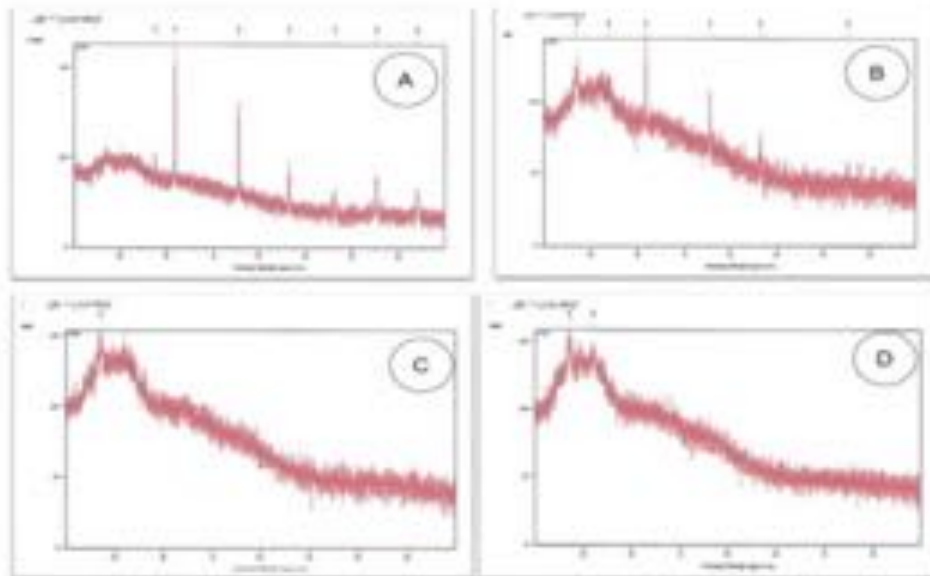
Pada fermentasi yang lebih lama yaitu 48 dan 72 jam terjadi penurunan kadar RS. Hal ini disebabkan sebagian amilosa yang terbentuk didegradasi oleh enzim  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan

oleh *L.plantarum*, sehingga terbentuk senyawa-senyawa yang lebih kecil yaitu oligosakarida, gula sederhana dan maltosa. Gula-gula sederhana tersebut tidak dapat membentuk struktur double helix pada proses retrogradasi setelah autoclaving-cooling.

## 6. KRISTALINITAS

Berdasarkan analisis hasil analisis kadar RS yang paling tinggi maka perlakuan terbaik dipilih adalah 3 siklus autoclaving-cooling. Selanjutnya pada perlakuan tersebut dianalisis kristalinitas menggunakan X-Ray diffractometer, analisa granula dengan SEM dan analisis aktivitas prebiotik.

Derajat kristalinitas dihitung berdasarkan rumus Wang et al., (2008), dan menyatakan bahwa derajat kristalinitas pati atau bahan lain disebabkan oleh adanya ikatan hidrogen antar dan intermolekul dalam sel. Semakin banyak ikatan hidrogen antar molekul maka derajat kristalinitas semakin besar. Pati resisten memiliki sifat kristalin yang ditunjukkan pada hasil analisis dengan X-Ray diffractometer (**Gambar 4**).



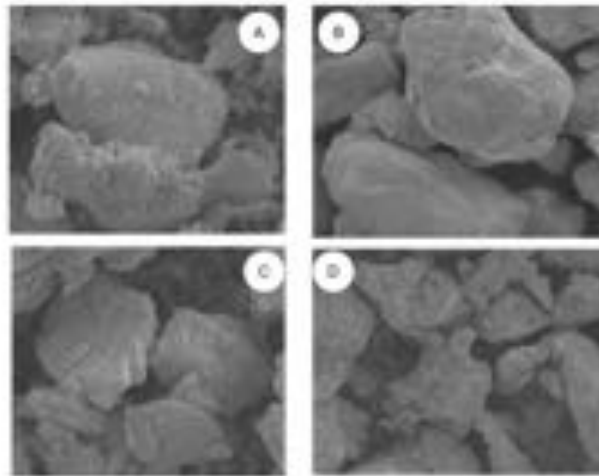
Gambar 4. Hasil analisa kristalinitas menggunakan X-Ray Diffractometer

Pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa bahan baku (A) yaitu tepung sebelum dilakukan modifikasi memiliki struktur kristalin yang ditunjukkan oleh sudut-sudut lancip yang terdeteksi dengan sudut  $2\theta$ , pati termodifikasi dengan fermentasi 24 jam (B) struktur kristalin lebih dominan dibandingkan dengan pati termodifikasi dengan fermentasi 48 jam (C) dan fermentasi 72 jam (D).

