



hasil penelitian

IDENTIFIKASI HIDROLISAT ASAM DARI PATI HIDROKSIPROPIL DENGAN HPLC

Oleh :

Haryadi *)

Abstrak

Hidrolisat pati hidroksipropil dipisahkan dengan HPLC menggunakan uPoracil menjadi enam komponen, yaitu berturut-turut 1,2-0-propilin-D-glukofuranosa, 1,2-0-(R)-propilin-alpha-D-glukopiranososa, 1,2-0-propilin-D-glukosa, 2-0-hidroksipropil-D-glukosa tercampur sedikit 3-0-hidroksipropil-D-glukosa, dan 6-0-hidroksipropil-D-glukosa.

I. Pendahuluan

Pati hidroksipropil dibuat dari reaksi pati dengan propilin oksida dalam suasana basa. Derifatisasi pati dengan pengikatan gugus hidroksipropil memberi akibat yang nyata terhadap sifat-sifat pasta pati, yaitu kejernihan, kelekatan, kemampuan mengikat air dan pengurangan

kecenderungan memburam setelah pendinginan dan penyimpanan.

Ikatan hidroksipropil adalah stabil. Substituen tetap terikat selama dekrinisasi, hidrolisa dengan asam atau oksidasi derivatif pati. Pati hidroksipropil relatif lebih tahan terhadap hidrolisa oleh amilase dan kerusakan biologis daripada pati alami (natif).

Pati digunakan luas dalam industri pangan, terutama untuk pengendalian tekstur dan reologi beberapa produk. Fungsi terutama untuk pengental, pengisi, pengikat dan stabiliser. Industri makanan makin banyak menggunakan mesin dan keadaan pengolahan seperti produksi kecepatan tinggi, penyimpanan yang lama dan suhu tinggi membatasi penggunaan pati alami. Penyimpanan dengan suhu dingin dan pembekuan mendorong pecahnya sistem yang menggunakan pati alami, khususnya makanan yang berkadar air tinggi. Modifikasi sifat-sifat pati

*) Staf Pengajar FTP UGM.

dengan derifatisasi adalah faktor penting dalam penggunaan pati yang terus meningkat. Penggunaan lainnya dalam industri tekstil, kertas dan lain-lain.

Sifat-sifat fungsional pati hidroksipropil sangat tergantung pada tingkat substitusi. Tingkat substitusi biasanya dinyatakan dengan molar substitusi (MS), yaitu jumlah rata-rata gugus hidroksipropil per unit glukosa. MS umumnya diukur dengan cara spektrophotometris atau dengan cara pengukuran resonansi magnetis inti (NMR). Cara-cara ini tidak menyediakan keterangan tentang pola substitusi yang kemungkinan berpengaruh terhadap sifat-sifat pati. MS yang diijinkan penggunaannya dalam industri pangan ialah antara 0.0001 — 0.2 (1).

HPLC bisa memisahkan komponen-komponen hidrolisat asam dari pati hidroksipropil (2), sehingga kajian strukturnya memungkinkan dilaksanakan. Dibanding terhadap cara-cara lain, HPLC adalah cepat dan tidak membutuhkan derifatisasi.

II. Bahan dan Percobaan

Pati hidroksipropil dibuat dari pati gandum pregel (100 g) dalam 400 mL larutan mengandung 1% NaOH dan 12,5% Na_2SO_4 dengan 20 mL propilin oksida dalam bak air bergoyang pada suhu 40°C selama 24 jam. Suspensi dinetralkan dengan 1 M H_2SO_4 , didialisa dan kemudian dikeringkan dengan freeze dryer (MS = 0.28).

Penentuan berdasar reaktivitas komponen

1. Pengaruh lama hidrolisa

100 mg pati dihidrolisa dengan 100 mL asam sulfat (0.75 M) selama 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 dan 24 jam dalam bak air mendidih. Setelah didinginkan hidrolisat dinetralkan dengan bubuk $\text{Ba}(\text{OH})_2$, disaring, dipekatkan dengan evaporator hampa, disaring dengan membran YM5 dan kemudian dikeringkan dengan freeze drier.

