

## PENGARUH PERBEDAAN EKSTRAKSI LIPID TERHADAP GELATINISASI DAN RETROGRADASI TEPUNG MLINJO (*Gnetum gnemon*)

[Effects of Different Lipid Extractions on Gelatinization and Retrogradation of Bitter Nuts (*Gnetum gnemon*) Starch]

Tri Agus Siswoyo

Pusat Penelitian Biologi Molekul dan Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember  
Jln. Kalimantan III/23, Jember 68121

Diterima 4 Juni 2004 / Disetujui 11 Agustus 2004

### ABSTRACT

The effect of different lipid extraction on gelatinization and retrogradation of bitter nuts (*Gnetum gnemon*) starch was studied by the measurement of starch-lipids complex formation using differential scanning calorimetry. The bitter nuts samples were extracted sequentially with hexane for surface lipid starch (SL) and hot water-saturated butanol for internal lipid starch (IL). The gelatinization enthalpies of starch increased significantly with extracting step, but the starch-lipid complex enthalpies of SL and IL were statistically lower, when compared with the native starch. According to the Avrami equation, the retrogradation rate of native bitter nuts starch was slower than that of the SL or IL, whereas the retrogradation rate of IL was slower than SL. High number of starch-lipids complex could retard the retrogradation of bitter nuts starch during storage.

**Key words :** *Gnetum gnemon*, bitter nuts, gelatinization, retrogradation, Avrami equation, starch-lipid complex

### PENDAHULUAN

Proses gelatinisasi dan retrogradation tepung merupakan bagian terpenting yang dapat mempengaruhi terjadinya perubahan pada beberapa sifat dari sebuah produk pangan yang berbasis pati (Feam dan Russel, 1982). Tingkat gelatinisasi dan laju retrogradasi secara signifikan berpengaruh pada tekstur dan umur simpan tepung (Feam dan Russel, 1982). Retrogradasi adalah suatu proses penggabungan kembali komponen pati untuk membentuk suatu kristal. Ada dua proses yang terjadi, pertama adalah *rigidity* dan *crystallinity* gel yang berkembang secara cepat untuk membentuk kristal kembali, hal ini terjadi pada amilosa. Kedua, gel yang berkembang secara perlahan terjadi pada amilopektin (Biliaderis, 1991). Retrogradasi pati secara alami terbentuk tergantung pada asal pati, jumlah amilosa, suhu penyimpanan dan bahan additif (Orford et al., 1987; Zeleznak dan Hosenev, 1987; Chang dan Liu, 1991; Ward et al., 1994). Selain itu kristalisasi pati juga tergantung dengan jumlah kompleks amilosa-lipid yang terbentuk. Komplek amilosa-lipid merupakan salah satu bentuk interaksi antara lipid dengan pati. Amilosa dengan struktur helik tunggal dengan tujuh glukosil untuk tiap putarannya memungkinkan interaksi itu dapat terjadi (Zobel, 1988). Komplek formasi ini dapat dipelajari dengan menggunakan defraksi sinar-X, model molekuler dan *differential scanning calorimetry* (DSC) (Biliaderis dan Seneviratne, 1990; Godet et al., 1993; Karkalas et al., 1995). Pada thermograph DSC, formasi amilosa-lipid

dapat dideteksi pada kisaran suhu antara 100-125°C (Jovanovich dan Anon, 1999).

Kemampuan amilosa dan lipid untuk melakukan ikatan kompleks tergantung pada bentuk lipid. Bentuk monoasil mempunyai daya ikatan lebih besar dibandingkan dengan bentuk tri- atau diasil (Siswoyo dan Morita, 2002). Pada sistem pangan, kompleks pati dengan monogliserida, asam lemak bebas, lisofosfolipid dan surfaktan merupakan hal yang menarik karena pengaruhnya terhadap sifat fisik pada produk makanan (Hoover dan Hadziyer, 1981; Karkalas et al., 1995). Eliasson et al., (1988) melaporkan bahwa formasi kompleks pati-lipid dapat menjaga kehilangan amilosa selama proses gelatinisasi, menghambat *swelling* granular pati dan menurunkan *water-binding capacity* pati.

