

MODIFIKASI PENENTUAN ASAM PITAT DENGAN HPLC DAN PENGGUNAANNYA UNTUK MENGUJI PENGARUH PENYIMPANAN DEDAK PADI TERHADAP KANDUNGAN ASAM PITATNYA

Oleh

Hilyati* dan A. Irawan Sutikno*

ABSTRACT

The phytic acid of paddy husk has been quantified using high performance liquid Chromatography (HPLC). This method gave accurate recovery and precision ranging from 80 to 102%. The method showed spesific result and was not time consuming compared to the colorimetric method.

The chromatograms showed that the level of phytic acid in paddy husk reduced to 45% of the initial level after 30 days storage in Ciawi—Bogor, and to 27% after 50 days strorage those in Darmaga—Bogor. Submerging in boiling water (1;1,w/w) for 24 hours reduced the phytic acid to 30%, while irradiating with gamma-rays at 10 Kgy doses reduced the phytic acid to 29% of the original amount.

ABSTRAK

Kandungan asam pitat pada dedak di tetapkan secara kuantitatif dengan HPLC. Metoda ini memberikan recovery dan ketelitian yang cukup baik yaitu antara 80 — 102%. Bila dibandingkan dengan metode kolorimetri, metoda HPLC memberikan hasil analisis yang spesifik dengan waktu analisis yang lebih cepat.

Dengan menggunakan metoda HPLC, sampel dedak padi yang disimpan di Ciawi—Bogor memperlihatkan penurunan kadar asam pitat 45% selama 30 hari, sedangkan sampel yang disimpan di Darmaga—Bogor menunjukkan penurunan sebanyak 27% setelah penyimpanan selama 50

* Staf peneliti Puslitbang Kimia Terapan-LIPI, Cisitubandung.

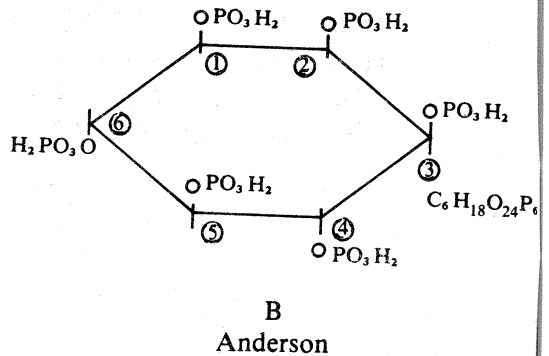
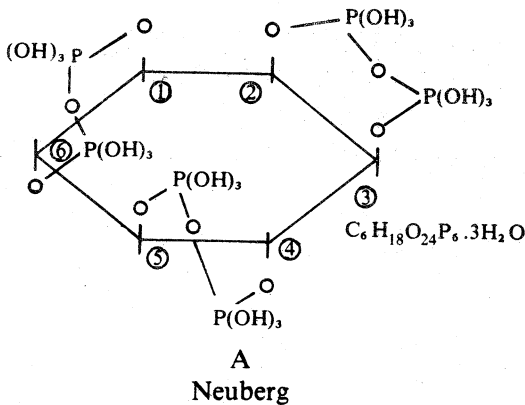
** Staf Peneliti Balai Penelitian Ternak Ciawi-Bogor.

hari. Sampel yang ditambah air mendidih (1:1,w/w) dan dibiarkan selama 24 jam berkurang 30%, sedangkan dengan penyinaran sinar gamma turun 29%.

PENDAHULUAN

Dedak padi merupakan hasil samping pengolahan padi menjadi beras. Jumlah dedak padi yang dihasilkan di Indonesia kira-kira 10% dari produksi beras. Dedak padi ini diperoleh terutama dari tempat-tempat penggilingan padi dan banyak digunakan untuk makanan ternak karena mengandung protein, mineral dan lemak yang tinggi serta sebagai sumber vitamin B yang baik. Walaupun demikian, dedak padi diketahui mengandung suatu senyawa anti nutrisi yang dikenal sebagai asam pitat, yang kadarnya kurang lebih 1,44% dan kandungan fosfornya merupakan hampir 86% jumlah total pada fosfor.