2. Perlakuan dengan asam dalam khloroform (3)

Hidrolisat pati hidroksipropil (kurang lebih 0.8 g) yang telah dihilangkan glukosanya dengan fermentasi menggunakan khamir, disuspensikan ke dalam khloroform (60 mL) mengandung HCl (0.2 mL) dan diaduk dengan pengaduk magnetis selama 24 jam. HCl dipisahkan dengan penambahan bubuk BaCO_3 . Suspensi disaring dan pelarutnya diuapkan.

3. Reduksi dengan borohidrida

Hidrolisat dari pati hidroksipropil direduksi dengan NaBH_4 (4).

4. Pengikatan dengan mesin penukar anion

Hidrolisat dari pati hidroksipropil yang diperoleh dari hidrolisa 0.1 g pati selama 4 jam dilewatkan melalui kolom resin penukar anion SBR (OH^-) berulang-ulang. Hidrolisat tersebut kemudian dikeringkan dengan freeze drier.

5. Pembuatan pati hidroksipropil dengan larutan basa lebih pekat

Pati hidroksipropil dibuat dari reaksi antara pati gandum pregel (100 mg) dalam larutan mengandung NaOH 5% dan 12,5% Na₂SO₄ dengan 20 mL propilin oksida.

Penentuan dengan menggunakan senyawa model

6-0-, 3-0- dan 2-0-hidroksipropil-D-glukosa masing-masing dibuat dari reaksi antara 1,2 : 3,5-di-0-metilin-D-glukosa, 1,2 : 5,6-di-0-isopropilidin-D-glukosa dan metil 4,6-0-benzilidin-alpa-D-glukosida dengan propilin oksida.

Analisa HPLC

Analisa dengan HPLC dilakukan dengan menggunakan kolom uPoracil yang sudah diperlakukan dengan SAM I (Waters). Fase bergerak terdiri atas asetonitril/air 80 : 20 mengandung 0.1% SAM I. Detektor yang digunakan ialah yang berdasar indeks bias.

III. Hasil dan Pembahasan

Penentuan berdasar reaktifitas

1. Pengaruh lama hidrolisa

Kromatogram-kromatogram dari pati hidroksipropil setelah hidrolisa dengan asam selama beberapa waktu adalah mirip secara kualitatif. Kromatogram dari pati setelah 1 jam dan 24 jam adalah seperti pada terlihat pada Gambar 1.

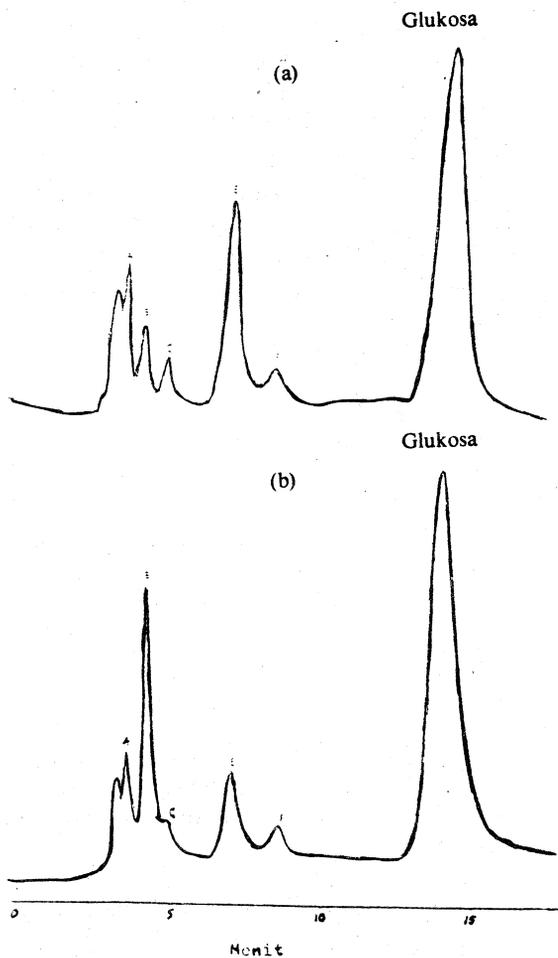
Hidrolisat pati hidroksipropil dipisahkan menjadi glukosa dan 6 komponen non-glukosa (A, B, C, D, E dan F). Rasio luasan dari tiap puncak maupun total puncak non-glukosa terhadap puncak glukosa terlihat pada Tabel 1.