Tanaman mlinjo (*Gnetum gnemon*), banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara asia tenggara lainnya sebagai penghasil tepung dari biji mlinjo. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit dimana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Selain itu biji mlinjo dapat digunakan sebagai pelapis atau campuran dalam pembuatan roti, biskuit atau dibuat kripik 'emping' setelah dikeringkan dibawah sinar matahari dan digoreng sebelum dikonsumsi. Tepung dari biji mlinjo sangat potensial digunakan untuk berbagai tujuan akan tetapi, masalah yang timbul salah satunya adalah tidak adanya informasi yang mendasar tentang kompleks pati-lipid yang dikandungnya terutama yang

berpengaruh pada gelatinisasi dan retrogradasi tepung mlinjo.

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari pengaruh perbedaan ekstraksi lipid pada tepung mlinjo terhadap kandungan kompleks pati-lipid, gelatinisasi dan evaluasi kinetik retrogradasi menggunakan persamaan Avrami sebagai dasar perhitungannya.

## METODOLOGI

### Persiapan sampel

Biji mlinjo dihancurkan dengan menggunakan alat laboratory mill (Ultra-Centrifugal Mill, Type ZM-1, Kurt Retsch GmbH & Co, Haan, Germany) dengan ukuran partikel <150 mesh. Tepung yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C sampai pada saat analisa.

### Ekstraksi dan pemisahan lipid.

Tepung yang telah diperoleh sebanyak 15 g diekstrak didalam soxhlet dengan menggunakan larutan n-hexane selama 18 jam. Tepung lumpur yang diperoleh disebut *surface* lipid pati (SL). Selanjutnya sebagian tepung lumpur SL diekstrak lagi dengan menggunakan water-saturated butanol panas (1:3, v/v) selama 3 jam dan diulang sebanyak tiga kali, tepung lumpur yang diperoleh disebut dengan *internal* lipid pati (IL). Setelah diekstraksi, tepung lumpur SL dan IL dicuci sebanyak tiga kali dengan aquades dan dikeringkan pada suhu ruangan selanjutnya dihancurkan kembali dengan menggunakan alat laboratory mill (Ultra-Centrifugal Mill, Type ZM-1, Kurt Retsch GmbH & Co, Haan, Germany) dengan ukuran partikel <150 mesh. Tepung yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C sampai pada saat analisis.

### Differential scanning calorimetry (DSC).

Pengukuran sifat thermal sample dilakukan dengan menggunakan DSC (Model DSC-60, Kyoto, Japan) dengan TA-60 WS software untuk analisis thermalnya. Kalibrasi kalorimeter menggunakan indium (melting point = 156.7°C,  $\Delta H = 27.6$  J/g) dengan parafin cair sebagai referensinya (Zhang et al., 1992; Morita et al., 1996; Siswoyo dan Morita, 2001). Sampel (4-5 mg) di dalam kapsul aluminium DSC ditambah air deionisasi dengan perbandingan 2:1. Setelah ditutup rapat, kapsul dibiarkan selama 1 jam sebelum pemanasan untuk memberikan kesempatan difusi air ke dalam tepung. Selanjutnya, sampel diukur menggunakan DSC dengan suhu awal 30 sampai 120°C dan setelah pengukuran, sampel dalam kapsul disimpan untuk tujuan analisis retrogradasi pada suhu ruangan. Temperatur awal ( $T_0$ ), puncak ( $T_p$ ) dan akhir ( $T_r$ ) dari gelatinisasi pati dan kompleks pati-lipid, serta nilai enthalpi pati ( $\Delta H_g$ ) dan kompleks pati-lipid ( $\Delta H_{s-l}$ ) digunakan untuk karakterisasi sifat thermal sampel. Analisis retrogradasi, pada waktu penyimpanan yang telah ditentukan antara 1 sampai 12

hari sampel diukur kembali menggunakan DSC dengan suhu awal 30 sampai 120°C sebagai suhu akhir.

