

PERUBAHAN STRUKTUR PATI GARUT (*Maranta arundinaceae*) SEBAGAI AKIBAT MODIFIKASI HIDROLISIS ASAM, PEMOTONGAN TITIK PERCABANGAN DAN SIKLUS PEMANASAN-PENDINGINAN

[Structure Changes of Arrowroot (*Maranta arundinaceae*) Starch as Influenced by Acid Hydrolysis, Debranching and Autoclaving-Cooling Cycle Modifications]

Didah Nur Faridah^{1)*}, Dedi Fardiaz¹⁾, Nuri Andarwulan¹⁾ dan Titi Candra Sunarti²⁾

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

²⁾ Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Diterima 05 Agustus 2010 / Disetujui 20 Desember 2010

ABSTRACT

The effects of lintnerization (2.2 N HCl, 2 hours), debranching with pullulanase (1.3 U/g and 10.4 U/g starch) and/or three-autoclaving-cooling cycles at 121°C for 15 minutes on the changes of arrowroot starch structures were studied. The structural modifications of amylose and amylopectin were measured by Gel Permeation Chromatography (GPC), and the distribution of degree of polymerization (DP) was analyzed by Fluorophore-Assisted Capillary Electrophoresis (FACE). The GPC profile of native starch using Toyopearl HW-65S gel gave mainly two fractions. Fraction I (Fr. I) was a high molecular weight component and Fraction II (Fr. II) was a low molecular weight component. After acid modification, the carbohydrate content of Fr. II increased while that of Fr. I decreased. The amount of DP of 6 to 8 increased in all modified arrowroot starches. The GPC and FACE analyses showed that all starch modification techniques caused the structural changes of amylopectin molecules to form short chain amyloses.

Key words: arrowroot starch, degree of polymerization, FACE (Fluorophore-Assisted Capillary Electrophoresis) and GPC (Gel Permeation Chromatography)

PENDAHULUAN

Granula pati tersusun dari dua jenis pati yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa mempunyai struktur lurus dengan ikatan α -(1,4)-D-glukosa, sedangkan amilopektin mempunyai cabang dengan ikatan α -(1,6)-D-glukosa. Struktur amilopektin membentuk seperti kluster, dimana rantai A terikat pada rantai B dan rantai B terikat dengan rantai B lainnya (B1-B4) tergantung pada panjang rantainya. Sebanyak 80-90% jumlah rantai amilopektin terletak pada kluster sedangkan hanya 10-20% terlibat dalam pembentukan koneksi-inter-kluster.

Amilopektin berantai pendek dapat membentuk *double helix* dan menyusun daerah kristalin dalam granula pati sedangkan titik-titik percabangan amilopektin menyusun daerah amorf. Amilosa berada baik pada daerah kristalin maupun amorf, tetapi sebagian besar berada di daerah amorf (Tester *et al.*, 2004).

Pati dapat dihidrolisis dengan asam klorida (hidrolisis asam). Asam kuat akan menghidrolisis ikatan glikosida pada pati sehingga panjang rantai menjadi lebih pendek dan berat molekul pati menjadi lebih rendah (Wurzburg, 1989). Pati dapat juga dihidrolisis oleh enzim pullulanase di titik percabangan α -(1,6) pada amilopektin sehingga akan dihasilkan amilosa rantai pendek.

Salah satu bahan pangan yang dapat dijadikan sebagai bahan baku untuk pembuatan pangan fungsional adalah pati

resisten atau *Resistant Starch* (RS), yaitu bagian dari pati yang tidak dapat dicerna oleh enzim dalam usus halus manusia yang sehat tetapi dapat difermentasi oleh mikroflora usus untuk menghasilkan asam lemak rantai pendek yang bermanfaat untuk kesehatan. Secara umum RS dapat diperoleh dari pati yang secara fisik terperangkap dalam sel-sel tanaman dan matriks bahan pangan (RS1), pati yang secara alami sangat resisten terhadap pencernaan oleh enzim α -amilase (RS2), pati yang dimodifikasi baik secara fisik (RS3) maupun kimia (RS4) (Champ, 2004).

RS3 diperoleh melalui proses pemanasan-pendinginan secara berulang yang merupakan kombinasi proses gelatinisasi (fraksi amilosa keluar dari granula) dan retrogradasi pati (proses kristalisasi amilosa yang bertanggung jawab pada pembentukan RS3) (Mun dan Shin, 2006; Sajilata *et al.*, 2006). Kadar RS3 secara proposional berbanding lurus dengan kandungan amilosa dalam bahan pangan (Shu *et al.*, 2007).

Peningkatan kadar RS3 dapat dilakukan dengan metode modifikasi pati: 1) pemanasan-pendinginan 2) hidrolisis asam (*lintnerized starch*) yang dilanjutkan dengan pemanasan-pendinginan 3) pemotongan titik cabang amilopektin oleh enzim pullulanase (*debranching*) dilanjutkan dengan pemanasan-pendinginan 4) kombinasi hidrolisis asam dan pemotongan titik cabang dengan pemanasan-pendinginan.

Proses hidrolisis oleh asam dan pemotongan titik cabang dapat mereduksi panjang rantai α -glukan sehingga derajat polimerisasi (DP) menjadi rendah. Nilai DP sekitar 10-35 adalah

* Korespondensi penulis :
E-mail : didah_nf17@yahoo.com

nilai yang cukup optimal untuk meningkatkan RS (Schmiedl *et al.*, 2000).

Hasil pengamatan menggunakan difraksi sinar X, tipe kristalin pati garut tergolong tipe A dengan karakteristik rantai amilopektin pati garut memiliki DP berkisar 9-30 dalam jumlah yang tinggi (96,0%), densitasnya lebih padat pada daerah struktur helikal (Wang *et al.*, 1998; Srichuwong *et al.*, 2005), proporsi rantai cabang berukuran pendek pada amilopektin lebih tinggi (Hizukuri *et al.*, 1983) dan jumlah rantai per kluster lebih banyak (Takeda *et al.*, 2003) dibandingkan dengan kristanilitas tipe B. Dengan karakteristik tersebut, pati garut merupakan pati yang berpotensi untuk dijadikan alternatif dalam pembuatan RS3.

Adapun tujuan penelitian ini adalah mempelajari perubahan struktur pati garut hasil modifikasi asam (*lintnerization*), pemotongan titik cabang (*debranching*) dan atau pemanasan pendinginan (*autoclaving-cooling*).