Pitat pertama kali dijumpai oleh Preffer pada tahun 1872 yang kemudian oleh Anderson (1914) diidentifikasi sebagai inositol heksafosfat. Neuberg (1908) telah mengusulkan bahwa rumus molekul asam pitat adalah $C_6H_{24}O_{27}P_6$, dengan 18 atom hidrogen disekitar inti inositol heksafosfat, dengan struktur seperti terlihat pada gambar 1.



Gambar 1 Struktur asam pitat menurut Neuberger dan Anderson.

Asam pitat banyak terdapat dalam bahan makanan terutama dalam biji-bijian dan umbi, seperti misalnya biji jagung, gandum dan padi yang kadarnya kira-kira 1%, sedangkan dalam wijen kadarnya dapat mencapai sampai 5,8%. Beberapa biji-bijian mengandung 60 — 80% total fosfor yang disimpan dalam bentuk asam pitat.

Asam pitat dalam bentuk garam-garamnya merupakan penyusun berbagai jaringan tanaman yang umum. Adanya garam-garam tersebut dalam bahan makanan membuktikan bahwa asam pitat dapat mengurangi ketersediaan mineral-mineral esensial. Hal ini sebagai akibat interaksi antara asam pitat dengan beberapa macam kation-kation membentuk senyawa kompleks yang tak larut atau membentuk senyawa yang tidak dapat digunakan pada kondisi fisiologis. Selain itu asam pitat juga membentuk kompleks dengan protein dan lemak.

Asam pitat diketahui dapat dihidrolisis menjadi derivatnya yang mana satu atau lebih fosfor yang terikat dibebaskan. Kenyataan ini sering dimanfaatkan untuk menaikkan nilai gizi dedak padi atau bahan makanan lainnya yang mengandung asam pitat. Berbagai perlakuan seperti misalnya pemanasan, penambahan enzim phitase serta perendaman pada keadaan sedikit asam, telah dilaporkan. Pada umumnya, perlakuan tersebut mampu menghidrolisis asam pitat menjadi derivatnya sambil membebaskan fosfor anorganik.

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk menaikkan nilai gizi dedak padi dengan jalan mengurangi kadar asam pitat. Metoda yang dipilih adalah metoda yang sederhana yang mana dedak padi disimpan selama beberapa hari dengan maksud agar enzim phitase yang terdapat di dalamnya mampu mengurangi asam pitat secara berangsur-angsur. Cara

lain adalah dengan jalan menambahkan air mendidih dan dicoba pula teknik penyinaran dengan sinar gamma.

Untuk menunjang penelitian ini, perlu diperoleh suatu metoda penetapan asam pitat yang tepat dan teliti. Dewasa ini, kandungan asam pitat dapat ditetapkan dengan berbagai metoda yaitu metoda kolorimetri yang mana asam pitat diendapkan sebagai garam feri pitat dan kemudian ditentukan jumlah besi atau fosfornya, atau dengan metoda lain menggunakan khromatografi cair tekanan tinggi (HPLC).

BAHAN DAN METODA

Bahan-bahan

Dedak padi varietas Cisdane yang bebas minyak diperoleh dari perusahaan AP₄ Darmaga—Bogor. Selama percobaan digunakan pereaksi berkualitas "Analytical Reagent". Semua pereaksi diperoleh dari Ajax Chemical atau E. Merck kecuali asam pitat 50% (Mitsui Toatsu Chemical, Inc, Tokyo Jepang) dan penukar anion AG 1—X8, 200—400 mesh dalam bentuk Cl⁻ (Bio Rad Laboratories).

Alat-alat

— HPLC (Hewlett Packard Model 1084 B) yang dilengkapi injeksi otomatis, detektor RI dan integrator model 790850 LC Terminal. Kolom yang digunakan adalah Lichrosorb RP 18 (Merck). diameter partikel 10 μ m dan ukuran 25 cm \times 4,6 mm.

- Spektrofotometer (Varian model 634 double beam)
- Pengocok mekanik (Griffin Flask shaker)
- Pengereng beku (Dynavac Freeze Drying Unit)
- Neraca analitik (Mettler H 80)
- Vakum dengan sistim "water jet"
- Dan alat-alat lainnya.