### Perhitungan kinetik retrogradasi.

Perhitungan kinetik retrogradasi sampel menggunakan persamaan Avrami (McIver et al., 1968) dengan mengkalkulasi data yang diperoleh dari thermograph DSC pada persamaan dibawah ini:

$$\theta = \frac{\Delta H_{\infty} - \Delta H_t}{\Delta H_{\infty} - \Delta H_0} = \exp(-kt^n) \quad (1)$$

Dimana  $\theta$  adalah fraksi pati yang tidak terkristalisasi pada  $t$  min,  $\Delta H_0$  dan  $\Delta H_t$  adalah perubahan enthalpi pada saat 0 min dan  $t$  min,  $\Delta H_{\infty}$  adalah limit perubahan enthalpi,  $k$  adalah laju konstanta, dan  $n$  adalah eksponen avrami.  $\Delta H_{\infty}$  ( $t \rightarrow \infty$ ) dapat ditentukan dengan meregresikan antara  $1/\Delta H_t$  dan  $1/t$  (Mita, 1992).  $k$  dan  $n$  dapat diperoleh dari linier regresi seperti tersebut dibawah ini, dimana;  $\Delta H_0 = 0$ :

$$\log \left\{ -\ln \left( \frac{\Delta H_{\infty} - \Delta H_t}{\Delta H_{\infty}} \right) \right\} = \log k + n \log t \quad (2)$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Sifat thermal

Analisis sifat thermal gelatinisasi pati-lipid granular fraksi pada sampel (native, SL, dan IL) dilakukan dengan menggunakan DSC. Thermograph DSC yang dihasilkan untuk setiap fraksi menunjukkan dua puncak utama, puncak pertama adalah endothermik gelatinisasi dengan kisaran temperatur antara 60-78°C, sedangkan puncak endothermik kedua berkisar antara 95-115°C (Gambar 1). Puncak endothermik kedua merupakan indikasi disintegrasi dari kompleks pati-lipid (Biliaderis, 1991). Puncak endothermik kedua mulai menurun dan sedikit tidak nampak setelah sampel diekstrak secara berturut-turut (hexane dan water-saturated butanol panas) dengan nilai enthalpi ( $\Delta H_{SL}$ ) untuk setiap fraksi mempunyai kecenderungan menurun dari 0.65 J/g (native); 0.52 J/g (SL) dan 0.41 J/g (IL). Hal ini juga dapat berpengaruh terhadap peningkatan nilai enthalpi gelatinisasi ( $\Delta H_g$ ) dari 7.1 J/g (native); 7.5 J/g (SL) dan 8.1 J/g (IL) (Tabel 1).