Puncak E adalah terbesar dari hidrolisa selama 1 — 12 jam. Komponen E sangat mungkin adalah 2-0-hidroksipropil-D-glukosa, karena sekelompok peneliti sebelumnya (5) melaporkan bahwa komponen non-glukosa terbanyak ialah 2-0-hidroksipropil-D-glukosa berdasar analisa menggunakan GLC. Seterusnya dilaporkan bahwa selama hidrolisa pati hidroksipropil terjadi bisiklisasi 2-0-hidroksipropil-D-glukosa secara intermolekuler menghasilkan 1,2-0-propilin-D-glukosa. Waktu hidrolisa yang pendek menghasilkan lebih banyak bisiklis furanosa, makin lama hidrolisa makin banyak bisiklis piranosa terbentuk khususnya 1,2-0-(R)-propilin-alpa-D-glukopiranosa.

Tabel 1. Rasio luasan puncak-puncak non-glucosa terhadap luasan puncak glucose dari kromatogram-kromatogram pati hidroksi (M.S. 0.28) setelah beberapa waktu lama hidrolisa

Lama Hidrolisa	Rasio luasan puncak					TNG/G ^a
	A/G	B/G	C/G	E/G	F/G	
1	0.129	0.036	0.059	0.398	0.067	0.689
2	0.076	0.065	0.065	0.348	0.073	0.627
3	0.070	0.093	0.056	0.322	0.066	0.607
4	0.067	0.101	0.052	0.296	0.067	0.583
6	0.069	0.151	0.047	0.252	0.067	0.586
8	0.067	0.170	0.040	0.232	0.072	0.581
12	0.072	0.187	0.039	0.200	0.069	0.567
18	0.060	0.207	0.038	0.164	0.069	0.538
24	0.062	0.219	0.039	0.140	0.070	0.530

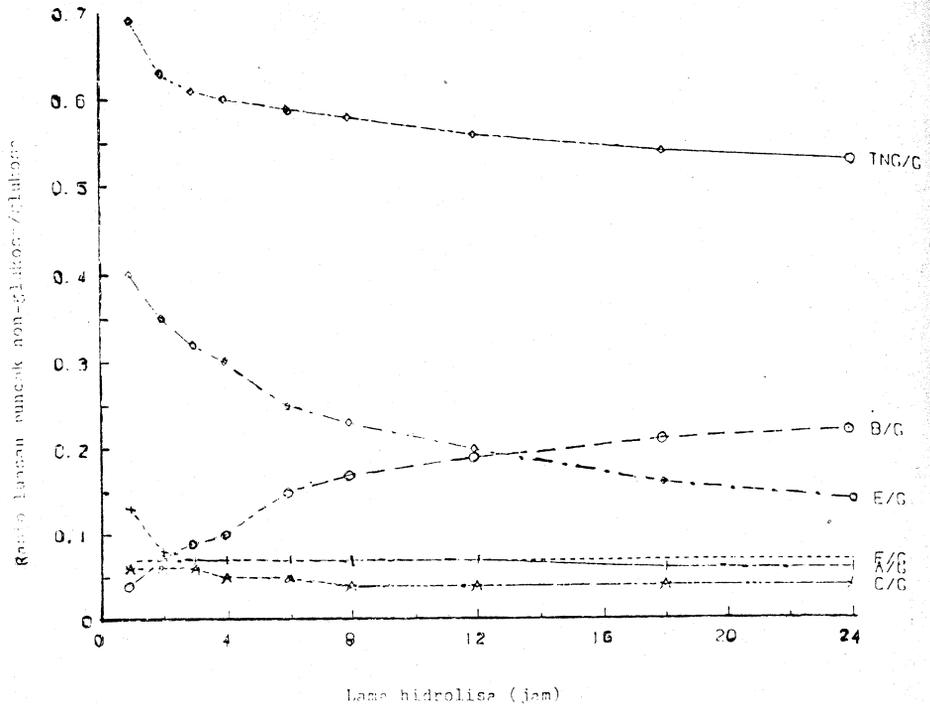
^aTNG : Luasan puncak total non-glucose.