METODA ANALISIS

A. Metoda Graf dan Dintzis

\pm 1 gram dedak padi (5 ulangan) diekstraksi dengan 20 ml HCl 0,5 N selama 2 jam, disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm, lalu disaring dengan kertas Whatman 1 dan kemudian kertas milipore 0,5 μ m. Filtratnya ditambah air (1:4). 10 ml larutan ini dipipet ke dalam kolom resin penukar anion AG 1—X8, 200—400 mesh, Cl⁻ (0,5 gram). Kolom dicuci dengan air bebas mineral, larutan NaOH 0,125 N (1:4) dan kemudian dengan 15 ml HCl 0,1 N. Asam pitat elusi dari kolom dengan 10 ml HCl 2 N (kecepatan alir 0,4 ml/menit). 1 ml larutan dikeringkan semalam dalam vakum desikator, kemudian residunya dilarutkan dengan 1 ml NaAc 5 mM. Larutan ini siap diinjeksikan pada HPLC.

B. Modifikasi penentuan asam pitat dengan HPLC

1. Ketelitian

\pm 1 gram dedak padi (5 ulangan) diekstraksi dengan 25 ml trikloro-asetat 3% (TCA 3%) selama 1 jam,

disentrifus selama 25 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Larutan jernih di atasnya dipipet sebanyak 5 ml ke dalam kolom resin penukar anion (0,75 gram resin penukar anion AG 1—X8, 200—400 mesh. Cl⁻, setara dengan 50 mg asam pitat) dan dicuci sebelum dipakai dengan air bebas mineral. Asam pitat dielusi dari kolom dengan 5 ml HCl 2 N (kecepatan alir 4 ml/menit). Asam pitat ditampung dan dikeringkan dengan pengering beku, kemudian residunya dilarutkan dengan 5 ml NaAc 5 mM dan disaring dengan milipore 0,22 mM. Larutan ini siap untuk diinjeksikan.

Kondisi alat yang dipakai :

- volume injeksi 10 µl
- pelarut (fasa gerak)
 NaAc 5 mm
- kecepatan alir 1 ml/menit

2. Perolehan kembali (recovery)

Dedak padi ditambah dengan larutan standar yang konsentrasinya diketahui dan proses menurut seperti di atas. Semua percobaan dilakukan 5 ulangan dan asam pitat dapat dihitung kembali :

$$\frac{F - C}{S} \times 100\%$$

di mana F = konsentrasi asam pitat total yang ditentukan melalui prosedur analisis.

C = konsentrasi asam pitat semula pada contoh.

S = konsentrasi standar yang ditambahkan.

C. Pengaruh beberapa perlakuan terhadap kestabilan asam pitat

1. Pengaruh penyimpanan

Dedak padi segar disimpan di Ciawi—Bogor pada suhu kamar selama 0, 4, 10, 17 dan 30 hari. Sebelum penentuan asam pitat, dedak padi dibebaskan dari minyaknya dengan cara ekstraksi soxhlet, kemudian dedak padi bebas minyak dikeringkan pada pengeringan beku. Percobaan lain, dedak padi disimpan selama 0, 2, 5, 12, 30 dan 50 hari yang telah bebas minyak diperoleh dari perusahaan AP₄ Darmaga—Bogor. Asam pitat ditentukan seperti cara di atas.

2. Pengaruh penambahan air mendidih

Dedak padi ditambah air mendidih (1:1, w/w) dan asam pitatnya dianalisis setiap 2, 4, 8, 12 dan 24 jam.

3. Pengaruh penyinaran

Contoh yang sama disinari dengan dosis 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 Kgy di Badan Tenaga Atom Nasional (BATAN). Seluruh percobaan dilakukan di Balai Penelitian Ternak Ciawi—Bogor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Modifikasi penentuan asam pitat dengan HPLC

Metoda penentuan asam pitat yang dipilih adalah berdasarkan me-

toda Graf dan Dintzis² yang dimodifikasi. Dari hasil analisis dedak padi yang dilakukan menurut Graf dan Dintzis diperoleh asam pitat sebesar 1,06%, sedangkan metoda modifikasi diperoleh sebesar 1,64%

(Tabel 1). Hal ini jelas terlihat bahwa hasil analisis menurut metoda Graf dan Dintzis lebih kecil (sekitar 35%) bila dibandingkan terhadap metoda modifikasi.