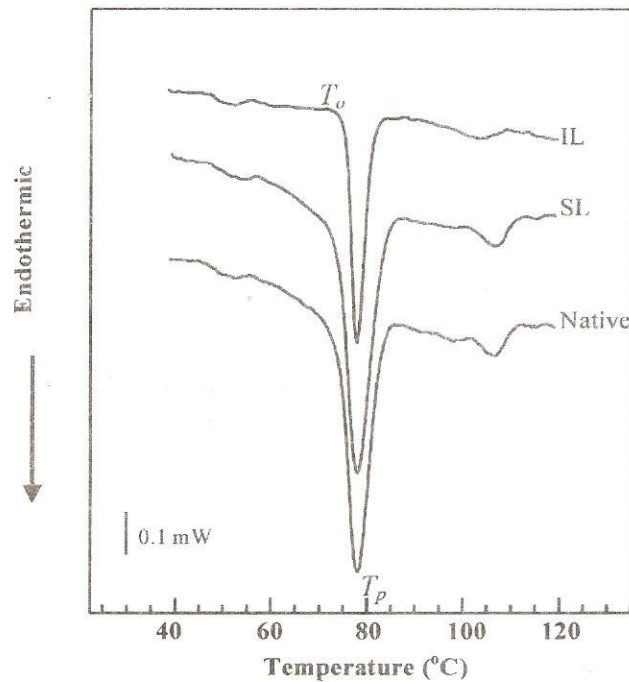
Pada tepung mlinjo (native) terlihat kompleks pati-lipid (puncak kedua) menunjukkan nilai endothermik tertinggi dibandingkan dengan fraksi yang lain. Hal ini dapat dinyatakan bahwa pada native, kandungan lipid sangat tinggi dan memungkinkan untuk terjadi interaksi dengan amilosa helik. Seperti yang pernah dilaporkan oleh Huang dan White (1993) dan Morrison et al., (1994) lipid sangat mudah untuk melakukan komplikasi dengan amilosa helik yang berada pada tepung dengan

kemampuannya sekitar enam anhidro-glukose unit untuk setiap putaran.

**Retrogradasi kompleks pati-lipid.**

Nilai enthalpi dari re-gelatinisasi sampel yang disimpan pada suhu ruangan selama 0 sampai 12 hari diamati dengan menggunakan DSC pada kisaran *melting* antara 50 sampai 75°C. Pada kisaran temperatur tersebut merupakan indikasi puncak *melting* dari

kristalisasi amilopektin (Zhang dan Jackson, 1992; Lai et al., 2000). Setelah pemanasan, nilai enthalpi ( $\Delta H$ ) pada hari ke 0 untuk sampel yang diuji menunjukkan nilai endothermik yang sulit untuk dideteksi (undetectable) atau sama dengan nol. Hal ini dikarenakan sampel mengalami gelatinisasi yang sempurna selama proses pemanasan. Nilai enthalphi pati sampel mengalami peningkatan secara logaritmik selama masa penyimpanan (Gambar 2).

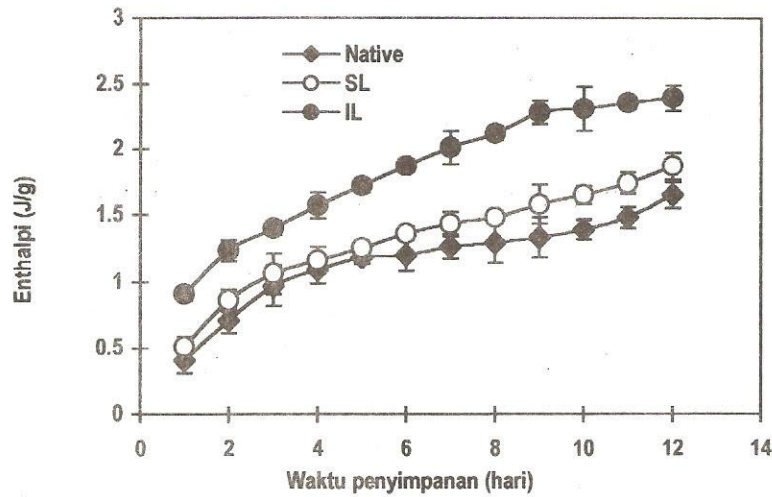


Gambar 1. Thermograph DSC untuk gelatinisasi dan kompleks pati-lipid akibat pengaruh perbedaan ekstraksi lipid pada tepung mlinjo.  $T_0$ , Temperatur awal;  $T_p$ , Temperatur puncak; SL, Surface lipid pati ; IL, Internal lipid pati.

