

PENENTUAN LETAK HIDROLISIS PATI HIDROKSIPROPIL DENGAN ANALISIS HPLC

Oleh :

Haryadi*

ABSTRAK

Monosakarida yang didapatkan dari hidrolisis pati hidroksipropil oleh α -amilase maupun glukoamilase ialah glukosa. Hidroksipropil glukosa tidak ditemukan pada hidrolisat. Bagian ujung-ujung pereduksi pada hidrolisat juga tidak ditemukan anhidroglukosa tersubstitusi. Kenyataan-kenyataan ini menunjukkan bahwa ikatan glukosida pada satuan hidroksipropil anhidroglukosa dengan satuan anhidroglukosa pada pati hidroksipropil tidak bisa dipecah oleh kedua enzim tersebut.

I. Pendahuluan

Gugus-gugus hidroksil anhidroglukosa pada pati dapat disubstitusi sehingga diperoleh pati eter maupun pati ester. Pati hidroksipropil dibuat dengan mereaksikan pati dengan propilin oksida dalam keadaan alkalis. Modifikasi kimiawi pati dapat merubah sifat-sifat fungsionalnya walaupun pada tingkat substitusi yang sangat kecil (1).

Penggunaan pati hidroksipropil terus meningkat dalam industri pangan, sebagai bahan pengental, pemantap emulsi, pelapis, pengisi dan lain-lain. Tingkat substitusi molar pati hidroksipropil yang

digunakan dalam industri pangan adalah antara 0,0001 — 0,2 (2).

Penelitian tentang pencernaan pati hidroksipropil sudah banyak dilakukan oleh beberapa ahli yang mengungkap bahwa makin tinggi tingkat substitusi pati hidroksipropil makin tahan terhadap hidrolisis dengan α -amilase (3—5).

Penentuan letak pemecahan ikatan glukosidik dengan alfa-amilase dan dengan glukoamilase pernah dilakukan terhadap pati hidroksietil menggunakan kromatografi gas. Hasilnya menunjukkan bahwa kedua enzim hanya dapat memecah ikatan-ikatan antara satuan anhidroglukosa yang tidak tersubstitusi (6).

Pada makalah ini dikemukakan kajian pencernaan pati hidroksipropil dengan menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

II. Bahan dan Percobaan

Pati hidroksipropil

Pati hidroksipropil dibuat dari pati gandum pre-gel (100 g) dalam 400 ml larutan mengandung 1% NaOH dan 12,5% Na_2SO_4 dengan 20 ml propilin oksida dalam bak air

*Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian UGM.

bergoyang pada suhu 40°C selama 24 jam. Suspensi dinetralkan dengan 1 M H₂SO₄, didialisa dan kemudian dikeringkan dengan freeze dryer. Molar substitusi = 0,28 (7).

Enzim

Porcine pancreatic α -amylase (PPA), 10 mg/ml dengan aktifitas spesifik 1000 I. E. dari Boehringer-Manheim GmbH. Enzim diencerkan dengan buffer fosfat (0.15 M, pH = 6.85) menjadi 10 μ /ml.

Glucoamilase *Aspergillus oryzae* Grade V, 1850 unit/ml dari Sigma.

Hidrolisis dengan PPA

Larutan gel pati (500 mg dalam 90 ml air) diinkubasikan selama 5 menit pada suhu 37°C dengan PPA (10 ml), kemudian diinaktifkan dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 10 menit (5). Hidrolisatnya difraksinasi dengan etanol (8). Fraksi oligosakarida dideionisasi dengan Biorad AG501—X8. Sebagian air diuapkan sampai volumenya tinggal 10 ml.

Hidrolisis dengan glucoamilase

Larutan gel pati hidroksipropil dihidrolisis dengan glucoamilase (9). Hidrolisatnya dideionisasi dengan Biorad AG501—X8, kemudian sebagian airnya diuapkan hingga volumenya tinggal 10 ml.

Hidrolisis dengan asam

Pati hidroksipropil dan hidrolisat enzim tereduksi masing-

masing dihidrolisis dengan asam sulfat 0,75 M selama 4 jam kemudian dinetralkan, disaring dan dipekatkan.

