

**PENENTUAN KADAR RBB DALAM DYE-INULIN SECARA HPLC
MELALUI PEMBENTUKAN SENYAWA INULIN-RBB
PADA VARIASI TEMPERATUR**

SKRIPSI

*Diajukan Kepada Tim Penguji Skripsi Jurusan Kimia
Sebagai Salah Satu Persyaratan Guna Memperoleh
Gelar Sarjana Sains*



Oleh:

KHAIRANI

NIM/BP: 84249/2007

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2011**

PERSETUJUAN SKRIPSI

PENENTUAN KADAR RBB DALAM *DYE*-INULIN SECARA HPLC MELALUI PEMBENTUKAN SENYAWA INULIN-RBB PADA VARIASI TEMPERATUR

Nama : Khairani
NIM : 84249
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juni 2011

Disetujui Oleh

Pembimbing I,



Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D
NIP. 19721024 199803 1 001

Pembimbing II,



Dra. Minda Azhar, M.Si
NIP. 19641124 199112 2 001

PENGESAHAN

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Kimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

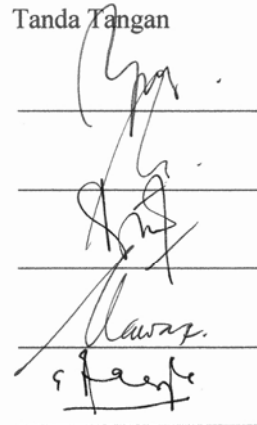
Judul : Penentuan Kadar RBB Dalam *Dye*-Inulin Secara HPLC
Melalui Pembentukan Senyawa Inulin-RBB Pada Variasi
Temperatur
Nama : Khairani
NIM : 84249
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juni 2011

Tim Penguji

Nama
Ketua : Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D
Sekretaris : Dra. Minda Azhar, M.Si
Anggota : 1. Dra. Hj. Isniyetti, M.Si
2. Dr. Mawardi, M.Si
3. Edi Nasra, S.Si, M.Si

Tanda Tangan



SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar karya saya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Padang, Juni 2011

Yang menyatakan,

Khairani

ABSTRAK

Khairani, 2011. Penentuan Kadar RBB dalam *Dye-Inulin* Secara HPLC Melalui Pembentukan Senyawa Inulin-RBB pada Variasi Temperatur.
NIM : 84249

Dye Inulin merupakan senyawa kompleks yang terbentuk antara inulin dengan RBB (*Rhemazol Brilliant Blue*). *Dye-Inulin* dapat digunakan sebagai media selektif bakteri penghasil inulinase. Penentuan kadar RBB dalam *dye-inulin* secara HPLC telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar RBB dalam *dye-inulin* secara HPLC melalui pembentukan senyawa inulin-RBB pada variasi temperatur, menentukan temperatur optimum dalam pembentukan senyawa *dye-inulin*, menentukan kondisi optimum HPLC untuk penentuan kadar RBB dalam *dye-inulin*. Penentuan kadar RBB dalam *dye-inulin* ditentukan secara HPLC pada panjang gelombang 592 nm dengan kolom ODS C18, eluen etanol : aquades (60 : 40), laju alir 1 mL/menit, dan detektor UV-Vis. Kadar RBB dalam *dye-inulin*. Kadar RBB dalam *dye-inulin* yang ditentukan secara HPLC pada variasi temperatur 40°C, 50°C dan 60°C berturut-turut adalah 18,86%; 23,14%; 9,39%. Massa RBB terbanyak yang dapat bereaksi dengan inulin dalam membentuk senyawa *dye-inulin* adalah pada temperatur 50°C dengan massa RBB yang bereaksi membentuk *dye-inulin* adalah 0,1157 gram.

Kata kunci : RBB, *dye-inulin*, *High Performance Liquid Chromatography*

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Batasan Masalah	3
D. Tujuan Penelitian	4
E. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Umbi Dahlia.....	5
B. Inulin	8
1. Struktur Inulin	9
2. Sifat Inulin.....	10
3. Sumber Inulin.....	12
4. Manfaat Inulin.....	14
C. Rhemazol Brilliant Blue (RBB)	15
D. Penentuan Kadar RBB dalam <i>Dye- Inulin</i> Secara HPLC	16

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian	24
B. Objek Penelitian	24
C. Alat dan Bahan	24
D. Prosedur Penelitian	25
E. Teknik Analisis Data	27

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil	28
1. Ekstraksi Inulin	28
2. Pembentukan Senyawa <i>Dye</i> -inulin	28
3. Penentuan Panjang Gelombang untuk Pengukuran HPLC	28
4. Penentuan Kadar RBB dalam <i>Dye</i> -Inulin Secara HPLC	30
B. Pembahasan	32
1. Ekstraksi Inulin	32
2. Pembentukan Senyawa <i>Dye</i> -inulin	33
3. Penentuan Kadar RBB dalam <i>Dye</i> -Inulin Secara HPLC	36