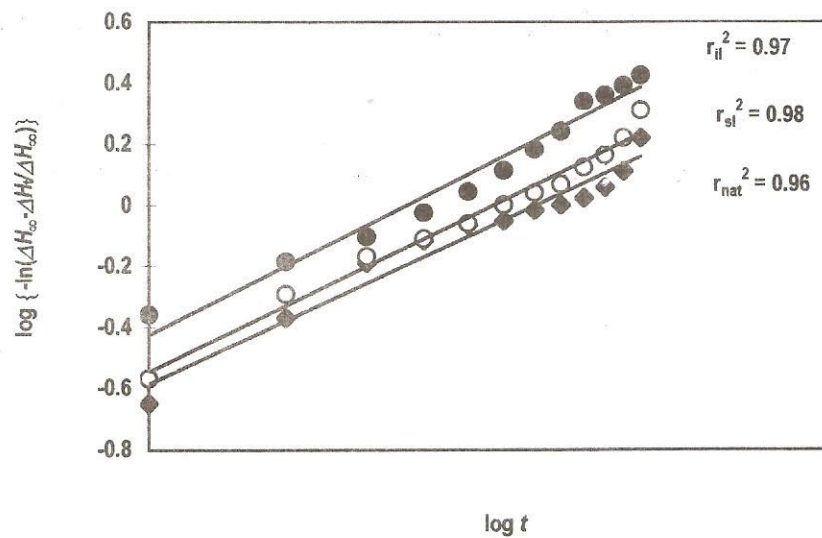
Tabel 1. Sifat thermal gelatinisasi dan kompleks pati-lipid pada tepung mlinjo

	Gelatinisasi			
	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_r$ (°C)	$\Delta H_g$ (J/g)
Native	74.4±0.1	78.1±0.1	83.0±0.4	7.1±0.1
Surface (SL)	74.4±0.7	78.2±1.0	84.1±0.3	7.5±0.6
Internal (IL)	75.7±0.2	77.9±0.2	80.5±0.4	8.1±0.2
	Pati-lipid			
	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_r$ (°C)	$\Delta H_{su}$ (J/g)
Native	103.0±0.4	106.7±0.1	110.3±0.4	0.65±0.1
Surface (SL)	103.3±0.9	106.7±1.0	110.9±1.0	0.52±0.1
Internal (IL)	97.7±1.3	104.9±0.7	108.1±1.0	0.41±0.1

<sup>a</sup> Rata-rata±SD (n=3).  $T_0$ , temperatur awal;  $T_p$ , temperatur puncak;  $T_r$ , temperatur akhir;  $\Delta H_g$ , nilai enthalpi gelatinisasi;  $\Delta H_{su}$ , nilai enthalpi kompleks pati-lipid.



Gambar 2. Fungsi antara nilai enthalpi gelatinisasi dengan lama penyimpanan pada suhu ruangan. —●—, Internal lipid pati; —○—, Surface lipid pati; —◆—, Native.



Gambar 3. Hasil plot antara fraksi kristalisasi logaritmik [ $\log \{-\ln(\Delta H_{\infty}-\Delta H_t/\Delta H_{\infty})\}$ ] dengan waktu logaritmik ( $\log t$ ) selama retrogradasi. —●—, Internal lipid pati; —○—, Surface lipid pati; —◆—, Native.

Dari gambar tersebut dapat dikatakan bahwa peningkatan nilai  $\Delta H$  sampel mengalami dua bentuk grafik berdasarkan jenis sifat kinetik retrogradasi. Sifat retrogradasi yang relatif cepat dapat dilihat pada IL (fraksi water:butanol) sedangkan native dan SL (fraksi hexane) menunjukkan kecepatan retrogradasi yang meningkat hanya pada awal penyimpanan tapi untuk selanjutnya mengalami peningkatan yang relatif lambat yang sampai pada nilai maksimal  $\Delta H$  pada hari ke 12. Pada hari ke 12 diantara fraksi sampel yang diuji menunjukkan bahwa IL mempunyai nilai  $\Delta H$  tertinggi sekitar 2.39 J/g setelah itu berturut-turut 1.87 J/g (SL) dan 1.65 J/g (native). Dari hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa native dengan jumlah kompleks pati-

lipid paling tinggi dapat menghambat retrogradasi tepung mlinjo.