Gambar 1. Pemisahan HPLC dari pati hidroksipropil (MS 0.28), (a) setelah 1 jam dan (b) setelah 24 jam hidrolisa dengan asam

Penelitian tentang sifat-sifat 2-0-hidroksipropil-D-glukosa dan derivatifnya dalam larutan asam dan telah mengungkap bahwa bisiklis piranose adalah bentuk senyawa bisiklis yang paling stabil (6). Dari Gambar 1 jelaslah bahwa jumlah komponen B makin besar dengan waktu hidrolisa yang lebih lama, dengan akibat pengurangan jumlah

komponen A, C dan E. Jadi berdasar perubahan jumlah masing-masing komponen A, B, C dan E dalam larutan asam encer (Gambar 2), sangat mungkin komponen B ialah 1,2-0-(R)-propilin- α -D-glukopiranos, A dan C ialah 1,2-0-propilin-D-glukofuranosa dan E adalah 2-0-hidroksipropilin-D-glukosa.

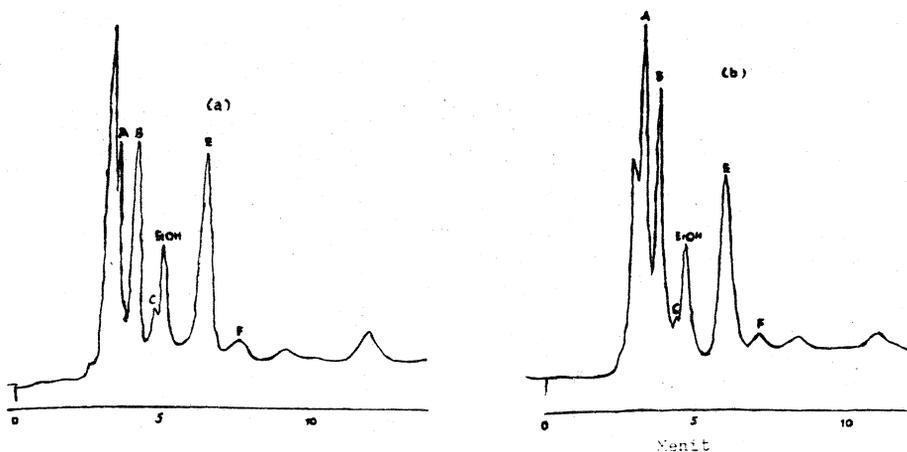


Gambar 2. Pengaruh lama hidrolisa terhadap rasio luasan puncak-puncak non-glukosa terhadap dan puncak glukosa dari kromatogram-kromatogram hidrolisat pati hidroksipropil

Komponen F nampaknya tahan terhadap perlakuan asam encer. Total rasio luasan puncak non-glukosa terhadap glukosa nampak menurun dengan makin lama hidrolisa. Propilin glikol, yang merupakan hasil hidrolisa gugus hidroksipropil, tidak kelihatan pada semua kromatogram yang bersangkutan. Juga kenyataan bahwa harga $TNG/(TNG + G)$ yaitu antara 0.35 — 0.41, adalah jauh lebih besar daripada harga MS (0.28). Hal-hal tersebut menunjukkan bahwa indeks bias masing-masing komponen tidak sama.

2. Perlakuan dengan asam dalam khloroform

Bisiklisasi 2-0-hidroksipropil-D-glukosa adalah reaksi dehidrasi. Perlakuan dengan asam dalam larutan yang mengandung sedikit air terhadap hidrolisat diharapkan mendorong bisiklisasi. Glukosa lebih dulu dihilangkan dari hidrolisat dengan fermentasi, untuk menghindari pengendapan gula. Kromatogram hidrolisat sebelum dan sesudah perlakuan dengan 1% HCl dalam khloroform selama 24 jam seperti yang terlihat pada Gambar 3. Etanol yang dihasilkan dari fermentasi gula



Gambar 3. Pemisahan HPLC dari hidrolisat pati hidroksipropil terfermentasi, (a) sebelum dan (b) sesudah perlakuan dengan HCl dalam kloroform

nampak sebagai puncak kecil. Persentasi komponen non-glukosa dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentasi komponen hidrolisat dari pati hidroksipropil sebelum dan sesudah perlakuan dengan 1% HCl dalam kloroform