METODE PENELITIAN

Bahan dan alat

Pada penelitian ini bahan yang digunakan adalah umbi garut yang diperoleh dari Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika, Cimanggu, Bogor. Bahan kimia yang digunakan untuk modifikasi pati garut adalah NaOH, HCl, pullulanase dengan aktifitas >400 U/ml (Sigma P-2986), Na asetat buffer pH 5.2. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis adalah APTS (C₁₆H₈NNa₃O₉S₃, 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium), NaBH₃CN, NaHCO₃, aquades, deionized water, HCl, heksana, Na₂S₂O₅, Na K Tartarat, fenol, glukosa, HClO₄, Na₂HPO₄, kuprisulfat, Na₂SO₄, amonium molibdat, Na₂HPO₄.7H₂O dan Sheparose Toyopreal 65F, Sephadex™ G-25, butanol, Na asetat buffer pH 5.2 and 3.5, isoamilase (Haya Shibara Biochemical Laboratories.Inc), etanol dan aseton. Alat yang digunakan selama penelitian ini adalah ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Forester City, CA, USA), Polymer POP, 36-cm capillary, *Gel Permeation Chromatography* HW 65F (Toyopearl, Tosoh Corporation Akasaka, Minato-ku Japan), *shaker incubator*, *freeze dryer* (DC 800 Yamato Scientific Co, Ltd, Japan), *drying incubator*, vortex, otoklaf, pompa peristaltik, UV-Vis spektrofotometer, dan spektronik 20D⁺

Proses ekstraksi pati garut

Umbi garut dibersihkan, dikupas dan dicuci dengan air bersih, direndam 1 jam, diblender dengan perbandingan umbi : air sebesar 1 : 3.5, penyaringan, pengendapan pati, pencucian dan pengeringan pati dengan menggunakan oven suhu 50°. Pati garut kering digiling dengan menggunakan *disc mill*, kemudian disaring dan diayak. Pati yang dihasilkan dikemas dan disimpan di dalam *freezer* -18°C sampai digunakan.

Modifikasi pati garut

Pemanasan-pendinginan (Lehmann *et al.*, 2003)

Pati garut (*native*) dengan konsentrasi pati 20% diotoklaf 121°C selama 15 menit dan didinginkan pada suhu 4°C selama

24 jam. Pemanasan pendinginan dilakukan sebanyak 3 kali (3 siklus) kemudian sampel dikeringkan, digiling dengan menggunakan *disc mill*, kemudian disaring dan diayak. Pati yang dihasilkan dikemas dan disimpan di dalam *freezer* -18°C sampai digunakan

Kombinasi hidrolisis asam dan pemanasan-pendinginan (Aparicio-Saguilan *et al.*, 2005)

Pati garut dihidrolisis oleh asam HCl dengan konsentrasi 2,2 N selama 2 jam pada suhu 35°C. Kemudian hasil hidrolisis asam dinetralkan dengan NaOH sampai pH 6 dan dikeringkan dengan oven suhu 50°C. Pati hasil hidrolisis asam diberi perlakuan sama seperti modifikasi dengan pemanasan-pendinginan

Kombinasi pemotongan titik cabang oleh enzim pullulanase dan pemanasan-pendinginan

Penentuan aktifitas enzim pullulanase (Gonzalez-Soto *et al.*, 2004 dan Gonzales-Soto *et al.*, 2007).

Larutan enzim pullulanase (30 µl enzim pullulanase ditambahkan 720 µl of asetat buffer, pH 5,2 dan 0,1 M. Sebanyak 62,5 µl larutan enzim tersebut ditambahkan dengan 125 µl larutan *waxy maize* (0.4 mg/ml) dan 62,5 µl larutan asetat buffer pH 5,2 dan 0,1 M.

Campuran larutan tersebut kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 50°C. Reaksi enzimatis dihentikan dengan penambahan 0,5 ml larutan 0,5 M NaOH. Kandungan gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan metode Park-Johnson (Takeda *et al.*, 1993)

Pemotongan titik cabang pati garut dan pemanasan pendinginan (Zhao dan Lin, 2009).

Pati garut diotoklaf 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada suhu 4°C. Pati yang telah mengalami modifikasi satu siklus dipanaskan sampai suhu 50°C, kemudian ditambahkan enzim pullulanase dengan konsentrasi 1,3 dan 10,4 U/g pati dengan suhu 50°C dan pH 5,2 selama 24 jam. Inaktivasi enzim dilakukan dengan cara otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian diberi perlakuan pemanasan pendinginan sebanyak 2 siklus. Pati yang telah mengalami hidrolisis dengan enzim pullulanase kemudian diberi perlakuan sama seperti modifikasi dengan pemanasan-pendinginan.

Kombinasi asam, pemotongan titik cabang dan pemanasan pendinginan (Lehmann *et al.*, 2003)

Perlakuan ini merupakan kombinasi perlakuan modifikasi asam dan pemotongan titik cabang dengan pemanasan pendinginan. Pati garut hasil hidrolisis dengan asam kemudian diberi perlakuan seperti pada tahap modifikasi pati garut dengan pemotongan titik cabang dan pemanasan pendinginan.

Analisis distribusi amilosa dan amilopektin dengan *Gel Permeation Chromatography* (GPC) (Sunarti *et al.*, 2001; Ozturk *et al.*, 2009).

Sampel bebas lemak disuspensikan dalam air dan diotoklaf pada suhu 105°C selama 1 jam, dan disentrifus (4°C, 10000 g). Supernatan dipisahkan dan dihitung kadar total karbohidrat. Supernatant (10 mg/ml) diinjeksikan pada kolom gel Toyopearl

(GPC Toyopearl HW-65F, Toyopearl HW-65S gel, dengan ukuran kolom 2,6 cm ID x 100 cm, NaCl 50 mM sebagai eluen dan kecepatan 60 ml/jam). Sampel sebanyak 10 ml setiap fraksi ditampung dan diambil 0,5 ml aliquot untuk dianalisis kadar karbohidrat totalnya dengan menggunakan metode fenol-sulfat (Dubois *et al.*, 1956). Hasil khromatogram GPC dibagi menjadi 2 area (Fraksi I/Fr-I and Fraksi II/Fr-II). Kurva profil GPC adalah hubungan antara nomor fraksi dengan rasio total karbohidrat (kadar total karbohidrat setiap fraksi dibagi dengan jumlah total kadar karbohidrat semua fraksi yang terelusi).