Analisis kinetik dengan menggunakan persamaan Avrami dapat digunakan untuk mendikripsikan retrogradasi tepung mlinjo selama masa penyimpanan. Dari hasil plotting, diperoleh nilai koefisien regresi sekitar 0.96–0.98 dengan nilai  $\Delta H_{\infty}$  antara 2.04–2.57 (Gambar 3). Tabel 2 menunjukkan sifat thermal gelatinisasi sampel pada saat retrogradasi dan ringkasan hasil perhitungan kinetik retrogradasi saat penyimpanan sampai 12 hari pada suhu ruangan. Nilai eksponen avrami (n) untuk kinetik retrogradasi pada kisaran antara 0.69–0.75.

Tabel 2. Temperatur, nilai enthalpi retrogradasi dan nilai avrami parameter pada fraksi pati-lipid dari tepung mlinjo

	Retrogradasi (suhu ruangan, 12 hari)			Avrami parameter <sup>a</sup>			
	T <sub>0</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	ΔH <sub>t</sub> (J/g)	ΔH <sub>∞</sub> (J/g)	n	k (day <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
Native	46.90	60.14	1.65	2.04	0.69	0.26	0.96
Surface	46.92	60.53	1.87	2.15	0.73	0.28	0.98
Internal	46.30	59.41	2.39	2.57	0.75	0.37	0.97

<sup>a</sup> eksponen avrami (n); laju konstanta (k); and koefisien regresi (r<sup>2</sup>)

Kisaran perbedaan nilai n ini dapat menunjukkan adanya variasi rekristalisasi pati yang berbeda akibat dari perbedaan ekstraksi lipid (McIver et al., 1968). Untuk laju retrogradasi ( $k, day^{-1}$ ), perbedaan ekstraksi lipid menunjukkan laju retrogradasi yang meningkat, dengan faktor peningkatan sekitar 1.42 ( $k_{IL}/k_{Nat.}$ ) dan 1.08 ( $k_{SL}/k_{Nat.}$ ) jika dibandingkan dengan k pada native. Sedangkan laju retrogradasi antara SL dan IL mempunyai faktor peningkatan sebesar 1.32 ( $k_{IL}/k_{SL}$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa pengaruh ekstraksi lipid mengakibatkan peningkatan laju retrogradasi tepung mlinjo. Interaksi kompleks amilosa-lipid ataupun amilopektin-lipid dapat mencegah terjadinya reorganisasi molekul amilopektin pada pati selama masa penyimpanan tepung mlinjo.

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian diindikasikan bahwa perbedaan tahapan ekstraksi lipid pada tepung mlinjo menyebabkan penurunan jumlah kompleks pati-lipid ditandai dengan terjadinya penurunan nilai enthalpi pada kompleks pati-lipid ( $\Delta H_{SL}$ ). Akan tetapi perbedaan ekstraksi tersebut, dapat mengakibatkan peningkatan nilai enthalpi gelatinisasi ( $\Delta H_g$ ). Menurut persamaan Avrami, native mempunyai laju retrogradasi lebih lambat dibandingkan dengan SL atau IL, sedangkan laju retrogradasi IL lebih lambat dibandingkan SL. Tingginya jumlah kompleks pati-lipid kemungkinan menyebabkan terhambatnya laju retrogradasi pati selama masa penyimpanan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Naofumi Morita (Osaka Prefecture University, Japan) dalam penyempurnaan naskah dan fasilitas yang diberikan selama penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

Biliaderis, C.G. and Seneviratne, H.D. 1990. On the supermolecular and metastability of glycerol monostearate-amylose complex. Carbohydrate Polymer, 13, 185-206.