Tabel 1. Analisis asam pitat dalam dedak padi menurut metoda yang belum dan yang sudah modifikasi

Ulangan	asam pitat ^a (%)	asam pitat ^b (%)	asam pitat ^c (%)
1	0,90	0,40	1,64
2	0,85	0,39	1,64
3	1,10	0,40	1,65
4	1,20	0,43	1,63
5	1,25	0,39	1,64
Rata-rata ± simpangan baku	1,06 ± 0,15	0,40 ± 0,01	1,64 ± 0,01

^aMetoda Graf dan Dintzis

^bAsam pitat yang terelusi dari metoda Graf dan Dintzis

^cMetoda modifikasi

Berdasarkan hasil yang diperoleh ternyata metoda yang dimodifikasi cukup baik. TCA 3% dapat dipakai sebagai pengganti HCL 0,5 N. Penyaringan dengan kertas Whatman, millipore, pencucian kolom menggunakan NaOH 0,125 N dan HCL 0,1 N dapat ditiadakan. Pencucian dengan HCL 0,1 N mengakibatkan terelusnya asam pitat dari kolom. Hal ini telah diuji dengan menggunakan khromatograf larutan pencucian itu yang memperlihatkan adanya asam pitat seperti pada gambar 2. Berdasarkan perhitungan asam pitat terelusi sebesar 24,5%. Modifikasi dengan menggunakan sistim vakum yang dihubungkan dengan kolom penukar anion memberikan

kecepatan aliran yang lebih tinggi (4 ml/menit), berarti waktu analisis lebih cepat.

Metoda modifikasi tersebut diuji lebih lanjut dengan cara menentukan ketelitian dan persentase perolehan kembali (recovery). Hasil ketelitian analisis asam pitat pada dedak padi menggunakan cara kerja yang sudah dimodifikasi diperlihatkan pada tabel 2. Metoda tersebut ternyata memberikan ketelitian yang cukup baik dan hasil recovery dari contoh yang hanya berisi larutan standar adalah 100%, sedangkan hasil recovery dari contoh yang diperkuat dengan larutan standar adalah sebesar 80 — 102%

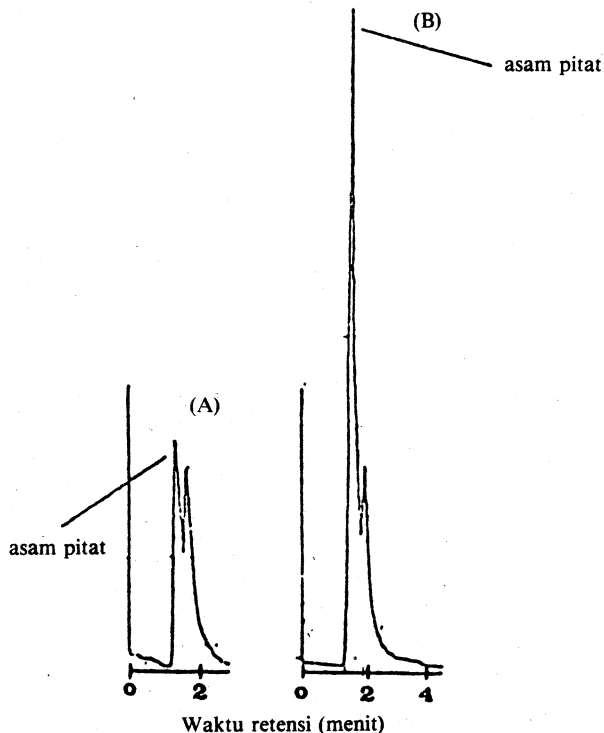
C. Pengaruh beberapa perlakuan terhadap kestabilan asam pitat

1. Pengaruh penyimpanan

Pengaruh penyimpanan dedak padi terhadap kestabilan asam pitat dilakukan di dua tempat yang berbeda, yaitu di Ciawi—Bogor dan Darmaga—Bogor menggunakan dedak padi segar dari varitas yang sama. Semua dedak padi disimpan pada suhu kamar, sedangkan ke dua tempat penyimpanan terpisah cukup jauh (kurang lebih 25 km) di mana letak Ciawi sedikit lebih tinggi dan curah

hujan lebih banyak daripada Darmaga—Bogor. Hasil percobaan dari penyimpanan di Ciawi diperlihatkan pada Gambar 3A. Dalam hal ini kadar asam pitat ditetapkan dengan HPLC yang dimodifikasi.

Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar asam pitat dalam dedak padi selama penyimpanan mengalami penurunan yang mana penyimpanan selama 10 hari menyebabkan turunnya asam pitat sebesar 62%, penyimpanan selama 17 hari turun 56%, sedangkan penyimpanan 30 hari turun 55%.



**Gambar 2. (A) Kolom yang dielusi dengan HCL 0,1 N
(B) Kolom yang dielusi dengan HCL 2 N**

Tabel 2. Ketelitian dan recovery analisis dedak padi menurut cara kerja yang dimodifikasi

Ulangan	Contoh yang Dianalisis*	Asam Pitat (%)	Recovery (%)
1	dedak padi	0,22	
2		0,25	
3		0,24	
4		0,21	
5		0,20	
Rata-rata ± simpangan baku larutan standar (0,20 ml, 50%)		0,22 ± 0,02	
1		0,40	100
2		0,45	113
3		0,33	83
4		0,37	93
5		0,45	113
Rata-rata ± simpangan baku dedak padi + larutan standar (0,20 ml, 50%)		0,40 ± 0,05	100
1		0,55	83
2		0,51	73
3		0,56	85
4		0,52	75
5		0,54	80
Rata-rata ± simpangan baku dedak padi + larutan standar (0,30 ml, 50%)		0,54 ± 0,02	80
1		0,87	108
2		0,87	108
3		0,83	102
4		0,81	98
5		0,79	95
Rata-rata ± simpangan baku		0,83 ± 0,03	102

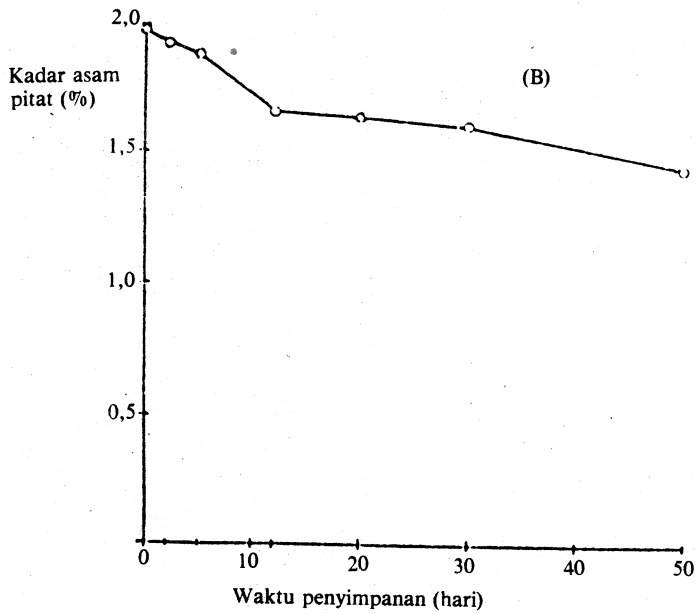
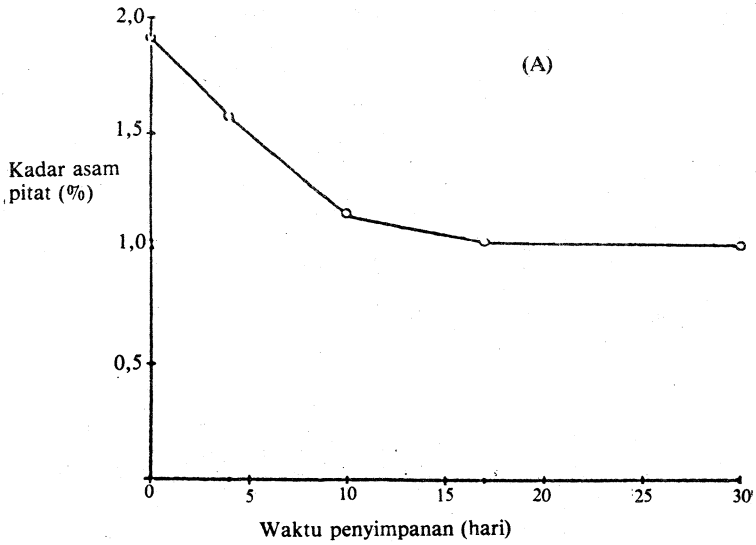
* dedak yang sudah disimpan

Penyimpanan yang dilakukan di Darmaga—Bogor, hasilnya diperlihatkan pada Gambar 3B. Bila pengaruh penyimpanan kedua lokasi dibandingkan, maka terlihat bahwa penyimpanan di Ciawi lebih efektif dibandingkan dengan penyimpanan di Darmaga. Mengingat bahwa kedua tempat berbeda dalam hal letak ketinggian, curah hujan dan dengan sendirinya kelembaban, maka nampaknya kestabilan asam pitat dalam

dedak padi dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Diduga bahwa pada tempat yang lembab terjadi proses hidrolisis yang lebih banyak, sehingga karena pengaruh enzim phtase, mampu menurunkan asam pitat lebih efektif.