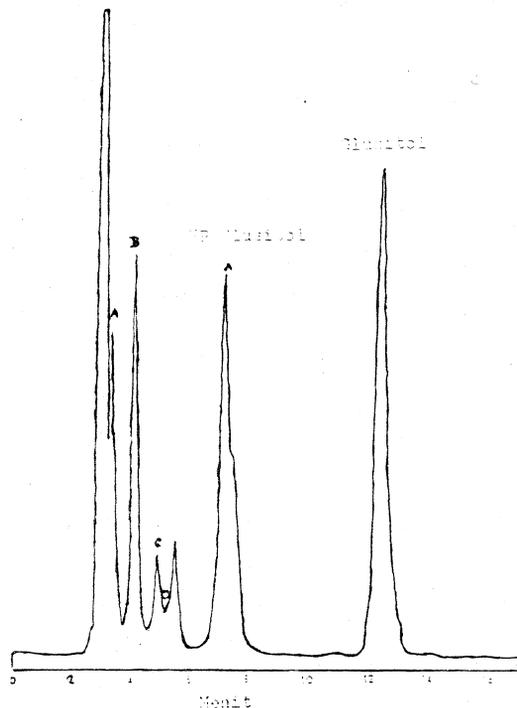
	Persentasi komponen-komponen hidrolisat pati hidroksipropil				
	A	B	C	E	F
Sebelum perlakuan	27.3	23.1	8.7	34.9	8.0
Sesudah perlakuan	37.2	25.2	5.4	26.8	8.9

Perlakuan tersebut di atas menyebabkan pengurangan luasan puncak E, dengan akibat kenaikan komponen A dan B dengan A sebagai bagian yang terbesar. Hasil penelitian sebelumnya (7) dengan 2-O-hidroksietil-D-glukosa dalam campuran HCl dan dimetilformamida maupun dalam metanol menunjukkan bahwa bisiklis furanosa merupakan bagian

yang terbanyak. Berdasar kenyataan di atas komponen A adalah 1,2-O-propilin-D-glukofuranosa, B adalah 1,2-O-propilin-D-glukopiranosida dan E adalah 2-O-hidroksipropil-D-glukosa.

3. Reduksi dengan borohidrida

Hidrolisat pati hidroksipropil direduksi dengan NaBH_4 . Glusitol, hasil reduksi glukosa, terpisah dengan baik dari komponen-komponen lainnya (Gambar 4). Komponen A, B, C dan D tidak berubah, menunjukkan bahwa komponen-komponen ini tidak mempunyai gugus reduksi, menunjukkan bahwa A, B, C dan D adalah 1,2-O-propilin-D-glukosa, yang mana gugus reduksi telah tertutup karena peristiwa intermolekuler glukosidasi. Puncak E dan F tidak nampak dalam kromatogram karena telah direduksi menjadi hidroksipropil-D-glusitol. Sisa metanol yang digunakan untuk menghilangkan ion



Gambar 4. Pemisahan HPLC dari hidrolisat pati hidroksipropil setelah tereduksi

borat nampak sebagai puncak kecil dalam kromatogram.

4. Pengikatan dengan mesin penukar anion

Telah dilaporkan sebelumnya (8) bahwa resin penukar anion Dowex AG1-X8 dalam bentuk hidroksil dan mixed bed Dowex 501-X8 dapat mengikat sampai 100% monosakarida dalam larutan contoh. Dalam penelitian ini perlakuan hidrolisat dengan resin penukar anion Sigma SBR (OH^-) menyebabkan penghilangan beberapa komponen seperti nampak pada Gambar 5. Komponen A dan B tidak atau kurang bisa diikat oleh resin tersebut, menunjukkan bahwa A dan B bukan gula reduksi,

mendukung hasil percobaan dengan perlakuan NaBH_4 . Puncak C dan D telah diketahui dari percobaan sebelumnya sebagai bisiklis, mungkin karena bentuknya yang kurang stabil, C dan D terhidrolisa, berubah bentuknya menjadi gula reduksi pada perlakuan dengan resin tersebut dan kemudian terikat oleh resin. Rasio luasan puncak A/B sebelum perlakuan dengan resin ialah 0.70. Setelah perlakuan A/B menjadi 0.37. Hal ini menunjukkan bahwa komponen B lebih stabil daripada komponen A. Kenyataan ini menguatkan hasil percobaan sebelumnya bahwa B adalah 1,2-0-propilin-D-glukopiranosida dan A adalah 1,2-0-propilin-D-glukofuranosa.