Analisis distribusi panjang rantai amilopektin dan amilosa rantai pendek dengan *Fluorophore-Assisted Capillary Electrophoresis* (FACE) (Srichuwong *et al.*, 2004)

Persiapan sampel

Sampel pati ditimbang 10 mg dan ditambahkan 5 ml aquades ke dalam tabung sentrifuse 15 ml (konsentrasi akhir 2 mg/ml) dan diotoklaf pada suhu 105°C selama 1 jam. Tahap selanjutnya divorteks dan larutan diambil 100 µl (suhu dibawah 37°C) ditambahkan 5 µl 50 mM buffer asetat pH 3,5 dan 5 µl larutan enzim isoamilase selanjutnya divortex dan disimpan pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan tersebut dididihkan pada suhu 100°C selama 5 menit dan disentrifus 15.000 rpm 5 menit.

Supernatan sebanyak 50 µl dikeringkan dengan menggunakan *drying evaporator* dan ditambahkan 2 µl larutan NaBH₃CN 1 M dan 2 µl APTS 0.2 M (8-aminopyrene-1,3,6-trisulfuric acid trisodium), divorteks dan disimpan pada suhu 37°C selama 24 jam. Tahap selanjutnya adalah penambahan 1 ml aquades dan divorteks kemudian disimpan pada suhu -30°C sebelum dianalisis menggunakan Genetic Analyzer.

Fluorophore-Assisted Capillary Electrophoresis (FACE)

Sampel *dithawing*, diencerkan 1000, 2000 dan 3000 kali kemudian diambil sebanyak 20 µl dimasukkan ke dalam 96-well dan disentrifus selanjutnya sampel yang berada dalam 96-well dimasukkan ke dalam genetic analyzer dengan polimer POP-6 dan 36 cm capillary. Elektroforesis dijalankan dengan buffer genetic analyzer pada 15kV selama 2 jam dan data dianalisis dengan menggunakan Genescan 3,7 software dari Applied Biosystems.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil pati dengan *Gel Permeation Chromatography* (GPC)

Perubahan profil distribusi amilosa dan amilopektin dari pati garut sebagai akibat dari perlakuan modifikasi pati garut dianalisis dengan menggunakan *Gel Permeation Chromatography* (GPC) dan dinyatakan sebagai rasio total karbohidrat. Kromatogram GPC pada seluruh pati garut, baik sebelum maupun setelah modifikasi, memiliki dua fraksi, yaitu fraksi I (Fr-I) dan fraksi II (Fr-II). Hasil penelitian terdahulu juga memperlihatkan dua fraksi pada kromatogram GPC, yaitu pada pati beras (Mujoo dan Ali, 1999), pati gandum, kentang dan tapioka (Singh dan Ali, 2000), dan pati jagung tinggi amilosa (Ozturk *et al.*, 2009). Fraksi I merupakan fraksi amilopektin

dengan bobot molekul besar, sedangkan fraksi II (Fr-II) merupakan fraksi amilosa dan gula-gula sederhana dengan bobot molekul kecil. Fraksi I terdapat pada fraksi nomor 1 sampai 30, sedangkan fraksi II terdapat pada fraksi nomor 31 sampai 48.

Gambar 1 secara umum memperlihatkan perubahan rasio total karbohidrat pada fraksi I dan fraksi II untuk setiap perlakuan modifikasi, baik dibandingkan dengan pati garut alami maupun pati yang diberikan perlakuan. Seberapa besar perubahan tersebut terjadi, dianalisis secara kuantitatif sebagai jumlah persentase rasio total karbohidrat pada masing-masing fraksi sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 1. Tabel tersebut juga memperlihatkan perubahan persentase peningkatan total karbohidrat pada fraksi II untuk menunjukkan seberapa besar perubahan fraksi amilosa dengan bobot molekul rendah sebagai akibat perlakuan modifikasi. Data-data tersebut memperlihatkan adanya peningkatan rasio total karbohidrat pada fraksi II (yang menunjukkan peningkatan fraksi amilosa dan gula sederhana) yang selalu diikuti dengan penurunan rasio total karbohidrat pada fraksi I (yang menunjukkan penurunan fraksi amilopektin).

Rasio total karbohidrat fraksi amilopektin (Fr-I) dari pati garut yang diberi perlakuan pemanasan-pendinginan sebanyak 3 siklus mengalami penurunan, sedangkan pada fraksi amilosa (Fr-II) mengalami peningkatan sebesar 13,33%. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi degradasi molekul amilopektin terutama rantai luar pada daerah kristalin menjadi molekul amilosa rantai pendek selama proses pemanasan dibandingkan dengan pati garut alami (*native*) (Mahadevamma *et al.*, 2003). Proses *autoclaving* dengan suhu tinggi memicu terjadinya depolimerisasi parsial pati singkong yang menyebabkan pembentukan molekul dengan bobot yang lebih rendah (Mutungi *et al.*, 2009), sama seperti pada sampel pati jagung tinggi amilosa hasil penelitian Ozturk *et al.* (2009) dan pati sugu (Leong *et al.*, 2007).

Perlakuan hidrolisis asam dengan hanya menggunakan HCl 2,2N selama 2 jam menyebabkan peningkatan Fr-II hingga 164,84%, sedangkan yang dikombinasikan dengan siklus pemanasan-pendinginan meningkat hingga 208,03% dibandingkan pati garut alaminya (Tabel 1 dan Gambar 1b). Peningkatan Fr-II pada pati garut yang mengalami hidrolisis tersebut disebabkan oleh terjadinya degradasi molekul amilopektin dan amilosa pada daerah amorf. Kehilangan puncak terjadi pada Fr-I dan peningkatan komponen berbobot molekul rendah (Fr-II) (Singh dan Ali, 2000; Franco *et al.*, 2002; Ferrini *et al.*, 2008), yang berkorelasi terhadap peningkatan pembentukan RS3 (Aparicio-Saguilan *et al.*, 2005).