Semakin lama waktu fermentasi menyebabkan lebih banyak molekul amilosa yang membentuk struktur double helix dan mengkristal selama retrogradasi. Proses fermentasi berperan dalam menambah jumlah molekul amilosa dan memotong rantai amilosa menjadi lebih pendek agar lebih mudah berikatan kembali membentuk struktur double helix dan mengkristal selama proses autoclaving-cooling. BeMiller and Roy

(2009) menyatakan bahwa tingkat retrogradasi amilosa meningkat dengan peningkatan jumlah amilosa. Semakin lama waktu fermentasi menyebabkan semakin banyak amilosa rantai pendek yang terbentuk. Amilosa rantai pendek dihasilkan dari proses hidrolisis pati oleh *L. plantarum* menggunakan enzim pullulanase dan  $\alpha$ -amilase. Enzim pullulanase dapat mengkonversi amilopektin menjadi amilosa melalui pemotongan cabang, menurut Vatanasuchart, et al., (2012) enzim pullulanase dapat menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik secara acak dari bagian dalam sehingga dihasilkan polisakarida dengan rantai lurus. Enzim  $\alpha$ -amilase akan memotong rantai amilosa menjadi lebih pendek, pemotongan rantai amilosa oleh enzim  $\alpha$ -amilase menurut Giring (2009) terjadi pada ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik secara acak.

## 7. Hasil Analisa SEM (Scanning Electron Microscope)



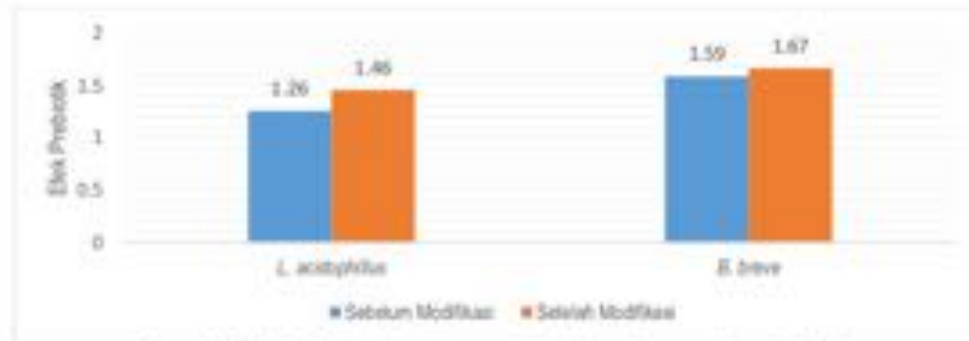
Gambar 5. Hasil analisis granula pati menggunakan SEM (Scanning Electron Microscope)

Gambar 5, menunjukkan bahwa bentuk dari granula tepung ubi sebelum bahan adalah oval dan terdapat serpihan-serpihan pada permukaan granula pati (Gambar 5A). Semakin lama fermentasi bentuk granula pati semakin rusak, granula pati pada tepung yang telah dimodifikasi tidak utuh dan berbentuk lagi serta terdapat lubang-lubang di sekitar permukaan granula (Gambar 5B, fermentasi 24 jam; Gambar 5C fermentasi 48 jam dan Gambar 5D fermentasi 72 jam). Lubang-lubang tersebut terbentuk selama proses fermentasi akibat dari hidrolisis pati oleh  $\alpha$ -amilase dan pullulanase di dalam granula pati. Nadia dkk (2013) dalam penelitiannya menyatakan bahwa bentuk granula pati tepung ubi adalah oval dan memiliki permukaan yang halus. Serpihan-serpihan halus yang terlihat pada granula pati tepung ubi tanpa modifikasi adalah beberapa granula yang telah tergelatinisasi akibat penggunaan metode blansing untuk menghambat proses pencoklatan non enzimatis. Menurut Sujka and Jamroz (2007) salah satu penyebab granula pati memiliki permukaan yang porous adalah kerja dari enzim-enzim amilolitik. Selain itu, bentuk granula pati yang tidak