Hidroksipropil-D-glukosa

6-0-, 3-0- dan 2-0-hidroksipropil-D-glukosa masing-masing dibuat dari derivatif glukosa yang diblok seperlunya, yaitu 1,2 : 3,5-di-0-metil-D-glukosa, 1,2:5,6-di-0-isopropilidin-D-glukosa dan metil 4,6-0-benzilidin- α -D-glukosida dengan propilin oksida, kemudian gugus pemblok dihilangkan dengan hidrolisa menggunakan asam encer.

Reduksi hidrolisat

Hidrolisat asam dan hidrolisat enzim direduksi dengan borohidrida (12).

Analisis dengan HPLC

Analisis hidrolisat asam dan pemurnian senyawa model dilakukan dengan HPLC, menggunakan kolom μ Poracil yang sudah diperlakukan dengan SAM I (Waters). Fase bergerak terdiri atas asetonitril/air 80:20 mengandung 0,1% SAM I.

Analisis fraksi oligosakarida dari hidrolisat PPA dilakukan dengan HPLC menggunakan μ Bondapak (Waters). Fase Bergeraknya adalah air.

Detektor yang digunakan ialah yang berdasar indeks bias.

III. Hasil dan Pembahasan

1. Fraksinasi hidrolisat enzim dengan etanol

Pemisahan fraksi oligosakarida dari hasil hidrolisis pati hidroksipropil dengan HPLC menggunakan kolom μ Bondapak C_{18} seperti nampak pada Gambar 1. Jati diri puncak-puncak ditentukan dengan membandingkan sifat kromatografisnya terhadap sifat-sifat glukosa (G_1), maltosa (G_2) dan maltotriosa (G_3), serta dengan acuan hasil penelitian terdahulu (10). Kromatogram tersebut dapat menunjukkan bentuk-bentuk anomer G_4 , G_5 dan G_6 , yang mana anomer β ke luar lebih dahulu. G_8 dan seterusnya tidak nampak dalam kromatogram, kemungkinan tertahan dalam kolom.

Hasil fraksinasi hidrolisat PPA dengan 90% etanol dianalisis dengan HPLC menggunakan kolom μ Poracil, menunjukkan bahwa kandungan monosakaridanya hanya glukosa, dan hidroksipropil glukosa tidak ditemukan. Fraksi monosakarida dari hasil hidrolisis dengan glucoamilase adalah juga hanya glukosa. Kenyataan tersebut menunjukkan bahwa PPA maupun glucoamilase tidak bisa memecah ikatan glukosidik pada atom C nomor 1 (C_1) pada residu anhidroglukosa yang mengikat gugus hidroksipropil.

2. Reduksi hidrolisat dengan borohidrida

Reduksi dengan borohidrida dilakukan terhadap hidrolisat enzim

dan juga terhadap hasil hidrolisis dengan asam sebagai pembanding. Hasil reduksi dihidrolisis dengan asam dan dianalisis dengan HPLC menggunakan kolom μ Poracil menghasilkan kromatogram seperti pada Gambar 2, Gambar 3 dan Gambar 4. Jati diri komponen-komponen ditentukan berdasar pembandingan sifat kromatografisnya terhadap sifat-sifat senyawa model hidroksipropil glukosa, glukositol dan glukosa. Komponen-komponen A, B, C dan D adalah 1,2-0-propilin-D-glukosa, E adalah 2-0-hidroksipropil-D-glukosa, F adalah 6-0-hidroksipropil-D-glukosa. Hasil hidrolisis dengan asam dari hidrolisat PPA tereduksi (Gambar 2) maupun dari hidrolisis dengan glucoamilase tereduksi (Gambar 3) menunjukkan bahwa hanya glusitol, hasil reduksi glukosa, yang dihasilkan, tidak ditemukan hidroksipropil-D-glusitol. Hal ini nampak jelas jika dibandingkan Gambar 2 dan Gambar 3 terhadap Gambar 4. Kenyataan tersebut menunjukkan bahwa hasil hidrolisis dengan enzim menghasilkan fraksi-fraksi yang bagian ujung residu glukosa pereduksi tidak mengikat gugus hidroksipropil. Kenyataan ini memperkuat hasil pada bagian III.1, bahwa PPA maupun glucoamilase hanya dapat memecah ikatan glukosidik pada residu anhidroglukosa yang tidak mengikat gugus hidroksipropil, tidak bisa memecah ikatan glukosidik yang berhubungan dengan atom C_1 pada residu hidroksipropil-D-anhidroglukosa.