Fraksi II mengandung fraksi amilosa, amilopektin dan amilosa hasil hidrolisis oleh asam. Degradasi daerah amorf terjadi karena asam berdifusi ke dalam granula pati dan menyerang atom oksigen pada ikatan glikosidik yang terdapat pada α -1,4 atau α -1,6 sehingga menghasilkan senyawa intermediet karbokationik yang tidak stabil dan dapat bereaksi dengan air dalam granula pati (Chung dan Lai, 2007). Hal ini disebabkan amilopektin dan amilosa pati garut mengalami degradasi selama proses hidrolisis asam dan siklus pemanasan-pendinginan. Selama sampel mengalami proses *autoclaving*, depolimerasi amilopektin dan amilosa menjadi amilosa rantai pendek menjadi lebih mudah apabila pati sudah

mengalami hidrolisis asam. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Mujoo dan Ali (1999), (Mutungi *et al.*, 2009) dan (Leong *et al.*, 2007) sebagaimana telah dijelaskan di atas.

Aktifitas enzim pullulanase sebesar 416,04 U/ml atau PUN dapat menghidrolisis percabangan $\alpha(1,6)$ pada amilopektin (pemotongan titik cabang), sehingga dihasilkan fraksi molekul berantai lurus (amilosa rantai pendek). Hidrolisis pati oleh enzim pullulanase menghasilkan amilosa rantai pendek yang diharapkan dapat menghasilkan DP yang optimal untuk proses pembentukan RS3 yang merupakan pati hasil retrogradasi (Pongjanta *et al.*, 2009a). Semakin banyak fraksi amilosa berantai pendek, maka semakin banyak kemungkinan untuk meningkatkan pembentukan RS3 selama proses pemanasan-pendinginan (Pongjanta *et al.*, 2009a; Ozturk *et al.*, 2009).

Analisis GPC menunjukkan bahwa masih ditemukan puncak pada Fr-I baik pada penggunaan konsentrasi pullulanase 1,3 U/g pati maupun pada konsentrasi 10,4 U/g pati (Gambar 1c). Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua amilopektin terhidrolisis sempurna dan menghasilkan fraksi amilosa rantai pendek. Pada penggunaan konsentrasi enzim pullulanase konsentrasi rendah, puncak pada Fr-I lebih tinggi dibandingkan dengan puncak yang terbentuk pada penggunaan enzim pullulanase konsentrasi tinggi. Hal ini mengakibatkan peningkatan Fr-II pada sampel dengan pullulanase 1,3 U/g pati lebih rendah (120,67%) dibandingkan pullulanase 10,4 U/g pati (214,40%) (Tabel 1). Pati dengan pullulanase 10,4 U/g mengalami penurunan puncak pada Fr-I dan mengalami peningkatan puncak pada Fr-II. Hasil ini berkesesuaian dengan hasil penelitian Ozturk *et al.*, (2009) pada pati jagung Hylon 7 dan Hylon 5, yaitu semakin lama waktu hidrolisis dengan enzim pullulanase (0-48 jam) maka semakin rendah puncak Fr-I dan semakin meningkat puncak Fr-II (Gambar 1c).

Pengaruh kombinasi perlakuan asam, pemotongan percabangan dan pemanasan-pendinginan terhadap profil GPC dapat dilihat pada Gambar 1d. Pada Fr-I tidak ditemukan adanya puncak karena pati garut sudah mengalami hidrolisis asam. Namun, rasio total karbohidrat pada Fr-I pada setiap nomor fraksi lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan hidrolisis asam dengan pemanasan-pendinginan. Pada Fr-II terjadi peningkatan rasio total karbohidrat yang lebih tinggi baik pada konsentrasi enzim pullulanase 1,3 U/g pati (222,96%) maupun pada konsentrasi 10,4 U/g pati (214,60%) dibandingkan dengan perlakuan modifikasi lainnya. Peningkatan

rasio karbohidrat Fr-II mengindikasikan lebih banyak fraksi amilosa rantai pendek yang terbentuk.

Distribusi panjang rantai amilopektin dan amilosa rantai pendek dengan FACE

Panjang rantai amilopektin dan amilosa rantai pendek dengan DP 6-30 dapat diketahui dengan menggunakan *Fluorophore-Assited Capillary Electrophoresis* (FACE). Amilopektin pada pati garut baik yang alami dan yang mengalami proses modifikasi, dihidrolisis secara sempurna dengan menggunakan enzim isoamilase sehingga semua titik percabangan $\alpha-1,6$ terputus dan menghasilkan rantai glukukan dengan ujung pereduksi. Semakin banyak yang terhidrolisis maka semakin tinggi kadar gula pereduksinya. Ujung pereduksi kemudian diderivatisasi dengan APTS (*8-amino-pyrene-1,3,6-trisulfuric acid trisodium*) sehingga pati dapat dianalisis dengan menggunakan FACE. Ujung pereduksi rantai glukukan dapat diperoleh baik dari hasil hidrolisis amilopektin maupun dari degradasi amilosa. Analisis DP rantai glukukan dengan menggunakan FACE tidak dapat membedakan ujung pereduksi rantai glukukan hasil hidrolisis amilopektin atau hasil degradasi amilosa. Namun, kenaikan persentase distribusi rantai glukukan merupakan indikasi telah terjadinya degradasi amilosa menjadi amilosa rantai pendek.