2. Pengaruh penambahan air mendidih (1:1, w/w)

Hasil percobaan seperti pada Gambar 4, terlihat bahwa pada 4 jam

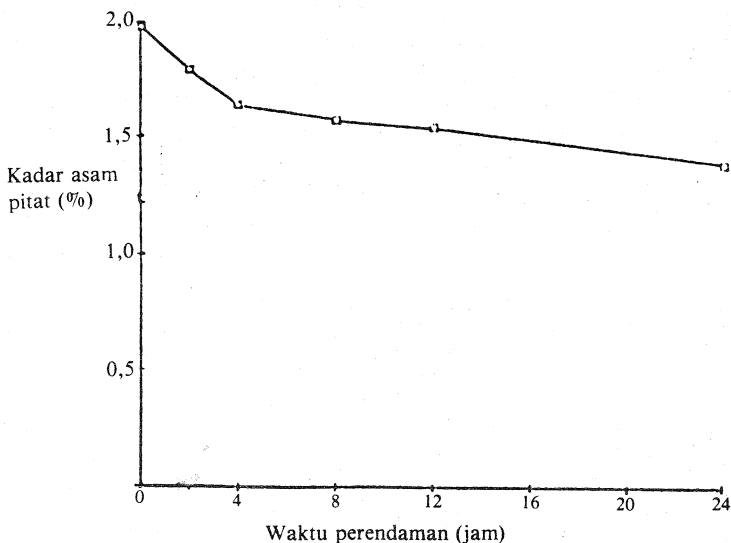


Gambar 3A. Pengaruh penyimpanan dedak padi di Ciawi Bogor pada suhu kamar
3B. Pengaruh penyimpanan dedak padi di Darmaga Bogor pada suhu kamar.

pertama diperoleh grafik penurunan yang lebih tajam dibandingkan pada 8 sampai 24 jam. Hal ini dapat disebabkan antara lain oleh faktor panas yang mempercepat proses hidrolisis asam pitat. Bila dibandingkan terhadap percobaan sebelumnya, dapat disimpulkan bahwa penambahan air panas akan menyebabkan penurunan yang lebih efektif daripada penyimpanan, yang mana pada perendaman selama 24 jam dapat menurunkan asam pitat sebesar 30% yang sebanding dengan penyimpanan 10 hari. Selanjutnya, bila dibandingkan dengan hasil percobaan Tangendjaja maka nampak bahwa perendaman selama 24 jam pada pH sedikit asam (4,0) dan suhu bervariasi (30—50°) mampu menurunkan asam pitat sebesar kira-kira 70%. Suhu yang lebih tinggi (37°, 50° dan 55° C) agaknya hanya berpengaruh

menurunkan asam pitat pada saat-saat awal (0 — 5 jam) di mana kadar asam pitat turun sampai 60%, kemudian kadar ini perlahan-lahan turun sampai 70% dalam waktu 24 jam. Pada pH asam yang lebih tinggi (5,1) diperoleh penurunan sebesar 70% selama 24 jam, tetapi penurunan tersebut nampak lebih lambat pada suhu 55°C.

Dari berbagai data di atas, dapat disimpulkan bahwa efek perendaman terhadap penurunan kadar asam pitat sangat dipengaruhi oleh pH. Proses penurunan tersebut dipercepat oleh panas. Pada penambahan air panas (pH netral), penurunan asam pitat tidaklah sebaik pada pH sedikit asam. Walaupun demikian, perlu diperhatikan bahwa pada pH asam, berbagai mineral mudah larut dan hilang bersama larutan perendam.



Gambar 4. Pengaruh penambahan air mendidih (1 : 1,1,w/w) dan dibiarkan dingin selama satu hari.

3. Pengaruh penyinaran dedak padi

Kestabilan asam pitat terhadap penyinaran sinar gamma belum pernah dilakukan sebelumnya. Berdasarkan hasil percobaan (Gambar 5) nampak bahwa terdapat hubungan yang linier antara turunnya kadar asam pitat dengan dosis penyinaran. Dari percobaan yang dilakukan, penyinaran dengan dosis 10 Kgy dapat mengurangi kadar asam pitat sebesar 29%. Bila dibandingkan dengan percobaan sebelumnya (penyimpanan dan perendaman dengan air mendidih), penyinaran dengan sinar gamma yang memerlukan teknologi tinggi tidaklah dapat dikatakan efektif.

KESIMPULAN

Berdasarkan pembahasan data yang diperoleh dapat diambil beberapa kesimpulan :

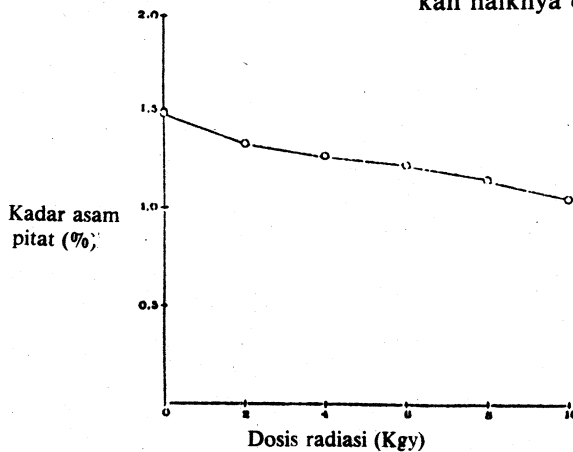
1. Bila kedua metoda dibandingkan, metoda penentuan asam pitat dengan HPLC menurut Graf dan Dintzis dapat disederhanakan dengan cara menghilangkan

beberapa tahap serta mempercepat elusi kolom dengan bantuan vakum, sehingga diperoleh metoda modifikasi yang lebih cepat. Prosedur ini memberikan ketelitian dan recovery yang baik.

2. Penyimpanan dedak padi dan penambahan air mendidih yang dibiarkan dingin selama 24 jam dapat menyebabkan turunnya kadar asam pitat. Penggunaan sinar gamma juga dapat menurunkan kadar asam pitat, tetapi cara ini tidak lebih baik daripada kedua teknik perlakuan di atas.

SARAN

Penyimpanan dedak padi dapat menurunkan asam pitat secara perlahan-lahan, walaupun demikian harus diperhatikan bahwa penyimpanan dapat menyebabkan ketengikan. Untuk mengatasi hal ini, dedak padi dapat dihilangkan lemaknya terlebih dahulu (walaupun cara ini menyebabkan naiknya ongkos produksi).



Gambar 5. Pengaruh penyinaran dedak padi

DAFTAR PUSTAKA

1. Cosgrove DJ., 1980, "Inositol phosphates", Their Chemistry, Biochemistry and Physiology, Elsevier, Amsterdam.
2. Graf and Dintziz²⁾ F.R., 1982. "Determination of phytic acid in food by high performance liquid chromatography". J. Agric Food Chem, 30, 1094—1097.
3. Latta M. and M Eskim, 1980. "A simple and rapid colorimetric method for phitate determination", J. Agric Food Chem, 28, 1313—1315.
4. Reddy N.R. and D.K. Salnkhe, 1980. "Effects of fermentation phytate phosphorus and mineral content in black gram, rice and blank gram an rice blank", J. Food Sci, 45, 1708—1711.
5. Soemadi, 1975. 'Pendayagunaan dedak''. Proc. Seminar Teknologi Pangan II, BPK Bogor.
6. Tangendjaja B, K.A. Bluckle and M. Wooton 1981. "Dephosphorilation of phytic acid in rice bran", J. Food Sci. 46, 1021—1024.
7. Erdman J.W. 1979. "Oil seeds phytates nutritional implications", J. Am Oil Chem Soc, 56, 734 — 741.
8. de Boland A.R., C.B. Garner and B.L. O Dell 1975, "Identifikasi and properties of phytates in cereal in grains and oil seed products". J. Agric Food Chem, 23(6), 1186—1189.