utuh dan tidak berbentuk lagi setelah proses modifikasi disebabkan karena adanya gelatinisasi selama proses autoclaving. Proses autoclaving yang dilakukan pada suhu tinggi, yaitu 121 °C menyebabkan terjadinya proses gelatinisasi. Ketika proses gelatinisasi terjadi maka granula pati akan pecah membentuk struktur tiga dimensi dan meningkatkan konsentrasi larutan. Menurut Faridah (2011) proses gelatinisasi dimulai dengan terjadinya pengembangan granula, peluruhan bagian kristalin yang mengakibatkan hilangnya sifat birefringence. Setelah pengembangan granula mencapai maksimum maka granula pati akan pecah.

## 8. Efek Prebiotik, Indeks Prebiotik dan Aktivitas Prebiotik

Tepung ubi dengan kadar RS tertinggi yaitu A2B3 kemudian dilakukan analisa lanjutan yaitu evaluasi prebiotik. Evaluasi prebiotik mempunyai 3 parameter yaitu efek prebiotik, indeks prebiotik dan aktifitas prebiotik. Hasil analisa efek prebiotik dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Nilai efek prebiotik tepung uwi sebelum dan sesudah modifikasi.

Gambar 6, menunjukkan bahwa terdapat peningkatan nilai efek prebiotik tepung uwi termodifikasi terhadap bakteri *L. acidophilus* dan *B. breve*. Efek prebiotik terhadap *L. acidophilus* meningkat dari 1.26 menjadi 1.46 sedangkan efek prebiotik terhadap *B. breve* meningkat dari 1.59 menjadi 1.67. Peningkatan nilai efek prebiotik dapat diartikan sebagai peningkatan populasi bakteri prebiotik. Peningkatan nilai efek prebiotik terhadap *L. acidophilus* dan *B. breve* terjadi karena kandungan RS pada tepung uwi termodifikasi lebih tinggi dibandingkan kandungan RS pada tepung uwi tanpa modifikasi. Tepung uwi tanpa modifikasi memiliki kadar RS sebesar 1.99% sedangkan

tepung uwi termodifikasi memiliki kadar RS sebesar 5.48%. *L. acidophilus* dan *B. breve* adalah salah satu bakteri yang dapat memfermentasi karbohidrat tidak tercerna untuk digunakan sebagai media pertumbuhan. RS termasuk dalam golongan karbohidrat yang tidak tercerna sehingga *L. acidophilus* dan *B. breve* juga dapat memfermentasi molekul ini. Liu (2005) menambahkan bahwa RS atau resistant starch termasuk ke dalam golongan pati, hanya saja jenis pati ini tidak tercerna oleh usus halus dan langsung masuk ke dalam usus besar untuk difermentasi. Hasil analisa indeks prebiotik tepung uwi dapat dilihat pada Gambar 7.



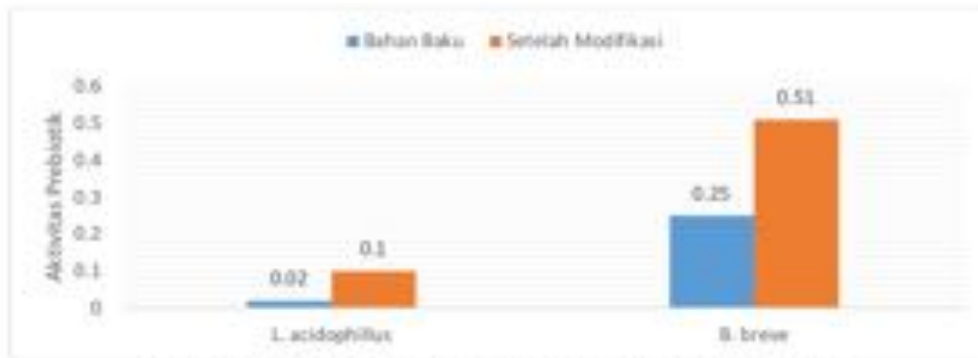
Gambar 7. Nilai indeks prebiotik tepung uwi sebelum dan sesudah modifikasi.