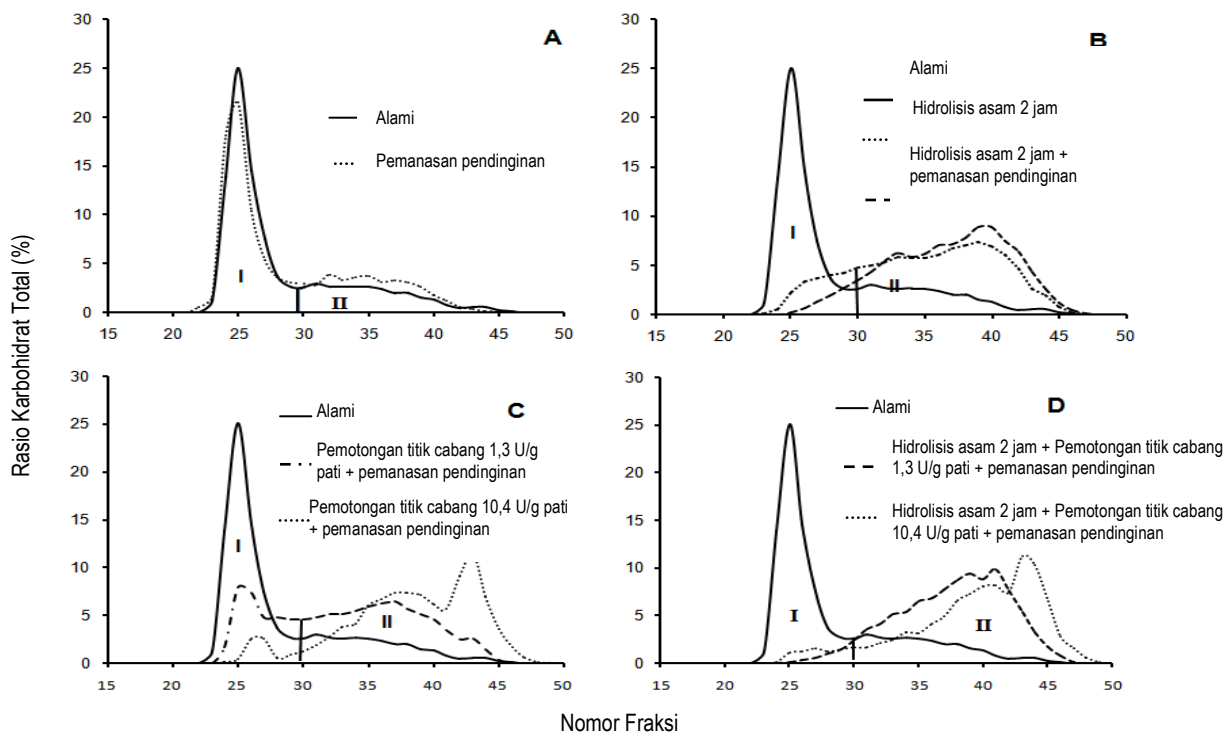
Profil distribusi DP baik pada pati garut alami atau pati garut termodifikasi dapat dilihat pada Gambar 2 dengan puncak yang banyak pada DP 11-13. Srichuwong *et al.* (2005) juga melaporkan bahwa pati garut memiliki DP yang paling banyak pada 11-13 dan DP 16-26 secara positif berkorelasi dengan tingginya pembentukan RS3. Pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa semua sampel memiliki proporsi yang paling tinggi pada DP 13-24 (44.65-56.04%).

Persen distribusi amilopektin dan amilosa rantai pendek pada pati garut dengan perlakuan pemanasan-pendinginan adalah sebagai berikut: DP 6-8 (6,68%), DP 9-12 (32,09%), DP 13-24 (54,91%) dan DP 25-30 (6,32%). Dibandingkan dengan pati garut alami, maka persen distribusi pada DP 6-8, 9-12 dan 25-30 meningkat sedangkan DP 13-24 menurun.

Hal ini menunjukkan bahwa proses pemanasan-pendinginan dapat meningkatkan rantai amilosa rantai pendek yang kemungkinan berasal dari depolimerisasi amilosa rantai panjang. Hal ini telah dijelaskan pada sub-bab mengenai pengaruh pemanasan-pendinginan terhadap profil amilopektin dan amilosa dengan menggunakan GPC.

Tabel 1. Rasio total karbohidrat pati garut pada fraksi I dan II sebelum dan setelah perlakuan modifikasi dari hasil analisis GPC

Perlakuan	% Fraksi I (nomor fraksi 1-30)	% Fraksi II (nomor fraksi 31-48)	% Peningkatan fraksi II
Pati garut alami	70,80	29,20	
Pemanasan pendinginan 3 siklus	66,91	33,09	13,33
Hidrolisis asam 2 jam	22,67	77,33	164,84
Hidrolisis asam 2 jam + pemanasan pendinginan	10,06	89,94	208,03
Pemotongan titik cabang 1,3 U/g pati + pemanasan pendinginan	35,56	64,44	120,67
Pemotongan titik cabang 10,4 U/g pati + pemanasan pendinginan	8,20	91,80	214,40
Hidrolisis asam 2 jam + pemotongan titik cabang 1,3 U/g pati + pemanasan pendinginan	5,70	94,30	222,96
Hidrolisis asam 2 jam + pemotongan titik cabang 10,4 U/g pati + pemanasan pendinginan	8,13	91,87	214,64



Gambar 1. Profil GPC pati garut dan termodifikasi pada Sheparose Toyopreal HW-65F

Tabel 2. Persentase distribusi panjang rantai pada amilopektin dan amilosa rantai pendek dari hasil pengukuran dengan FACE

Perlakuan	Distribusi Panjang rantai (%)			
	Panjang rantai 6-8	Panjang rantai 9-12	Panjang rantai 13-24	Panjang rantai 25-30
Pati garut alami	5,98	31,77	56,04	6,21
Pemanasan pendinginan 3 siklus	6,68	32,09	54,91	6,32
Hidrolisis asam 2 jam	6,69	30,66	55,31	7,33
Hidrolisis asam 2 jam + pemanasan pendinginan 3 siklus	7,08	30,86	55,34	6,72
Pemotongan titik cabang 1,3 U/g pati + pemanasan pendinginan	8,13	31,52	53,68	6,67
Pemotongan titik cabang 10,4 U/g pati + pemanasan pendinginan	16,81	33,37	44,65	5,17
Hidrolisis asam 2 jam + pemotongan titik cabang 1,3 U/g pati + pemanasan pendinginan	7,59	30,53	54,80	7,08
Hidrolisis asam 2 jam + pemotongan titik cabang 10,4 U/g pati + pemanasan pendinginan	14,79	31,55	47,92	5,75

Kemungkinan yang lain adalah terjadinya degradasi amilopektin dengan DP 13-24 sehingga persen distribusi DP 13-24 menurun dibandingkan dengan pati garut alami. Penurunan DP 13-24 kemungkinan disebabkan oleh degradasi amilopektin pada DP tersebut dan membentuk amilosa rantai pendek dengan DP 6-8 atau 9-12. Semua sampel dengan perlakuan pemanasan-pendinginan mengalami peningkatan DP 6-8 bila dibandingkan dengan pati garut alami. Hal ini disebabkan oleh degradasi amilosa rantai panjang atau amilopektin rantai medium (Gambar 2 dan Tabel 2).

Profil distribusi panjang rantai amilopektin dan amilosa rantai pendek pada pati garut yang dihidrolisis dengan HCl 2,2 N selama 2 jam dan dilanjutkan dengan proses pemanasan-pendinginan dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 2. Dibandingkan dengan pati garut alaminya, pati yang diberi perlakuan tersebut mengalami peningkatan persentase distribusi panjang rantai dengan DP 6-8 dan 25-30 dan penurunan pada DP 9-12 dan 13-24.