Kecepatan ataupun kemudahan hidrolisis oleh enzim terhadap karbohidrat biasanya dianggap sepadan dengan kekuatan mereduksi hidrolisatnya. Kekuatan mereduksi hasil hidrolisis pati hidroksipropil dengan PPA adalah kombinasi kekuatan mereduksi glukosa, maltosa, maltotriosa dan lain-lain fraksi oligosakarida, termasuk oligosakarida hidroksipropil. Hidroksietilasi glukosa, menurut hasil penelitian terdahulu (11), menyebabkan penurunan kekuatan mereduksinya sangat nyata. Hidrosipropilasi sangat mungkin juga berakibat yang sama. Jika ikatan glukosidik pada residu anhidroglukosa tersubstitusi dapat dipecah oleh α -amilase, kekuatan reduksi hidrolisatnya tidak menunjukkan kecepatan ataupun kemudahan hidrolisisnya. Karena terbukti bahwa hasil hidrolisis pati hidroksipropil dengan PPA tidak mengandung gugus hidroksipropil pada ujung pereduksi, maka anggapan bahwa kekuatan mereduksi adalah sepadan dengan kecepatan maupun kemudahan hidrolisis adalah benar.

Data mengenai total karbohidrat dan kekuatan mereduksi dapat digunakan untuk menghitung rata-rata tingkat polimerisasi. Pengukuran kekuatan mereduksi maupun reduksi sakarida dengan borohidrida adalah berdasar reaksi yang menyangkut gugus pereduksi. Total karbohidrat dengan mudah dapat ditentukan dengan analisis hasil hidrolisis dengan asam menggunakan HPLC. Pada Gambar 2,

Gambar 3 dan Gambar 4 nampak jelas bahwa glusitol, hasil reduksi glukosa dengan borohidrida, terpisah dengan baik dari glukosa. Penentuan kuantitatif dengan membandingkan dengan standar yang bersangkutan dapat diharapkan memberikan data tentang jumlah gugus pereduksi dan total karbohidrat. Jadi analisis dengan HPLC terhadap hidrolisat asam dari sample yang lebih dulu direduksi dengan borohidrida dapat diharapkan dapat digunakan sebagai cara alternatif untuk menentukan kecepatan maupun kemudahan pencernaan dengan enzim dan juga menentukan rata-rata tingkat polimerisasi oligosakarida secara serentak.

IV. Kesimpulan

α -amilase maupun glukomilase hanya dapat memecah ikatan glukosidik pada residu anhidroglukosa yang tidak mengikat gugus hidroksipropil, tidak bisa memecah ikatan ikatan glukosidik yang berhubungan dengan atom C1 pada residu hidroksipropil-D-anhidroglukosa.

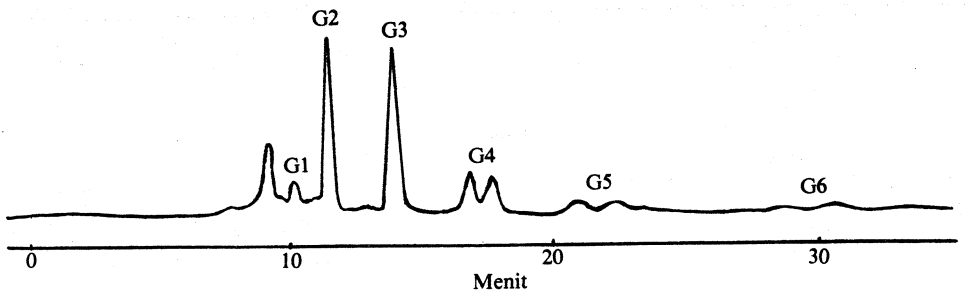
Analisis dengan HPLC terhadap hidrolisat asam dari sample yang lebih dulu direduksi dengan borohidrida dapat diharapkan dapat digunakan sebagai cara alternatif untuk menentukan kecepatan maupun kemudahan pencernaan dengan enzim dan juga menentukan rata-rata tingkat polimerisasi oligosakarida secara serentak.