Gambar 5. Pemisahan HPLC dari hidrolisat pati hidroksipropil (a) sebelum dan (b) sesudah melewati kolom Dowex SBR (OH^-)

Perlakuan dengan resin penukar anion tersebut mungkin dapat digunakan untuk menyediakan 1,2-0-propilin-D-glukosa sebagai standar untuk penentuan jumlah gugus hidroksipropil pada polisakarida yang bersangkutan (10).

5. Pembuatan pati hidroksipropil dengan larutan basa lebih pekat

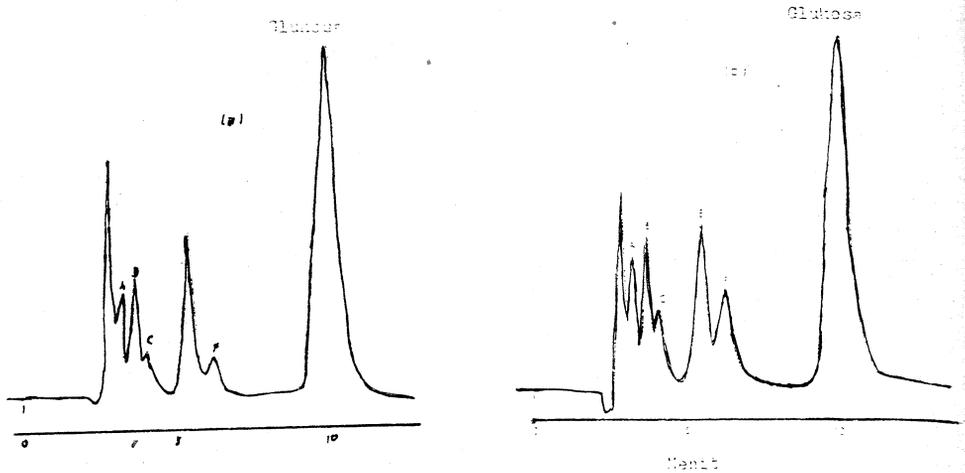
Kromatogram hidrolisat dari pati hidroksipropil yang dibuat dengan 1% NaOH dan 5% NaOH seperti terlihat pada Gambar 6. Puncak F jauh lebih luas pada hidrolisat derivatif pati yang dibuat dengan 5% NaOH (Rasio luasan F/E = 0.76) daripada pati yang dibuat dengan 1% NaOH (rasio luasan F/E = 0.23). Sehubungan dengan ini (10) telah dilaporkan sebelumnya bahwa

reaktifitas gugus hidroksil C6 pada unit glukosa pada pati lebih tergantung pada konsentrasi basa daripada gugus hidroksil sekunder. Maka komponen F adalah 6-0-hidroksipropil-D-glukosa.

Penentuan dengan menggunakan senyawa model

Masing-masing hidroksipropil-D-glukosa dalam percobaan ini dibuat dari derivatif glukosa yang diblok seperlunya, direaksikan dengan propilin oksida, kemudian gugus pemblok dihilangkan dengan hidrolisa dengan asam encer.

6-0-hidroksipropil-D-glukosa yang dibuat, secara kromatografis tidak berbeda terhadap komponen F, sehingga dapat diterangkan bahwa



Gambar 6. Pemisahan HPLC dari hidrolisat pati hidroksi-propil, (a) pati dibuat dengan 1% NaOH dan (b) dengan 5% NaOH

komponen F adalah 6-0 hidroksi-propil-D-glukosa.

Dengan membandingkan sifat kromatografis 3-0-hidroksi-propil-D-glukosa dan hidrolisat derivatif pati, ternyata letak puncak 3-0-hidroksi-propil-D-glukosa sangat dekat di muka letak komponen E. Dapat dilihat dari Gambar 7, bahwa komponen E yang diperoleh dari fraksinasi hidrolisat pati hidroksi-propil mengandung sedikit 3-0-hidroksi-propil-D-glukosa. Hasil ini cocok dengan penemuan sebelumnya bahwa gugus hidroksil C3 pada unit glukosa dalam pati relatif kurang reaktif, mungkin karena letaknya yang tersembunyi (9).