Biliaderis, C.G. 1991. Non-equilibrium phase transition of aqueous starch systems. Dalam Levine, H. and Slade, L., (Eds). Water Relationships in Food. P. 251-273. Plenum Press, New York.

Chang, S. and Liu, L. 1991. Retrogradation of rice starches studied by differential scanning calorimetry and influence of sugars, NaCl and lipids. J. Food Sci., 56, 564-570.

Eliasson, A.C., Pinstad, H. and Ljunger, G. 1988. Study of starch-lipid interaction for some native and modified maize starches. Starch/Stärke, 40, 95-100.

Fearn, T. and Russel, P.L. 1982. A kinetic study of staling by differential scanning calorimetry. The effect of loaf specific volume. J. Sci. Food Agric., 33, 537-548.

Godet, M. C., Tran, V. and Delage, M. M. 1993. Molecular modeling of the specific interactions in amylose complexation by fatty acids. International Journal of Biological Macromolecules, 15, 11-16.

Huang, J.J. and White, P.J. 1993. Waxy corn starch: monoglyceride interaction in a model system. Cereal Chem., 70, 42-47.

Hoover, R. and Hadziyev, D. 1981. Characterization of potato starch and its monoglyceride complexes. Starch/Stärke, 33, 290-300.

Jovanovich, G. and Anon, M. C. 1999. Amylose-lipid complex dissociation. A study of kinetic parameters. Biopolymer, 49, 81-89.

Karkalas, J., Ma, S. and Morrison, W. R. 1995. Some factors determining the thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids. Carbohydr. Res., 268, 233-247.

Lai, V.M.F., Lu, S. and Lii, C. 2000. Molecular characteristic influencing retrogradation kinetics of rice amylopectins. Cereal Chem., 77, 272-278.

McIver, R. G., Axford, D. W. E., Colwell, K. H. and Elton, G. A. H. 1968. Kinetic study of the retrogradation of gelatinized starch. J. Sci. Food Agric., 19, 560-563.

- Morrison, W.R., Tester, R.F. and Gidley, N.J. 1994.** Properties of damaged starch granules. II. Crystallinity, molecular order and gelatinisation of ball-milled starches. *J. Cereal Sci.*, 19, 209-217.
- Morita N., Nakata, K., Hamauzu, Z. and Toyosawa, I. 1996.** Effect of  $\alpha$ -glucosyl rutin as improvers for wheat dough and breadbaking. *Cereal Chem.*, 73, 99-104.
- Mita, T. 1992.** Structure of potato starch paste in the aging process by the measurement of their dynamic moduli. *Carbohydr. Polym.*, 17, 269-276.
- Orford, P. D., Ring, S. G., Carroll, V., Miles, M. J., and Morris, V. J. 1987.** The effect of concentration and botanical source on the gelation and retrogradation of starch. *J. Sci. Food Agric.*, 39, 169-177.
- Siswoyo, T.A and Morita, N. 2001.** Influence of acyl chain lengths in mono and diacyl-*sn*-glycerophosphatidylcholine on gelatinization and retrogradation of starch. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 49, 4688-4693.
- Siswoyo, T.A and Morita, N. 2002.** Thermal Properties and Kinetic Parameters of Amylose-Glycerophosphatidylcholine Complexes with Various Acyl Chain Lengths. *Food Research International*, 35, 737-744.
- Ward, K. E. J., Hoseney, R. C. and Seib, P. A. 1994.** Retrogradation of amylopectin from maize and wheat starches. *Cereal Chem.*, 71, 150-155.
- Zeleznek, K. J. and Hoseney, R. C. 1987.** Characterization of starch from bread aged at different temperatures. *Starch/Stärke*, 39, 231-233.
- Zhang, W., and Jackson, D.S. 1992.** Retrogradation behavior of wheat starch gels with differing molecular profiles. *J. Food Sci.*, 57, 1429-1432.
- Zobel, H.F. 1988.** Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch/Stärke*, 40, 44-50.