Ucapan Terima Kasih

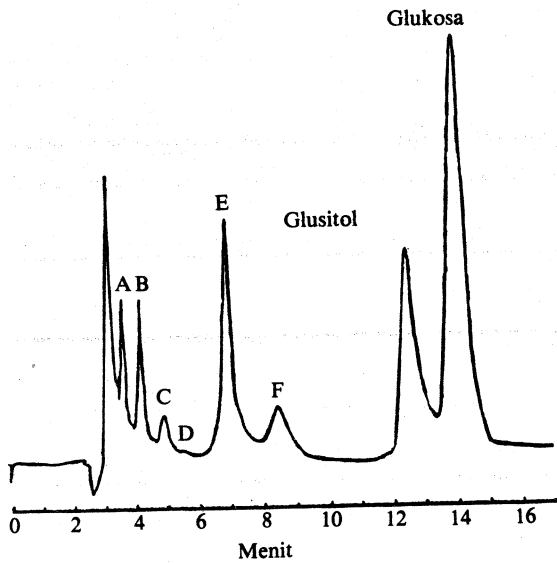
Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. M. Wootton, School of Biological Technology, UNSW; dan Colombo Plan, Australia; yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

V. Daftar Pustaka

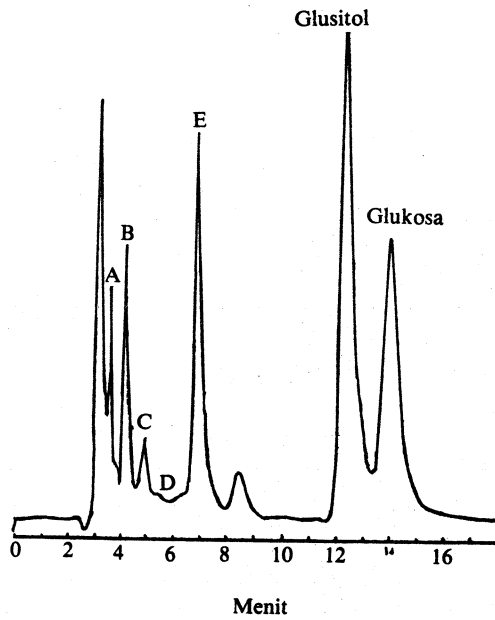
- (1) Hjermstad, E.T., 1967. *Dalam "Starch : Chemistry and Technology"*, ed. R.L. Whistler dan E.F. Paschall, Academic Press, Vol. II, p. 423.
- (2) Wurzburg, O.B. dan C.D. Szymanski, 1970. *J. Agric. Food Chem.* 18, 997.
- (3) Leegwater, D.C., dan J.B. Luten, 1971. *Starke* 23, 430.
- (4) Leegwater, D.C., 1972. *Starke* 24, 11.
- (5) Wootton, M. dan M.A. Chaudhry, 1981. *Starke* 33, 168.
- (6) Chan, Y.C., P.J. Braun, D. French and J.F. Robyt. *Biochem.* 23 (1984), 5795.
- (7) Johnson, D. P. : *Anal. Chem.* 41 (1969), 859.
- (8) Robyt, J.F., and D. French : *Arch. Biochem. Biophys.* 122 (1967), 8.
- (9) Southgate, D.A.T., 1969. *J. Sci. Fd. Agric.* 20, 326.
- (10) Wolfrom, M.L. dan A. Thompson, 1963. *Methods in carbohydrate chemistry.* II, 65.
- (11) Cheetham, N.W.H., P. Sirimane dan W. Roy Day, 1981 *J. Chromatogr.* 207, 439.
- (12) Yoshida, M., and O. Kishikawa : *Starke* 25 (1973), 167.



Gambar 1. Oligosakarida dari hidrolisis pati hidroksipropil dengan PPA, dipisahkan dengan HPLC menggunakan kolom μ Bondapak.



Gambar 2. Hasil hidrolisis asam dari hidrolisat PPA tereduksi dipisahkan dengan kolom μ Poracil.



Gambar 3. Hasil hidrolisis asam dari hidrolisat glucoamilase ter-reduksi dipisahkan dengan kolom μ Porasil.