Peningkatan persentase panjang rantai dengan DP 6-8 dan 25-30 pada perlakuan hidrolisis asam disebabkan oleh terjadinya depolimerisasi amilosa rantai panjang membentuk amilosa rantai pendek. Hidrolisis asam terjadi pada daerah amorf yang umumnya banyak mengandung amilosa dan titik percabangan α ,1-6 pada amilopektin. Kemungkinan lainnya adalah hidrolisis panjang rantai medium amilopektin sehingga persentase distribusi panjang rantai dengan DP 9-12 dan 13-24 menurun dan dihasilkan rantai glukukan dengan DP 6-8.

Proses pemotongan titik percabangan amilopektin menghasilkan banyak rantai glukukan dengan DP 6-8, 9-12, 13-24 dan 25-30 (Tabel 2). Rantai glukukan hasil pemotongan titik percabangan kemudian dipanaskan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Proses pemanasan pada rantai glukukan hasil pemotongan titik percabangan amilopektin menyebabkan depolimerisasi rantai glukukan lebih mudah dibandingkan dengan dalam bentuk struktur amilopektinnya. Hal ini menyebabkan panjang rantai

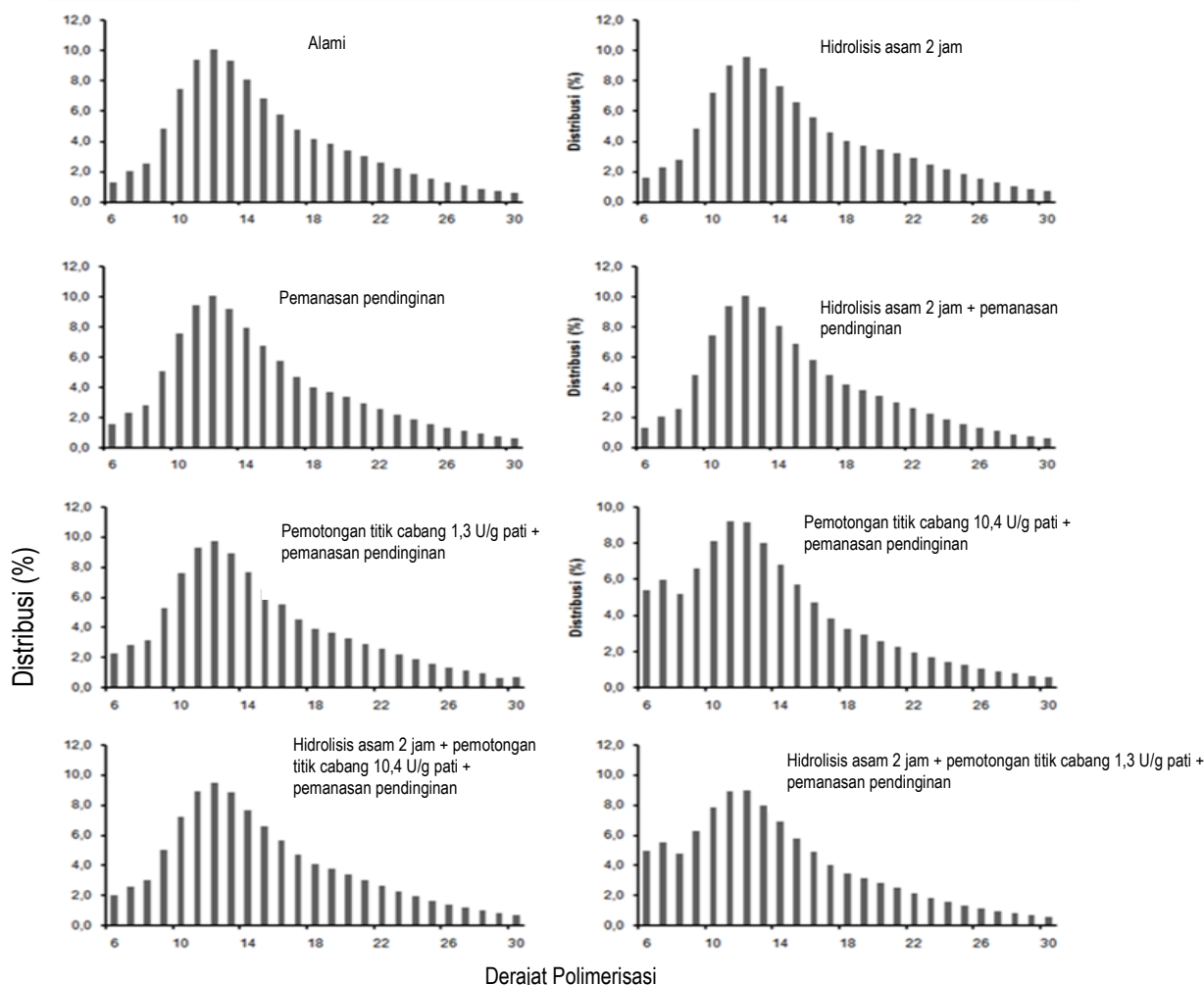
glukan dengan DP 6-8 pada pati garut yang dimodifikasi dengan pemotongan titik percabangan dan pemanasan-pendinginan menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan modifikasi lainnya.

Peningkatan persentase panjang rantai glukan dengan DP 6-8 dapat juga disebabkan oleh depolimerisasi amilosa rantai panjang sebagai akibat proses pemanasan-pendinginan. Pada konsentrasi enzim pullulanase 1,3 U/g pati, peningkatan persentase panjang rantai dengan DP 6-8 lebih rendah dibandingkan dengan pada konsentrasi enzim 10,4 U/g pati. Hal ini karena penggunaan konsentrasi enzim pullulanase yang rendah belum menyebabkan semua titik percabangan α ,1-6 terhidrolisis sehingga peluang untuk depolimerisasi rantai glukan hasil pemotongan titik percabangan amilopektin (*debranching*) lebih rendah.