Indeks prebiotik adalah peningkatan populasi bakteri probiotik yang dikorelasikan dengan konsentrasi prebiotik. **Gambar 7**, menunjukkan bahwa terdapat peningkatan nilai indeks prebiotik tepung uwi sesudah modifikasi terhadap *L. acidophilus* dan *B. breve*. Indeks prebiotik terhadap *L. acidophilus* meningkat dari 5.04 menjadi 5.83 sedangkan indeks prebiotik terhadap *B. breve* meningkat dari 6.36 menjadi 6.70. Peningkatan nilai indeks prebiotik terhadap *L. acidophilus* dan *B. breve* terjadi karena kandungan RS pada tepung uwi termodifikasi lebih tinggi dibandingkan kandungan RS pada tepung uwi tanpa modifikasi. Tepung uwi tanpa modifikasi memiliki kadar RS sebesar 1.59% sedangkan tepung uwi termodifikasi memiliki kadar RS sebesar 5.48%. *L. acidophilus* dan *B. breve* adalah salah satu bakteri yang dapat memfermentasi karbohidrat untuk digunakan sebagai media pertumbuhan. RS termasuk dalam golongan karbohidrat sehingga *L. acidophilus* dan *B. breve* juga dapat memfermentasi molekul ini. Liu (2005) menambahkan bahwa RS atau resistant starch termasuk ke dalam golongan pati, hanya saja jenis pati ini tidak tercerna oleh usus halus dan langsung masuk ke dalam usus besar untuk difermentasi. Menurut Manderson, et al. (2005) bahan yang memiliki indeks prebiotik di atas 2 dapat dimanfaatkan sebagai prebiotik. Berdasarkan literatur dari Manderson, et al. (2005) tepung uwi tanpa modifikasi dan termodifikasi dapat digunakan sebagai sumber prebiotik. Hasil analisa aktivitas prebiotik dapat dilihat pada **Gambar 8**.

**Gambar 8**, menunjukkan bahwa terdapat peningkatan nilai aktivitas prebiotik tepung uwi sebelum modifikasi dan sesudah modifikasi terhadap bakteri *L. acidophilus* dan *B. breve*.

Aktivitas prebiotik tepung uwi terhadap *L. acidophilus* memiliki nilai positif dan terjadi kenaikan nilai aktivitas prebiotiknya setelah proses modifikasi. Nilai aktivitas prebiotik tepung uwi tanpa modifikasi dan termodifikasi terhadap *L. acidophilus* adalah 0.02 dan 0.10. Aktivitas prebiotik tepung uwi terhadap *B. breve* memiliki nilai positif dan terjadi kenaikan nilai aktivitas prebiotiknya setelah proses modifikasi. Nilai aktivitas prebiotik tepung uwi tanpa modifikasi dan termodifikasi terhadap *B. breve* adalah 0.25 dan 0.51. Menurut Huebner, et al. (2007) aktivitas prebiotik positif menunjukkan bahwa komponen bahan pangan (RS) secara selektif dapat dimetabolisme oleh BAL probiotik tetapi tidak dapat dimetabolisme oleh bakteri patogen seperti EPEC (*Enteropathogenic Escheria Coli*).

Penelitian dari Agustina (2016) juga menyatakan bahwa RS3 hasil isolasi pati daluga menunjukkan aktivitas prebiotik bernilai positif pada pertumbuhan *L. acidophilus* dan *L. plantarum*. Kenaikan nilai aktivitas prebiotik antara tepung uwi tanpa modifikasi dan dengan termodifikasi terjadi karena adanya peningkatan kandungan RS pada tepung uwi. Tepung uwi tanpa modifikasi memiliki kadar RS sebesar 1.59% sedangkan tepung uwi termodifikasi memiliki kadar RS sebesar 5.48%. Semakin banyak kadar RS dalam bahan, maka jumlah koloni *L. acidophilus* dan *B. breve* yang tumbuh juga semakin banyak dan menaikkan nilai aktivitas prebiotik. RS dapat digunakan sebagai media pertumbuhan karena *L. acidophilus* dan *B. breve* termasuk golongan bakteri yang dapat memfermentasi karbohidrat. Liu (2005) menambahkan bahwa RS atau resistant starch termasuk ke dalam golongan pati, hanya saja jenis pati ini tidak tercerna oleh usus halus dan langsung masuk ke dalam usus besar untuk difermentasi.