Derivatif glukosa yang dibuat dari metil 4,6-0-benzilidin-D-glukosa seperti nampak pada Gambar 8, jelas bahwa mengandung komponen-komponen yang secara kromatografis tidak bisa dibedakan dengan kompo-

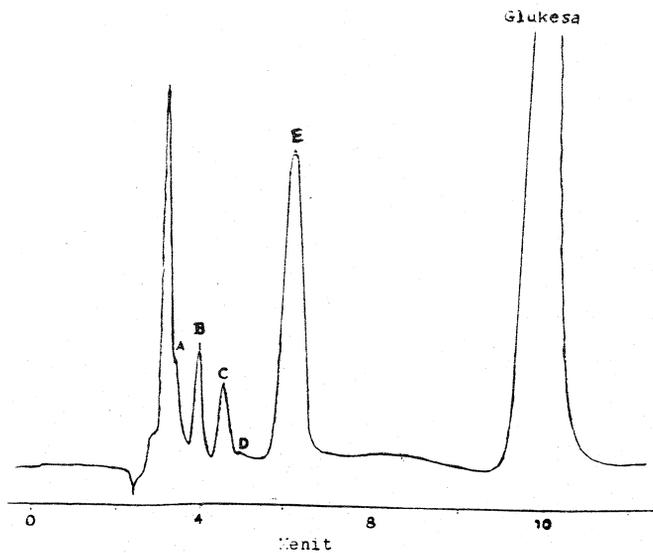
nen A, B, C, D dan E. Jadi hal ini mempertegas hasil percobaan tersebut di muka bahwa A, B, C dan D adalah derivatif dari 2-0-hidroksi-propil-D-glukosa, dan E adalah 2-0-hidroksi-propil-D-glukosa.

IV. Kesimpulan

Hidrolisat pati hidroksi-propil dipisahkan dengan HPLC menggunakan uPorasil menjadi enam komponen, diberi tanda A, B, C, D, E dan F. Berdasar penentuan secara kimia-wi dan dengan perbandingan dengan senyawa model, A adalah 1,2-0-propilin-D-glukofuranosa, B adalah 1,2-0(R)-propilin- α -D-glukopiranososa, C dan D adalah 1,2-0-propilin-D-glukosa, E adalah 2-0-hidroksi-propilin-D-glukosa tercampur dengan sedikit 3-0-hidroksi-propil-D-glukosa, dan F adalah 6-0-hidroksi-propil-D-glukosa. Perlakuan hidrolisat pati



Gambar 7. Pemisahan HPLC dari komponen E dari hidrolisat pati hidroksipropil; 3-O-S : substitusi pada C-3 dari glukosa



Gambar 8. Pemisahan HPLC dari hidroksipropil glukosa, dibuat dari metil 4,6-O-benzilidin-D-glukosa

hidroksipropil dengan resin penukar anion memungkinkan penyediaan 1,2-0-propilin-D-glukosa untuk standar dalam penentuan jumlah gugus hidroksipropil dalam polisakarida yang bersangkutan (10).

V. Daftar Pustaka

1. Wurzburg, O.B. & Szymanski, C.D. *J. Agr. Food Chem.* 18 (7) : 997; 1970.
2. Wootton, M., Kesavamoorthy, S. & Azemi, B.M.N.M. *Starch* 37 (10) : 276; 1985.
3. Lee, D.S. & Pelrin, A.S. *Carbohydr. Res.* 106 : 1; 1982.
4. Wolform, M.L. & Thompson, A. *Methods in carbohydrate chemistry. II*, 1963 : 65.
5. Leegwater, D.C., Marsman, J.W. & Mackor, A. *Starch* 25 (5) : 142; 1973.
6. Lee, D.S. & Perlin, A.S. *Carbohydr. Res.* 126 : 101; 1984.
7. Hook, J.E. dan Linberg, B. *Acta. Chem. Scand.* 22 : 921; 1968. Srivastava, H.C. & Ramalingam, K.V. *Starch* 19 (10): 295; 1967.
8. Baust, J.G., Lee, Jr, R.E. & James, H. J. *Liq. Chromatogr.* 5 (5) : 767; 1982.
9. Srivastava, H.C. *Modification of cellulose and other polysaccharides.* Ahmedabad : ATIRA; 1974 : 261.
10. de Belder, A.N., Persson, A. & Markstrom, S. *Starch* 24 (11) : 361; 1972.