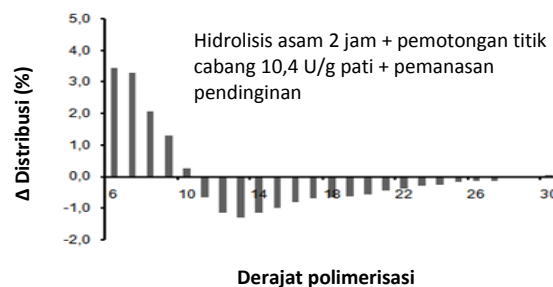
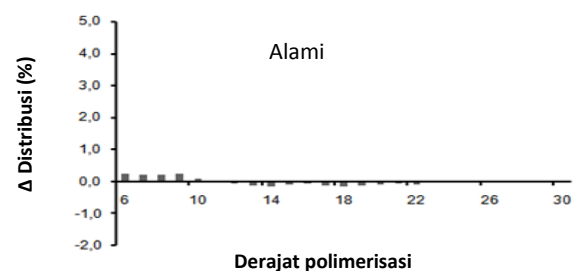
Peningkatan persentase panjang rantai dengan DP 6-8 pada penggunaan enzim pullulanase konsentrasi rendah diikuti dengan penurunan pada rantai glukan dengan DP 13-24. Hal ini menjelaskan kemungkinan terjadinya depolimerisasi rantai glukan dengan DP 13-24 sebagai akibat proses pemanasan-pendinginan. Peningkatan panjang rantai dengan DP 25-30 disebabkan oleh depolimerisasi amilosa rantai panjang akibat proses pemanasan-pendinginan. Penggunaan enzim

pullulanase konsentrasi tinggi menyebabkan peningkatan persentase distribusi rantai glukan dengan DP 6-8 dan 9-12 lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan pada konsentrasi rendah. Semakin tinggi konsentrasi enzim pullulanase, maka semakin banyak titik percabangan α ,1-6 amilopektin yang terputus sehingga peluang terhidrolisisnya rantai glukan hasil pemotongan titik percabangan amilopektin meningkat pada saat proses pemanasan-pendinginan dan menyebabkan penurunan panjang rantai glukan dengan DP 25-30.

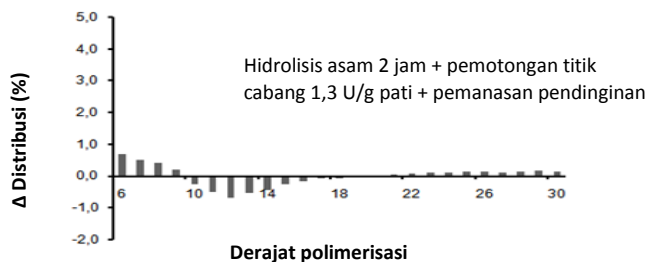
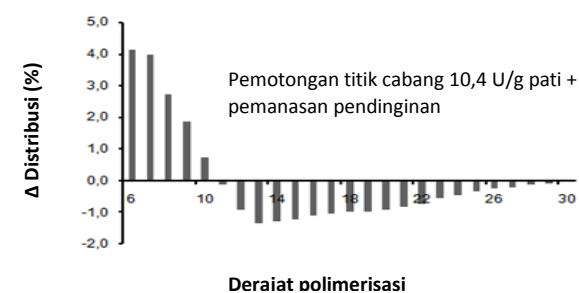
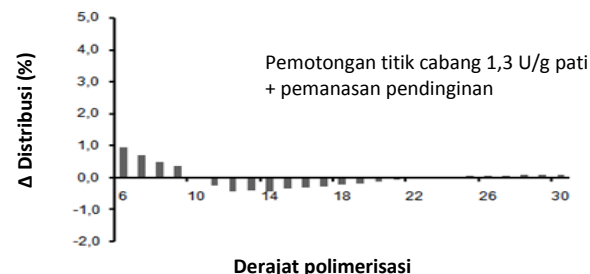
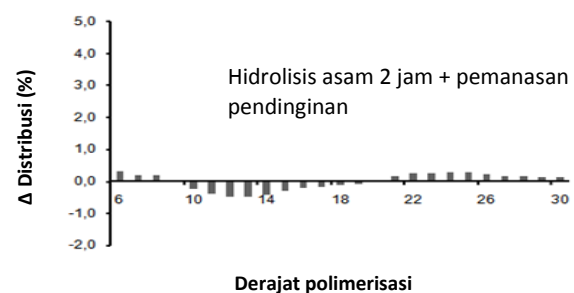
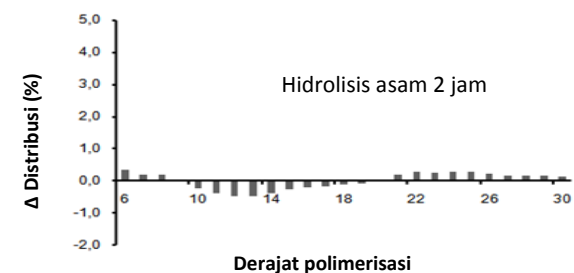
Chung *et al.* (2009) melaporkan bahwa pati singkong yang mengalami proses hidrolisis oleh enzim pullulanase dan pemanasan-pendinginan memiliki DP 5-48, yaitu jumlah yang tinggi terdapat pada DP 10-24 (58,9%) dan DP >24 (31,2%), sedangkan DP <10 hanya sekitar 8%. Pati jagung yang dimodifikasi dengan HMT (*Heat Moisture Treatment*) baik yang dikombinasikan dengan modifikasi *annealing* maupun tanpa *annealing* ternyata dapat meningkatkan DP 6-8 dan menurunkan DP \geq 37 (Chung *et al.*, 2009). Dari hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa proses pemanasan dapat memutuskan ikatan kovalen pada rantai glukan sehingga terbentuk rantai glukan yang lebih pendek baik pada amilopektin maupun pada amilosa (Chung *et al.*, 2009).



Gambar 2. Distribusi panjang rantai pada amilopektin dan amilosa rantai pendek.



Gambar 3. Persentase panjang rantai pada pati garut termodifikasi dibandingkan dengan pati garut alami



KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil analisis GPC memperlihatkan perlakuan modifikasi pati garut, baik dengan pemanasan-pendinginan, hidrolisis asam, kombinasi hidrolisis asam dan pemanasan-pendinginan, kombinasi hidrolisis oleh enzim pullulanase (pemotongan titik percabangan) dan pemanasan-pendinginan, serta kombinasi hidrolisis asam, pemotongan titik percabangan dan pemanasan-pendinginan menyebabkan penurunan fraksi amilopektin dan peningkatan fraksi amilosa (degradasi amilopektin dan amilosa menjadi fraksi amilosa rantai pendek).