Gambar 8. Aktivitas prebiotik tepung uwi sebelum dan sesudah modifikasi.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat interaksi yang nyata antara waktu fermentasi<sup>12</sup> dan jumlah siklus autoclaving-cooling, serta masing-masing perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap kadar pati, amilosa dan pati resisten (RS) tepung uwi termodifikasi. Terjadi perubahan kristalinitas dan struktur granula pati pada tepung uwi termodifikasi. Pati resisten (RS) pada perlakuan terbaik yaitu lama fermentasi 24 jam dan 3 siklus autoclaving-cooling memiliki aktivitas prebiotik 0,11 terhadap *Lactobacillus acidophilus* dan 0,51 terhadap *Bifidobacterium breve*. Terjadi peningkatan 81,83% dan 50,96% pada masing-masing bakteri tersebut dibandingkan dengan tepung uwi yang belum termodifikasi.

## UCAPAN TERIMAKASH

Terimakasih disampaikan kepada UPN Veteran Jatim yang telah mendanai penelitian ini melalui dana RiSET MANDIRI RUK (Riset Unggulan Keilmuan).

## DAFTAR PUSTAKA

Agosin E, D. Diaz, R. Aravena, and Yanez, 1989. Chemical and Nutritional Characterization of Lupine Tempeh. *Journal of Food Science*, Volume 54, No.1, University of Food Science, Chile

Apriyantono, A., D. Fardiaz, N. L. Puspitasari, Sedarnawati dan S. Budiyanto. 1989. *Analisa Pangan*. IPB Press. Bogor.

Astuti, E. Y. 2009. Potensi Beberapa Jamur *Mucor* sp. dan *Rhizopus* sp. sebagai Sumber Minyak Sel Tunggal. (Skripsi). Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. Badan Standarisasi Nasional. 2009. SNI-2961:2009. Minuman Susu Fermentasi. Jakarta.

Bintari, S. H., A. Dyah, V. Eka, dan R. Citra. 2008. Efek Inokulasi Bakteri *Micrococcus luteus* terhadap Pertumbuhan Jamur Benang dan Kandungan Isoflavon pada Proses Pengolahan Tempe. *Jurnal Biosaintifika*. 1:1-8.

Charakampopoulos, D. R., Wang S. S. Pandella and C. Webb. 2002. Application of Cereals And Cereal Component In Functional Food: a Review *International journal of microbiology*.79:131-141.

Cholid, M. 2009. Pemanfaatan produk bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) sebagai bahan pangan, biofuel dan nilai tambah lainnya. Info Tek Perkebunan, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Bogor.