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan	40
B. Saran	40

DAFTAR PUSTAKA	41
----------------------	----

LAMPIRAN.....	43
---------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan Inulin pada Bahan Pangan Manusia.....	13
2. Massa <i>Dye</i> -inulin yang Dibentuk pada Variasi Temperatur	28
3. Rata-rata Luas Puncak Larutan Standar RBB	31
4. Rata-rata Luas Puncak Sampel <i>Dye</i> -inulin dari Spektrum HPLC.....	36
5. Persentase RBB yang bereaksi dalam <i>Dye</i> -inulin	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Umbi Dahlia	6
2. Bunga Dahlia	7
3. Struktur Inulin	9
4. Kelarutan Inulin Dalam Air pada Variasi Temperatur	12
5. Struktur Rhemazol Brilliant Blue (RBB)	15
6. Diagram Skematik Sistem Kromatografi Cair	18
7. Diagram Penyuntikan Sampel pada HPLC	20
8. Instrumen HPLC.....	22
9. Spektrum UV-Vis Inulin dan RBB	29
10. Spektrum UV-Vis <i>Dye</i> -Inulin	29
11. Spektrum HPLC <i>Dye</i> -Inulin.....	30
12. Inulin	33
13. Kurva Massa <i>Dye</i> -inulin yang Dibentuk pada Variasi Temperatur	34
14. <i>Dye</i> -Inulin.....	34
15. <i>Dye</i> -inulin pada suhu reaksi 40°C, 50°C, 60°C	35
16. Kurva Standar Larutan RBB	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Ekstraksi Inulin dari Umbi Dahlia.....	43
2. Skema Kerja Sintesis Senyawa <i>Dye</i> -Inulin	44
3. Skema Kerja Pengukuran Sampel dengan HPLC	45
4. Hasil Identifikasi Herbarium Bunga Dahlia	46
5. Bunga Dahlia dan Umbi Dahlia	47
6. Proses Ekstraksi Inulin dari Umbi Dahlia	48
7. Hasil Sintesis Senyawa <i>Dye</i> -Inulin	51
8. Perhitungan Penentuan Kadar RBB dalam <i>Dye</i> -Inulin secara HPLC	52
9. Spektrum HPLC Larutan Standar RBB.....	55
10. Spektrum HPLC <i>Dye</i> -Inulin untuk Menentukan Perbandingan Eluen dalam Menentukan Kadar RBB dalam <i>Dye</i> -Inulin	57
11. Spektrum FTIR Sampel <i>Dye</i> -Inulin	59
12. Spektrum FTIR Inulin	60

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan hanya bagi Allah SWT yang Maha memiliki ilmu dan Maha luas ilmu-Nya yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Shalawat serta salam tidak lupa selalu tercurah kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW.

Skripsi ini berjudul **“Penentuan Kadar RBB Dalam Dye-Inulin Secara HPLC Melalui Pembentukan Senyawa Inulin-RBB Pada Variasi Temperatur”**. Skripsi ini diajukan untuk memenuhi persyaratan menyelesaikan program Sarjana Sains Strata Satu (S1) Program Studi Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Kelancaran kegiatan penelitian dan penulisan skripsi ini, tentunya tidak terlepas dari bantuan, bimbingan, dan dorongan dari berbagai pihak baik secara moril maupun materil. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D sebagai dosen pembimbing I dan Ibu Dra. Minda Azhar, M.Si sebagai dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikirannya, serta kesabarannya untuk membimbing penulis dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Ibu Dra. Iryani, M.S sebagai Penasehat Akademik yang telah memberikan pengarahan serta nasehat yang berguna bagi penulis.
3. Bapak Drs. Zul Afkar, M.S, sebagai Ketua Jurusan Kimia dan Bapak Drs. Nazir K.S, M.Pd sebagai Ketua Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.
4. Ibu Dra. Hj. Isnietti, M.Si, Bapak Dr. Mawardi, M.Si, dan Bapak Edi Nasra, S.Si, M.Si, sebagai dosen penguji yang telah memberi masukan dan saran di awal penelitian dan di dalam penulisan skripsi ini.
5. Pimpinan dan karyawan laboratorium Kimia FMIPA UNP yang telah menyediakan fasilitas dan memberikan bantuan selama penelitian.
6. Seluruh staf pengajar di Jurusan Kimia FMIPA UNP.

7. Orang tua penulis yang sangat berjasa dalam hidup penulis dan tidak pernah berhenti memberikan motivasi dan semangat untuk kemajuan penulis.
8. Teman-teman yang telah memberikan bantuan selama ini.

Semoga segala amal baik Bapak/Ibu semua diterima oleh Allah SWT serta mendapatkan pahala besar dari-Nya, Amin. Melalui skripsi ini penulis berharap, skripsi ini dapat menjadi sumbangan khasanah ilmu pengetahuan baru bagi pembaca dan dapat sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

Padang, Juni 2011

Penulis

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Inulin merupakan polimer alami yang terdiri dari monomer-monomer fruktosa yang banyak digunakan dalam industri makanan, minuman dan farmasi. Monomer-monomer tersebut dihubungkan dengan ikatan β -2,1-fruktosilfruktosa. Pada ujung terminal polimer inulin dapat terikat glukosa dengan ikatan α -1,2 (Franck,2003:443). Inulin banyak terkandung pada umbi bunga dahlia yaitu sekitar 65,70% berat kering (Rukmana,2000:11). Bunga dahlia merupakan bunga indah yang memiliki beberapa warna mulai dari warna putih, merah, kuning, jingga, sampai kombinasi beberapa warna.

Inulin dapat dihidrolisis menjadi monomernya yaitu fruktosa. Fruktosa merupakan pemanis alternatif alami yang aman dibanding sukrosa. Hal ini disebabkan karena fruktosa mempunyai efek yang bermanfaat pada pasien diabetes, menaikkan penyerapan zat besi pada anak-anak dan mempunyai kapasitas manis yang lebih tinggi (Singh, 2006)

Untuk mengubah inulin menjadi monomer-monomernya dapat dilakukan dengan cara menghidrolisisnya menggunakan katalis enzim yaitu inulinase. Sebagai sumber inulinase dapat diperoleh dari tumbuhan dan mikroba seperti bakteri. Cara untuk menentukan bakteri penghasil inulinase adalah dengan menggunakan media selektif. Agar bakteri penghasil inulinase ini dapat tumbuh dalam media, maka sebagai sumber nutrisinya diberikan

senyawa *dye*-inulin berwarna biru yang merupakan hasil reaksi dari inulin dengan Rhemazol Brilliant Blue (RBB). Jika kemudian warna biru itu memudar akibat dimetabolisme inulin oleh bakteri, maka bakteri yang ada disekitar warna biru pudar dalam media tersebut adalah bakteri penghasil inulinase.

Beberapa kondisi reaksi perlu diperhatikan dalam mereaksikan inulin dengan RBB, karena akan mempengaruhi massa *dye*-inulin yang dihasilkan. Faktor-faktor yang perlu diperhatikan diantaranya adalah temperatur dan konsentrasi inulin yang digunakan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kadar RBB dalam *dye*-inulin dengan menggunakan beberapa variasi temperatur sintesis *dye*-inulin. Kemudian kadar RBB tersebut ditentukan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Penentuan kadar RBB pada *dye*-inulin menggunakan HPLC merupakan suatu cara yang akurat dan cepat. HPLC menggunakan kolom dengan diameter yang kecil umumnya 2-8 mm dan ukuran partikel penunjang 50 μ m. Sementara itu laju alir dipertinggi dengan tekanan yang tinggi. HPLC lebih menguntungkan jika zat yang akan dipisahkan tidak mudah menguap.

Tsuen Ih Ruo, dkk (1991), menentukan kandungan inulin dalam buah-buahan menggunakan HPLC dengan detektor pulsa amperometer, R. Dall'Amico, dkk (1995), menentukan kadar inulin dalam plasma dan urin menggunakan *reversed phase* HPLC menggunakan HCl dan asetronitril sebagai fasa gerak dan kolom C18 sebagai fasa diam. R. Marsilio, dkk (2000)

juga telah melaporkan penentuan inulin dalam buah-buahan dengan HPLC menggunakan detektor *light-scattering*. Angela Zuleta, dkk (2001) menentukan kadar inulin menggunakan *anion exchange* HPLC dengan air sebagai fasa geraknya dan refraktif indeks sebagai detektor.

Dari semua penelitian di atas telah dapat menentukan kadar inulin dengan baik. Namun penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin dengan cara mereaksikan inulin dengan RBB menggunakan HPLC belum pernah dilaporkan sebelumnya.

B. PERUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang di atas maka yang menjadi masalah dalam penelitian ini adalah berapakah kadar RBB dalam *dye*-inulin yang diukur secara HPLC melalui pembentukan senyawa inulin-RBB pada variasi temperatur?

C. BATASAN MASALAH

Sesuai dengan tujuan penelitian maka masalah di atas perlu dibatasi yang meliputi hal-hal sebagai berikut :

- a. Inulin yang digunakan diekstrak dari umbi dahlia segar
- b. Variasi temperatur pembentukan *dye*-inulin yang digunakan adalah 40, 50 dan 60°C
- c. Kolom yang digunakan dalam HPLC adalah *octadecylsilane* (ODS C18)

D. TUJUAN PENELITIAN

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk :

- a. Menentukan kadar RBB dalam *dye*-inulin pada variasi temperatur.
- b. Menentukan temperatur optimum dalam pembentukan senyawa *dye*-inulin
- c. Menentukan kondisi optimum HPLC untuk penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin.

E. MANFAAT PENELITIAN

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi tentang temperatur yang menghasilkan kadar RBB paling tinggi dalam *dye*-inulin pada pembentukan senyawa *dye*-inulin.
2. Memberikan kontribusi pada perkembangan IPTEK dalam bidang kimia khususnya kimia analitik yaitu memberikan cara untuk menentukan kadar RBB dalam *dye*-inulin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. UMBI DAHLIA

Dahlia merupakan bunga hias berupa tumbuhan tahunan yang tegak. Tumbuhan ini berasal dari pegunungan Meksiko. Di Eropa budidaya tanaman dahlia dimulai tahun 1789, dari *Royal Botanical Garden* di Madrid, Spanyol dan menyebar ke seluruh Eropa Barat. Walaupun perkembangannya sangat lambat, pada tahun 1841 sudah terdapat 1.200 varietas. Sumber genetik tanaman dahlia yang pertama kali ditemukan adalah *Dahlia variabilis*, tetapi setelah dilakukan penyeleksian dan kawin silang dihasilkan tanaman dahlia dengan tipe-tipe baru seperti *Dahlia hybrida* (Rukmana,2000:12).

Klasifikasi botani tanaman dahlia yang digunakan pada penelitian ini menurut Nurainas, Herbarium Universitas Andalas (ANDA), 2011 adalah sebagai berikut:

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Famili	: <i>Asteraceae</i>
Genus	: <i>Dahlia</i>
Spesies	: <i>Dahlia variabilis</i> (Willd)

Tanaman dahlia yang dibudidayakan terdiri atas dahlia pohon yang tingginya bisa mencapai beberapa meter dan berupa tanaman perdu (tanaman

berkayu namun tetap rendah). Bunga dahlia memiliki warna: putih, kuning, jingga, violet, merah, ungu, atau campurannya. Diameter bunga terkecil sekitar 5 cm sedangkan yang terbesar sekitar 30 cm (<http://www.ristek.go.id>).

Dahlia didatangkan ke Jawa Barat dari negeri Belanda pada masa penjajahan di abad 19 (<http://www.ristek.go.id>). Penyebaran tanaman dahlia pertama kali dibawa oleh orang-orang Belanda pada zaman kolonialisasi tepatnya di daerah Lembang dan Cianjur (Jawa Barat). Tanaman ini berkembang sampai ke berbagai daerah sentral bunga potong di wilayah Nusantara. Tanaman dahlia ini dapat dikembangkan di dataran menengah sampai dataran tinggi atau pegunungan (Rukmana,2000:12-31).

Tanaman dahlia terdiri atas umbi, batang, daun, bunga, buah dan biji. Umbi dahlia memiliki tekstur kulit tebal berwarna putih kekuning-kuningan sampai kecoklatan, daging umbi tebal, berwarna putih atau bening dan mata tunas akan tumbuh menjadi batang baru.



Gambar 1. Umbi Dahlia



Gambar 2. Bunga Dahlia

Tanaman dahlia tumbuh dengan membentuk rumpun umbi akar pada bagian dasar dari batangnya. Perbanyakan tanaman ini dapat dilakukan dengan biji atau benih, pemotongan atau stek, dan pembagian umbi akar. Umbi akar adalah akar yang jaringannya berubah bentuk menjadi tebal dan berubah fungsi sebagai tempat penyimpanan cadangan makanan. Dalam satu rumpun tanaman dahlia dihasilkan umbi sebanyak 2-5 kg tergantung pada varietas dan kesuburan tanaman tersebut. Umbi akar dahlia mengandung 80% air dan 20% padatan, padatan ini tersusun kira-kira 85% bahan penghasil gula yang disebut inulin dan bahan berselulosa.

Nilai komersial tanaman dahlia tidak hanya terletak pada bunganya, tetapi juga pada umbinya. Umbi dahlia dapat dijadikan bahan baku industri gula cair atau sirup fruktosa. Komposisi umbi dahlia terdiri dari inulin, abu, protein, air dan bahan lainnya dengan kandungan inulinnya tiap 100 gram umbi dahlia mencapai 65,70%. Kandungan inulin dari umbi dahlia berbeda untuk setiap varietas dan tempat tumbuhnya.

B. INULIN

Inulin dideskripsikan dalam British Pharmacopeia 1980 sebagai bubuk putih yang bersifat amorf, tidak berbau, higroskopik, agak larut dalam air tetapi sangat larut dalam air panas dan agak larut dalam larutan organik.

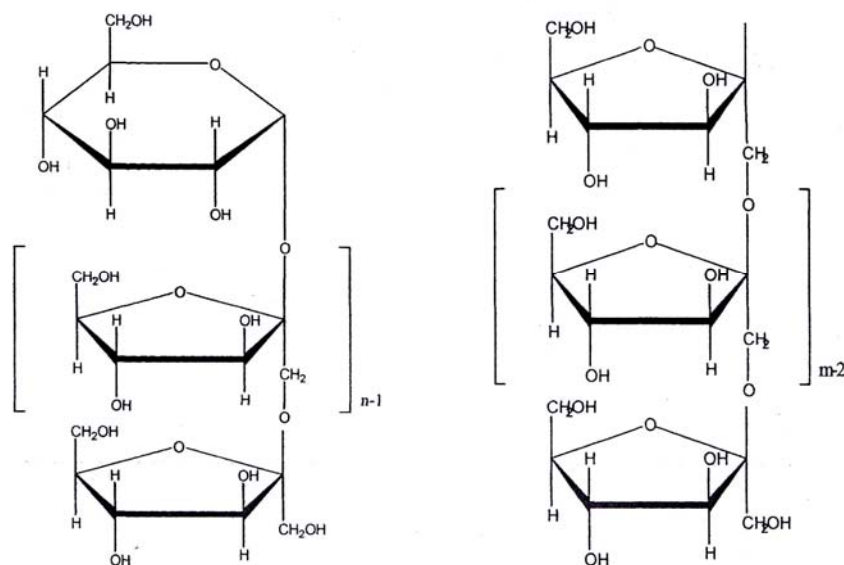
Inulin terdapat di sejumlah varietas tanaman dan di sebagian bakteri dan jamur. Tanaman yang mengandung inulin (sejenis oligofruktosa) terutama termasuk dalam *Liliales*, yaitu bawang perai, bawang bombay, bawang putih dan asparagus, atau termasuk dalam *Compositae*, seperti *Jerusalem artichoke*, dahlia, *yacon*, dan *chicory*. Inulin berfungsi sebagai penyedia karbohidrat di sebagian tanaman.

Inulin digunakan sebagai bahan tambahan makanan untuk dapat diaplikasikan sebagai substitusi lemak. Seperti hasil hidrolisisnya, oligofruktosa, inulin tidak dapat dihidrolisis atau diserap dalam saluran pencernaan dan telah didemonstrasikan dapat bertindak sebagai prebiotik

Terkadang inulin direkomendasikan bagi penderita diabetes. Inulin memiliki rasa manis yang sangat ringan, tetapi karena tidak dapat diserap oleh tubuh maka tidak akan mempengaruhi kadar gula dalam darah. Inulin dapat larut dalam air panas, tetapi hanya sedikit larut dalam air dingin atau alkohol (Bergner, 1997).

1. Struktur Inulin

Inulin merupakan polimer dari unit-unit fruktosa. Inulin memiliki ikatan linier β -(2-1)-fruktosil-fruktosa. Struktur inulin ada yang memiliki terminal glukosa dan terminal tanpa glukosa. Inulin dengan terminal glukosa disebut sebagai α -D-glukopiranosil [β -D-fruktofuranosil](n-1)-D-fruktofuranosida yang disingkat dengan GpyFn. Inulin tanpa glukosa disebut sebagai β -D-fruktopiranosil-[D-fruktofuranosil](n-1)-D-fruktofuranosida yang disingkat dengan FpyFn. Huruf n pada rumus tersebut adalah jumlah residu fruktosa pada inulin, dan py merupakan singkatan dari piranosil. Struktur dari kedua jenis inulin tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur inulin

Salah satu ciri penting dari inulin adalah Derajat Polimerisasi (DP). Derajat Polimerisasi inulin dari tanaman lebih rendah (<200) dan bervariasi

menurut jenis tanaman, kondisi cuaca, dan umur tanaman. Inulin pada tanaman biasanya ditemukan bersama-sama dengan glukosa, fruktosa, sukrosa dan beberapa oligosakarida lainnya. Inulin komersial yang didapatkan dari umbi dahlia, jerussalem artichoke dan chicory rata-rata memiliki DP 27-29 dan inulin pada bakteri memiliki DP yang tinggi berkisar antara 1.000-100.000 (Frank, 2003:442-443).

Inulin dengan derajat polimerisasi $2 < DP < 10$ dikenal sebagai oligofruktosa. Dengan demikian hidrolisis sempurna inulin menghasilkan fruktosa dan glukosa, jika diasumsikan tiap ujung molekul inulin terikat satu residu glukosa.

Derajat polimerisasi inulin tergantung pada sumber tanaman penghasil inulin. Inulin dari tumbuhan adalah suatu molekul linier yang memiliki derajat polimerisasi bervariasi mulai dari beberapa unit fruktosa sampai dengan 70 unit fruktosa. Hal ini menunjukkan bahwa inulin adalah campuran dari oligomer dan polimer (Franck, 2003:443)

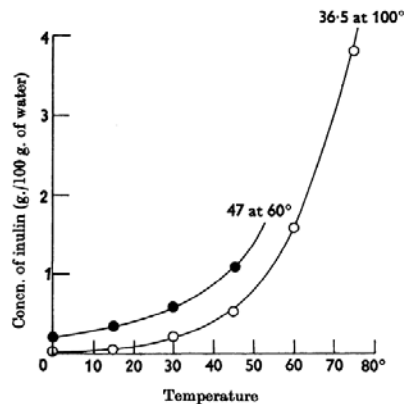
2. Sifat Inulin

Inulin memiliki sifat fungsional sebagai serat pada makanan yang dapat larut, sehingga sangat bermanfaat bagi pencernaan dan kesehatan tubuh. Inulin tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim dalam sistem pencernaan mamalia sehingga cepat mencapai usus besar tanpa mengalami perubahan struktur. Meskipun demikian, inulin dapat mengalami fermentasi akibat aktivitas mikroflora yang terdapat di usus besar, sehingga berimplikasi positif terhadap kesehatan inangnya. Dengan adanya sifat tersebut inulin dapat digunakan sebagai prebiotik (Widowati, 2005:1).

Inulin mempunyai kemampuan untuk membentuk mikrokristal apabila disebar dalam air atau susu. Kristal-kristal ini tidak mengendap di dalam mulut tetapi berinteraksi untuk membentuk tekstur lisem yang halus. Inulin dapat berfungsi sebagai emulsifier, stabilizer dan teksturizer pada konsentrasi 2-5% dalam makanan yang mengandung daging. Oleh karena itu, inulin digunakan sebagai bahan penstabil karena inulin tidak berasa, terdispersi dengan baik di dalam air dan cocok sekali dikombinasikan dengan makanan rendah lemak seperti susu skim (Niness,1999:2).

Monomer fruktosa dari inulin dapat dengan mudah menjadi difruktosa anhidrat yang merupakan hasil samping yang tidak diinginkan karena berwarna dan tidak berasa manis. Inulin dapat dihidrolisis dengan baik menjadi monomer fruktosa dalam medium asam pada pH 1-2, temperatur 80-100°C. Uji kualitas inulin dilakukan dengan penambahan resorsinol dalam suasana asam. Inulin yang ditambahkan resorsinol, dalam larutan HCl menghasilkan warna merah. Warna ini terbentuk karena reaksi fruktosa dengan resorsinol.

Sifat inulin yang penting untuk dipelajari adalah kelarutan inulin dalam air. Kelarutan inulin dalam air tergantung pada cara bagaimana inulin tersebut direkristalisasi (Phelps, 1965:41). Inulin yang direkristalisasi dengan etanol berbeda kelarutannya dibandingkan dengan inulin yang direkristalisasi dengan air. Kelarutan inulin yang dilaporkan Leite *et al.*(2004) adalah sekitar 6% pada 10⁰C dan 35% pada 90⁰C.



Gambar 4. Kelarutan inulin dalam air pada variasi temperatur. Bulatan hitam, inulin yang direkristalisasi dengan etanol, bulatan kosong, inulin yang direkristalisasi dengan air (Phelps, 1965)

Inulin sukar larut dalam air dingin dan pelarut organik seperti etanol, sebaliknya inulin mudah larut dalam air panas (Bergner, 2004:1; Yurmizar, 1989:53). Meskipun demikian, prinsip ekstraksi inulin dari tanaman adalah memanfaatkan kelarutan inulin dalam air dan etanol tersebut. Oleh sebab itu, inulin tumbuhan dapat dengan mudah diekstrak dengan air panas dan pemisahan dengan air dilakukan dengan menurunkan temperatur.

3. Sumber Inulin

Inulin terdapat pada umbi tanaman dahlia, akar chicory, dan umbi Jerusalem artichoke dalam jumlah besar (Franck, 2003). Tanaman chicory, Jerusalem artichoke tumbuh baik di Amerika Utara, sedangkan tanaman dahlia dapat tumbuh baik di dataran tinggi Indonesia. Inulin untuk kebutuhan pangan diekstrak dari tanaman tersebut. Inulin juga terdapat pada pisang, bawang perai, bawang merah, bawang putih dan gandum dalam jumlah sedikit. Kandungan inulin pada bahan pangan manusia dimuat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan inulin pada bahan pangan manusia

Sumber	Bagian yang dimanfaatkan	Kandungan zat padat kering	Kandungan inulin (% berat segar)
Bawang merah	Umbi	6-12	2-6
Jerusalem artichoke	Umbi	19-25	14-19
Chicory	Akar	20-25	15-20
Daun bawang	Umbi	15-20*	3-10
Bawang putih	Umbi	40-45*	9-16
Artichoke	Daun	14-16	3-10
Pisang	Buah	24-26	0,3-0,7
Gandum	Sereal	88-90	0,5-1*
Barley	Sereal	Na	0,5-1,5*
Dandelion	Daun	50-55*	12-15
Burdock	Akar	21-25	3.5-4,0
Camas	Umbi	31-50	12-22
Murnong	Akar	25-28	8-13
Yacon	Akar	13-21	3-19
Salsify	Akar	20-22	4-11

Keterangan : Na : data tidak tersedia, * : nilai selalu berubah (Frank, 2003)

Inulin yang terkandung pada tumbuh-tumbuhan yang umumnya digunakan untuk bahan pangan manusia terutama dari kelompok *Liliacea* seperti bawang perai, bawang merah dan bawang putih. Kelompok *Compositae* seperti Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), dahlia (*Dahlia* sp), chicory (*Cichorium intybus*) dan dandelion (*Taraxacum officinalis*) (Georgescu, 2005). Inulin tumbuh-tumbuhan merupakan *raw material* untuk produksi fruktosa skala besar pada masa yang akan datang, karena inulin tersedia dalam jumlah banyak (Ricca, 2007).

Tumbuhan Indonesia sebagai sumber inulin selain tanaman dahlia telah diteliti oleh Simanjuntak dkk (2004). Nama keluarga tumbuhan yang ditelitinya adalah *Amaryllidaceae*, *Asteraceae*, *Iridaceae* dan *Poaceae* yang diantaranya termasuk brambang utan, bakung, tutup bumi, kenikir, alang-

alang, tebu ireng, jinten dan sintrong. Kadar inulin pada tumbuh-tumbuhan tersebut kecil dibandingkan pada umbi dahlia. Kadar inulin pada umbi tanaman dahlia cukup besar yaitu 65,7% berat kering (Rukmana, 2004). Dengan demikian umbi tanaman dahlia paling potensial sebagai sumber inulin di Indonesia.

4. Manfaat Inulin

Manfaat utama inulin dapat dijadikan sebagai sirup fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS) (Ricca, 2007). FOS merupakan senyawa yang sangat penting pada industri makanan, minuman dan farmasi (Tohamy, 2006).

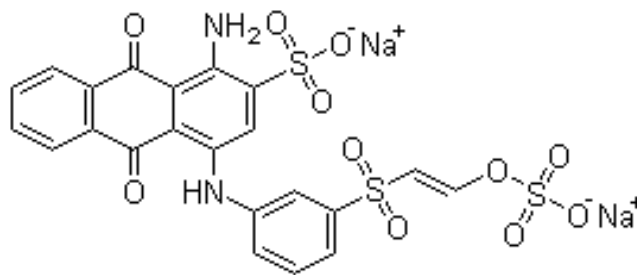
Senyawa FOS dapat digunakan sebagai pemanis atau pengganti sukrosa rendah kalori. FOS dikatakan sebagai bahan pangan fungsional karena tidak terdekomposisi oleh enzim-enzim pencernaan. FOS dapat dimanfaatkan oleh bakteri-bakteri baik yang terdapat dalam kolon atau usus besar, khususnya *Bifidobacterium* sp dan *Bacteroides* sp serta akan menghambat pertumbuhan bakteri pathogen penyebab penyakit.

Manfaat lain dari FOS yaitu dapat mengurangi metabolit toksik dan enzim yang tidak dibutuhkan, mencegah diare, meningkatkan absorpsi berbagai macam mineral (Fe, Ca, dll) di dalam saluran pencernaan, mencegah terjadinya konstipasi, mengurangi konsentrasi kolesterol di dalam serum darah dan mengurangi tekanan darah. Fungsi tambahannya yaitu memiliki efek karsinogenik (mencegah kanker), dan secara tidak langsung meningkatkan produksi nutrisi (vitamin B1, B2, B6, B12, asam nikotinat, dan asam folat) serta menstabilkan kadar gula darah. Banyaknya manfaat FOS

tersebut sehingga banyak ditambahkan pada suplemen makanan, yogurt, makanan balita, dan produk pangan lainnya.

C. REMAZOL BRILIANT BLUE (RBB)

Rhemazol Brilliant Blue (RBB) merupakan salah satu senyawa pewarna organik dengan berat molekul 626,54 g/mol, dan rumus molekul $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$. Rumus struktur RBB dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur Rhemazol Brilliant Blue (RBB)
(www.chemblink.com)

RBB dapat direaksikan dengan inulin membentuk senyawa *dye-inulin* yang berwarna biru. Senyawa *dye-inulin* ini dapat digunakan sebagai media untuk mendeteksi adanya bakteri penghasil inulinase. Reaksi pembentukan *dye-inulin* (reaksi antara inulin dan RBB) adalah pembentukan senyawa kompleks. Kompleks inulin-RBB terjadi melalui interaksi antara gugus atom O dari monomer fruktosa dengan atom C pada RBB.

D. PENENTUAN KADAR RBB DALAM DYE-INULIN SECARA HPLC

Kromatografi adalah salah satu teknik dalam kimia analitik yang berkembang dengan sangat cepat dan modern. Metoda ini dapat digunakan secara luas dalam identifikasi dan penentuan konsentrasi senyawa-senyawa organik maupun anorganik.

Penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin menggunakan kromatografi merupakan salah satu cara yang cepat dan akurat. Pada metode kromatografi cair digunakan kolom tabung gelas dengan bermacam-macam diameter. Partikel dengan dimensinya yang bervariasi digunakan sebagai penunjang stasioner. Banyaknya cairan pada kolom jumlahnya sedemikian rupa sehingga menghasilkan sedikit tekanan untuk memelihara aliran fase gerak agar seragam. Pemisahan dengan metode ini memerlukan waktu yang lama. Salah satu usaha yang dilakukan agar pemisahan dengan kromatografi cair ini berlangsung cepat adalah dengan pengurangan ukuran partikel penunjang stasioner, akan tetapi hal ini tidak menguntungkan (Khopkar, 1990:167-168).

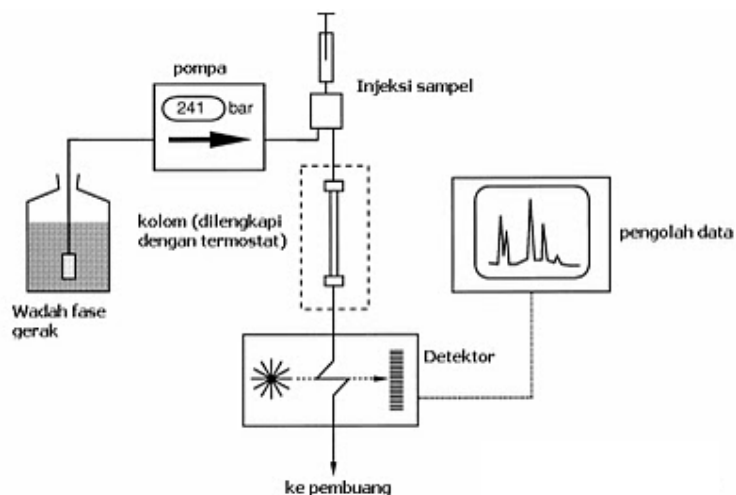
Kromatografi cair kinerja tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) berbeda dengan kromatografi cair. HPLC menggunakan kolom dengan diameter yang kecil umumnya 2-8 mm dengan ukuran partikel penunjang 50 μm . Sementara itu laju alir dipertinggi dengan tekanan yang tinggi. HPLC lebih menguntungkan jika zat yang akan dipisahkan tidak mudah menguap (Khopkar, 1999:168). HPLC umumnya digunakan sebagai berikut: separasi suatu senyawa organik, anorganik, polimer, senyawa kiral, senyawa yang labil dalam keadaan panas dan ion

kecil sampai makromolekul, analisa kemurnian, penentuan molekul yang bersifat netral, ionik, metoda kualitatif dan kuantitatif (Settle,1997:147).

Sampel yang digunakan pada HPLC berupa cairan, jika sampel dalam bentuk padat maka akan dilakukan proses pelarutan pada pelarut yang tepat. Banyak sampel yang dapat diinjeksikan adalah 1-100 μL umumnya 5-10 μL . Persiapan sampel melalui beberapa tahap yaitu pelarutan, prekonsentrasi, filtrasi, ekstraksi, ultra filtrasi. Waktu yang dibutuhkan untuk analisis antara 5 menit-2 jam, umumnya 10-25 menit. Preparasi setiap sampel berbeda dengan sampel lainnya, hal ini juga berhubungan dengan waktu analisisnya (Settle,1997:148).

1. Sistem Peralatan HPLC

Instrumentasi HPLC pada dasarnya terdiri atas: wadah fase gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, dan suatu komputer atau perekam. Diagram skematik sistem kromatografi cair seperti ini :



Gambar 6. Diagram skematik sistem Kromatografi cair

1) Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut.

Fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel-partikel kecil. Selain itu, adanya gas dalam fase gerak juga harus dihilangkan, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengganggu analisis.

Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) atau dengan cara bergradien (komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi) yang analog dengan pemograman suhu pada kromatografi gas. Elusi bergradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas.

Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan bufer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan

pelarut yang terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol.

Pemisahan dengan fase normal ini kurang umum dibanding dengan fase terbalik.

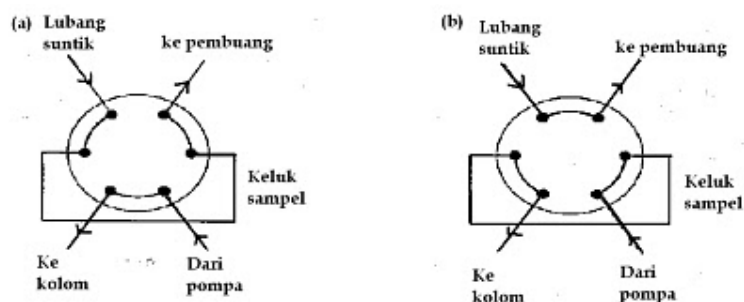
2) Pompa

Pompa yang cocok digunakan untuk HPLC adalah pompa yang harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit.

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan, dan bebas dari gangguan.

3) Tempat Penyuntikan Sampel

Sampel berupa larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal.



Posisi pada saat memuat sampel

Posisi pada saat menyuntik sampel

Gambar 7. Diagram Penyuntikan Sampel pada HPLC

4) Kolom dan Fase Diam

Ada dua jenis kolom pada HPLC yaitu kolom konvensional dan kolom mikro. Kolom merupakan bagian HPLC yang terdapat fase diam untuk berlangsungnya proses pemisahan analit. Kolom mikro mempunyai 3 keuntungan yang utama dibanding dengan kolom konvensional, yakni:

- a) Konsumsi fase gerak kolom mikro hanya 80% atau lebih kecil dibanding dengan kolom konvensional karena pada kolom mikro kecepatan alir fase gerak lebih lambat (10 -100 $\mu\text{l}/\text{menit}$).
- b) Adanya aliran fase gerak yang lebih lambat membuat kolom mikro lebih ideal jika digabung dengan spektrometer massa.
- c) Sensitivitas kolom mikro ditingkatkan karena solut lebih pekat, sehingga jenis kolom ini sangat bermanfaat jika jumlah sampel terbatas, misalnya sampel klinis.

Meskipun demikian, dalam prakteknya kolom mikro ini tidak setahan kolom konvensional dan kurang bermanfaat untuk analisis rutin. Kebanyakan fase diam pada HPLC berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzena. Permukaan silika adalah polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH).

Silika dapat dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen-reagen seperti klorosilan. Reagen-reagen ini akan bereaksi dengan gugus silanol dan menggantinya dengan gugus-gugus fungsional lain.

Octadecylsilane (ODS C_{18}) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran

yang rendah, sedang, dan tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk pelarut yang polar. Silika-silika aminopropil dan sianopropil (nitril) lebih cocok sebagai pengganti silika yang tidak dimodifikasi. Silika yang tidak dimodifikasi akan memberikan waktu retensi yang bervariasi disebabkan karena adanya kandungan air yang digunakan.

5) Detektor HPLC

Detektor pada HPLC dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu detektor universal yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif. Seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa, dan golongan detektor spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia.

Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut:

- a) mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel
- b) mempunyai sensitifitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil
- c) stabil dalam pengoperasiannya
- d) mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita
- e) signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier)
- f) tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak

Pemisahan dengan HPLC dapat dilakukan dengan fase normal (jika fase diamnya lebih polar dibanding dengan fase gerak) atau fase terbalik (jika fase diamnya kurang non polar dibanding dengan fase gerak). Instrumen HPLC dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Instrumen HPLC

Dalam menentukan kadar RBB yang terikat pada *dye*-inulin dengan menggunakan HPLC, terlebih dahulu ditentukan panjang gelombang untuk inulin, RBB dan *dye*-inulin menggunakan UV-Vis spektrofotometer. Kemudian dilanjutkan menggunakan HPLC dengan kolom ODS C₁₈ dan fasa gerak etanol dan aquades untuk penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin dengan panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya.

Data yang akan diperoleh adalah data kuantitatif dengan melihat luas daerah dari *dye*-inulin pada kromatogram HPLC, kemudian ditentukan kadar

RBB dalam *dye*-inulin dengan menggunakan kurva linear dari larutan standar RBB.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan terhadap penelitian tentang penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin secara HPLC melalui pembentukan senyawa inulin-RBB pada variasi temperatur dapat disimpulkan bahwa :

1. Kadar RBB yang terikat dalam *dye*-inulin variasi suhu 40, 50 dan 60°C dari massa RBB yang direaksikan berturut-turut adalah 18,86%; 23,14%; 9,40%.
2. Berdasarkan hasil spektrum HPLC senyawa *dye*-inulin, temperatur optimum untuk pembentukan senyawa *dye*-inulin adalah pada suhu 50°C.
3. Kondisi optimum dari HPLC untuk penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin adalah dengan menggunakan perbandingan pelarut etanol dan aquades (60 : 40) dan laju alirnya 1mL/menit.

B. SARAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan diadakannya penelitian lebih lanjut, yaitu :

1. Memvariasikan massa RBB yang digunakan dalam pembentukan senyawa *dye*-inulin.
2. Memvariasikan waktu kontak antara inulin dengan RBB dalam pembentukan senyawa *dye*-inulin.
3. Mencari kondisi optimum untuk menghilangkan gangguan atau pengotor dalam *dye*-inulin yang dihasilkan

DAFTAR PUSTAKA

- Amico, R.D.; Montini, G. (1995). Determination of inulin in plasma and urine by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 672(1)155-159
- Andyani, N.F (2001). Produksi Sirup Fruktosa dari Inulin *Dahlia Pinata* Cav secara Hidrolisis Asam. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pangan IPB. Bogor.
- Bergner, P. (2004). "Inulin". <http://www.medherb.com>. Diakses 5 April 2010
- Castro, GR; Baigori, MD; Sineriz, F (1995). A plate technique for screening of inulin degrading microorganism. *Journal of Microbiological Methods* 22:51-56.
- Franck, Anne; Leenheer, Leen De (2003). "Inulin". Email: ann.franck@orafti.com. Diakses 25 Maret 2010
- Georgescu, L.A.; Stoica, I., (2005), Syudies Concerning the Dynamic of Enzyme Hydrolyse on the Jerussalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) Inulin, The annal of the University Dunarea de jos of Galaty-no 1, *Fascicle VI-Food Technology*: 77-80.
- <http://www.ristek.go.id>. Dahlia. Diakses tanggal 2 Juli 2010.
- <http://www.chemblink.com>. RBB. Diakses tanggal 10 Juli 2010.
- <http://www.mnh20.wordpress.com>. Inulin FTIR. Diakses tanggal 29 Juni 2011.
- Khopkar, S.M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: universitas Indonesia Press. Terjemahan dari *Basic Concept of Analytical Chemistry* 1985.
- Leita, JTC; and Martinelli, P. (2004). Study of the inulin concentration by physical method. *Proceedings of the 14th internasional drying symposium Brazil* vol 8. 868-875.
- Marsilio, R.; Naturale, M.; Manghi, P.; Montini, G.; Murer, L.; Ros, M.; Bisogno, G.; Andretta, B.; Dussini, N.; Giordano, G.; Zacchello, G.; Amico, R.D., (2000), Rapid and simple determination of inulin in biological fluids by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection, *Journal of Chromatography B*, 744 (2) 241-247.