Distribusi rantai linear baik dari hasil pemotongan titik percabangan amilopektin maupun hidrolisis amilosa yang diukur dengan menggunakan FACE menunjukkan empat rentang derajat polimerisasi (DP), yaitu 6-8, 9-12, 13-24, dan 25-30. Perlakuan modifikasi pati garut dengan pemanasan-pendinginan, kombinasi hidrolisis asam dan pemanasan-pendinginan, kombinasi pemotongan titik cabang dan pemanasan-pendinginan serta kombinasi hidrolisis asam, pemotongan titik cabang dengan konsentrasi pullulanase (1,3 U/g pati) meningkatkan DP 25-30 yang kemungkinan besar berkontribusi pada pembentukan RS3. Semua sampel memiliki proporsi yang paling tinggi pada DP 13-24 (44,65-56,04%).

Proses pemanasan-pendinginan meningkatkan DP 6-8 dengan peningkatan yang cukup besar terutama bila dikombinasikan dengan pemotongan titik percabangan pada konsentrasi enzim pullulanase tinggi (10,4 U/g pati).

Saran

Analisis kadar pati resisten diperlukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh semua modifikasi pati garut terhadap peningkatan kadar pati resisten sehingga dapat ditentukan modifikasi pati garut yang dapat dikembangkan lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada DIKTI melalui program Hibah Bersaing, *Sandwich-like* dan Indofood Riset Nugraha 2008 yang telah membiayai penelitian ini juga kepada Prof. Makoto Hisamatsu dan Dr. Naoto Isono yang telah memberikan kesempatan melakukan penelitian di *Food Chemistry*

Laboratory, Department of Sustainable Resource Science, Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu-shi Jepang.

DAFTAR PUSTAKA

- Aparicio-Saguilan, Flores-Huicochea E, Tovar J, García-Suárez F, Gutiérrez-Meraz F, Bello-Pérez LA. 2005. Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: partial characterization. *Starch/Starke* 57: 405-412.
- Champ M. 2004. Resistant Starch. In *Starch in Food*. Woodhead Publishing Limited, CEC Press LLC. Boca Raton. USA.
- Chung HJ, Liu Q, Hoover R. 2009. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. *Carbohydrate Polymers* 75: 436-447.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal.Chem.* 28:350-356.
- Franco CML, Cabrala RAF, Tavares DQ. 2002. Structural and physicochemical characteristics of lintnerized native and sour cassava starches. *Starch/Stärke* 54: 469-475.
- Gonzales-Soto RA, Agama-Acevedo E, Solorza-Feria J, Rendón-Villalobos R, Bello-Pérez LA. 2004. Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching. *Starch/Stärke* 56:495-499.
- Gonzales-Soto RA, Mora-Escobedo R, Hernández-Sa'nchez H, Sanchez-Rivera M, Bello-Pérez LA. 2007. The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoclaved debranched banana starch. *Food Research International* 40:304-310.
- Hizukuri S, Takeda Y, Yasuda M, Suzuki A. 1981. Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrates. Res* 94:209-214.
- Lehmann U, Rossler C, Schmiedl D, Jacobash G. 2003. Production and physicochemical characterization of resistant starch type 3 derived from pea starch. *Food/Nahrung* 47(1):60-63.
- Leong YH, Karim AA, Norziah MH. 2007. Effect of pullulanase debranching of sago (*Metroxylon sagu*) starch at subgelatinization temperature on the yield of resistant starch. *Starch/Starke* 59: 21-32.
- Mahadevamma MS, Harish KVP, Tarathanan RN. 2003. Resistant starch derived from processed legumes: purification and structural characterization. *Journal of Carbohydrate Polymers* 54: 215-219
- Miao M, Jiang B, Zhang T. 2009. Effect of pullulanase debranching and recrystallization on structure and digestibility of waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers* 76:214-221.
- Mujoo R, Ali SZ.1999. Molecular degradation of rice starch during processing to flakes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:941-949.
- Mun SH, Shin M. 2006. Mild hydrolysis of resistant starch from maize. *Food Chemistry* 96:115-121.
- Mutungi C, Rosta F, Onyangob C, Jarosa D, Rohma H. 2009. Crystallinity, thermal and morphological characteristics of resistant starch type III Produced by hydrothermal treatment of debranched cassava starch. *Starch/Starke* 61: 1-12.
- Ozturk S, Koxsel H, Kahraman K. 2009. Effect of debranching and heat treatments on formation and functional properties of resistant starch from high-amylose corn starch. *European Food Research and Technology* 229(1):115-125.
- Pongjanta J, Utaipattanaceep O, Naivikul, Piyachomkwan K. 2009. Effect of preheated treatments on physicochemical properties of resistant starch type iii from pullulanase hydrolysis of high amylose rice KW starch. *American Journal of Food Technology* 4(2):79-89.
- Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. 2006. Resistant starch-a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5:1-17.
- Schmiedl D, Bauerlein M, Bengs H, Jacobasch G. 2000. Production of heat-stable, butyrogenic resistant starch. *Carbohydrate Polymers* 43: 183-193.
- Singh V, Ali SZ. 2000. Acid degradation of starch. The effect of acid and starch type. *Carbohydrate Polymers* 41: 191-195.
- Shu X Jia L, Gao J, Sing Y, Zhao H, Nakamura Y, Wu D. 2007. The influence of chain length of amilopectin on resistant starch in rice (*Oryza sativa* L). *Starch/Starke* 59 : 504-509.
- Slijestrom M, Eliason AC, Bjork I. 1989. Characterization of resistant starch from autoclaved wheat starch. *Starch/Starke* 41(4): 147-151.
- Sunarti TC, Nunome N, Yashio, Hisamatsu M. 2001. Study on outer chains from amilopectin between immobilized and free debranching enzymes. *Journal of Applied Glycoscience* 48 (1):1-10.
- Srichuwong S, Sunarti TC, Mishima T, Isono N, Hisamatsu M. 2005. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. *Carbohydrate Polymers* 60: 529-538.
- Takeda Y, Guan HP, Preiss J, 1993. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydrate Research* 240:253-263.
- Takeda Y, Hanashiro M. 2003. Examination of the structure of amylose and amylopectin by fluorescent labeling terminal. *Journal of Applied Glycoscience* 48: 123-130.
- Tester RF, John K, Xin Q. 2004. Review. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39:151-165.
- Wang TL, Bogracheva TY, Hedley CL. 1998. Starch: As simple as A, B, C?. *Journal of Experimental Botany* 49:481-502.
- Zhao XH, Lin Y. 2009. The impact of coupled acid or pullulanase debranching on the formation of resistant starch from maize starch with autoclaving-cooling cycles. *European Food Research Technology* 230(1):179-184.