Dwinaningsih, E. A. 2010. Karakteristik Kimia dan Sensori Tempe dengan Variasi Bahan Baku Kedelai/Beras dan Penambahan Angkak serta Variasi Lama Fermentasi. (Skripsi). Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut. Dep. Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Bogor. IPB.
- Harish, K and T. Varghese. 2006. Probiotics in Human – Evidence Based Review. Di dalam: Sawitri, M E. 2011. Kajian Penggunaan Ekstrak Susu Kedelai Terhadap Kualitas Kefir Susu Kambing. Jurnal Ternak Tropika Vol. 12 No.1: 15-21.
- Hidayat, N. 2009. Tahapan Proses Pembuatan Tempe. <http://lecture.brawijaya.ac.id/Nurhidayat/>. Diakses 15 april 2018.
- Kholimah. 2007. Karakterisasi Pertumbuhan dan Perkembangan Berbagai Varietas Bunga Matahari (*Helianthus annuus L.*). [http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/1195/A06kko\\_abstract.pdf?sessionid=F32745D01EE1399993B840CD03B3566D?sequence](http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/1195/A06kko_abstract.pdf?sessionid=F32745D01EE1399993B840CD03B3566D?sequence).
- Li Chen Wu, Hsiu-Wen Hsu, Yun-Chen Chen, Chih-Chung Chiu, Yu-in Lin and Annie Ho. 2005. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Red Pitaya. Department of Applied Chemistry, National Chi-Nan University, Nomor 1 University Road, Puli, Nantou, 545 Taiwan.
- Onweluzo, J.C dan Nwabusgwu, C.C. 2009. Fermentation of miler (*Pennisetum americanum*) and pigen pea (*Cajanus cajan*) seeds for flour production: effects on composition and selected functional properties. *Pakistan Journal of Nutrition* 8:737-744.
- Pomeranz Y. 1991. Functional properties of food components (2nd ed). California. Academic Press, Inc.
- Prior, R.L., Cao, G., Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C., Lishchiner N., Ehlenfeldt M, Kalt W., Krawcer G., Mainland C.M., 1998. Antioxidant Capacity as Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity And Variety of Vaccinium Species. *J. Agric. Food Chem.* 46 (7): 2686-2693.
- Sayuti. 2015. Pengaruh Bahan pembungkus dan Lama Inkubasi Terhadap Kualitas Tempe Kacang Gude Sebagai Sumber Belajar IPA. *Jurnal Bioedukasi* Vol 06 no 02. Universitas Muhammadiyah Metro. Lampung.
- Setyani S, Siti Nurdjanah, dan Eliyana. 2017. Evaluasi Sifat Kimia dan Sensori Tempe Kedelai-Jagung dengan Berbagai Konsentrasi Ragi "RAPRIMA" dan Berbagai Formulasi. *Jurnal Teknologi Industri & Hasil Pertanian* Vol. 22 No.2 Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung.
- Sudarnadji S, Haryono B, Suhardi. 1997. Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada. Liberty. Yogyakarta.
- Verktesh, A. and Prakash, V. 1993. "Functional properties of the total proteins of sunflower (*Helianthus annuus L.*) seed. Effect of physical and chemical treatments". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 41, pp. 18-23.
- Winarti, S., Hamayani, E. And Nurismanto, R. 2011. Karakteristik dan profil inulin beberapa jenis umbi uwi (*Dioscorea spp.*). *AGEITECH*, 31 (4): 378-383.
- Winarti, S., E. Hamayani, Y. Marsono dan Y. Pranoto. 2013. Pengaruh Foaming Pada Pengerinan Inulin Umbi Gembili (*Dioscorea esculenta*) terhadap karakteristik fisis-kimia dan aktivitas prebiotik. *AGRITECH*, Vol.33, No.4: 424-432.



# RESISTEN\_DARI\_TEPUNG\_UMBI\_UWI\_Dioscorea\_alata\_TERM...

## ORIGINALITY REPORT

18%

SIMILARITY INDEX

18%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://www.scilit.net">www.scilit.net</a> Internet Source	3%
2	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Internet Source	2%
3	<a href="http://jurnal.ugm.ac.id">jurnal.ugm.ac.id</a> Internet Source	2%
4	<a href="http://ejournal.upnjatim.ac.id">ejournal.upnjatim.ac.id</a> Internet Source	2%
5	<a href="http://repository.ub.ac.id">repository.ub.ac.id</a> Internet Source	2%
6	Submitted to UPN Veteran Jawa Timur Student Paper	2%
7	<a href="http://academic-accelerator.com">academic-accelerator.com</a> Internet Source	1%
8	<a href="http://eprints.umsida.ac.id">eprints.umsida.ac.id</a> Internet Source	1%
9	Submitted to IAIN Pekalongan Student Paper	1%

10	<a href="http://repository.unej.ac.id">repository.unej.ac.id</a> Internet Source	1 %
11	<a href="http://adoc.pub">adoc.pub</a> Internet Source	1 %
12	<a href="http://publishing-widyagama.ac.id">publishing-widyagama.ac.id</a> Internet Source	1 %
13	<a href="http://pengetahuanpanganpertanian.blogspot.com">pengetahuanpanganpertanian.blogspot.com</a> Internet Source	1 %

Exclude quotes On

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography On