

**PENENTUAN KADAR FRUKTOSA HASIL HIDROLISIS
INULIN DENGAN DNS SEBAGAI PENGOKSIDASI**

SKRIPSI

*Diajukan kepada Tim Penguji Skripsi Jurusan Kimia untuk Memenuhi Sebagian
Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Kimia.*



RUSWANDI

1301810 / 2013

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2017**

PERSETUJUAN SKRIPSI

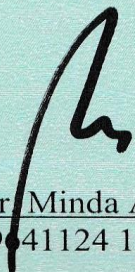
PENENTUAN KADAR FRUKTOSA HASIL HIDROLISIS INULIN DENGAN DNS SEBAGAI PENGOKSIDASI

Nama : RUSWANDI
TM / NIM : 2013 / 1301810
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

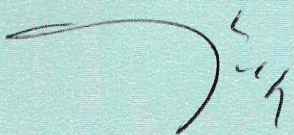
Padang, November 2017

Disetujui Oleh:

Pembimbing I,


Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si
NIP. 1941124 199112 2 001

Pembimbing II,


Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D
NIP. 19810622 200312 1 001

PENGESAHAN

*Dinyatakan Lulus Setelah Dipertahankan di Depan Tim Penguji Skripsi
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang*

Judul : **Penentuan Kadar Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin
dengan DNS sebagai Pengoksidasi**

Nama : RUSWANDI

TM / NIM : 2013 / 1301810

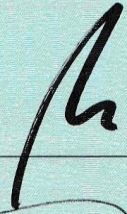
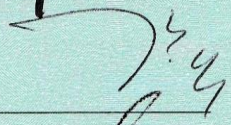
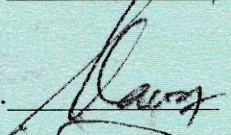
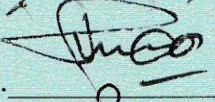
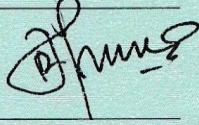
Program Studi : Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, November 2017

Tim Penguji

No	Jabatan	Nama	Tanda Tangan
1	Ketua	Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si	1. 
2	Sekretaris	Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D	2. 
3	Anggota	Dr. Mawardi, M.Si	3. 
4	Anggota	Drs. Iswendi, M.S	4. 
5	Anggota	Dra. Iryani, M.S	5. 

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : RUSWANDI
TM / NIM : 2013/1301810
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Judul Skripsi : Penentuan Kadar Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin dengan DNS sebagai Pengoksidasi

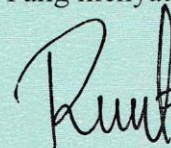
Dengan ini saya menyatakan bahwa:

1. Karya tulis/skripsi ini adalah hasil dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik (sarjana) baik di UNP maupun perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis/skripsi ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan pihak lain kecuali arahan tim pembimbing.
3. Pada karya tulis/skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain kecuali tertulis dengan jelas dicantumkan pada daftar pustaka.
4. Karya tulis/skripsi ini sah apabila telah ditandatangani **Asli** oleh tim pembimbing dan tim penguji.

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran di dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima **Sanksi Akademik** berupa pencabutan gelar akademik yang telah diperoleh karena karya tulis/skripsi ini, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Padang, November 2017

Yang menyatakan,



RUSWANDI

ABSTRAK

RUSWANDI : Penentuan Kadar Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin dengan DNS Sebagai Pengoksidasi.

Kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin dapat ditentukan secara mudah dan praktis dengan reagen DNS. Tujuan penelitian adalah untuk menentukan kondisi optimum reaksi antara fruktosa dengan reagen DNS dan untuk menentukan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrometri UV-Vis dan HPLC, Fase gerak pada HPLC adalah etanol:air dengan berbagai perbandingan. Kolom yang digunakan adalah ODS C-18, C-8, dan CLC-Sil. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS memiliki λ_{maks} 499 nm, volume optimum larutan fruktosa adalah 100 μL , pH optimum fruktosa adalah 4,5 dan waktu kestabilan warna DNS tereduksi pada waktu menit ke-30. Hasil analisis DNS tereduksi menggunakan HPLC tidak memberikan pemisahan yang baik pada tipe kolom ODS C-18, C-8 dan CLC-Sil dengan beberapa variasi fase gerak etanol:air, sehingga untuk pengukuran selanjutnya digunakan spektrometri UV-Vis. Kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin dengan konsentrasi 0,5 %, 1 %, dan 2,5% inulin adalah 183,6 $\mu\text{g/mL}$, 295,6 $\mu\text{g/mL}$, dan 512,6 $\mu\text{g/mL}$.

Kata Kunci : *Inulin, Inulinase, Fruktosa, DNS, HPLC, Spektrometri UV-Vis.*

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah memberi kekuatan dan kesabaran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Penentuan Kadar Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin dengan DNS Sebagai Pengoksidasi”**. Skripsi ini diajukan untuk melengkapi dan memenuhi persyaratan kelulusan dalam rangka memperoleh gelar sarjana S-1 pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, pentunjuk, arahan dan masukan yang berharga dari berbagai pihak. Untuk itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tulus kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si selaku pembimbing I sekaligus penasehat akademik.
2. Bapak Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D selaku pembimbing II.
3. Bapak Dr. Mawardi, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang dan sekaligus sebagai dosen penguji skripsi.
4. Bapak Hary Sanjaya, S.Si, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Universitas Negeri Padang.
5. Bapak Drs. Iswendi, M.S dan Ibu Dra. Iryani, M.S selaku dosen penguji skripsi.
6. Kedua Orang Tua penulis yang telah memberikan semangat serta dorongan kepada penulis dalam melakukan setiap aktivitas penelitian.
7. Teman-teman kimia tahun 2013 yang telah memberikan masukan dan dorongan kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

Semoga bantuan dan bimbingan yang telah diberikan menjadi amal shaleh bagi Bapak/Ibu serta mendapat balasan yang berlipat ganda dari Allah SWT. Atas masukan dan saran yang diberikan penulis haturkan terima kasih.

Padang, Oktober 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah.....	5
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Inulin.....	7
2.2 Enzim Inulinase.....	11
2.3 Produk Hasil Hidrolisis Inulin	16
2.4 DNS (Dinitrosalisilat)	18
2.5 Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS	19
2.6 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	20
2.7 Spektrofotometri UV-Vis.....	28
BAB III METODE PENELITIAN	33
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	33
3.2 Jenis Penelitian.....	33
3.3 Objek Penelitian	33
3.4 Alat dan Bahan.....	33
3.5 Prosedur Kerja.....	34
3.6 Teknik Analisa Data.....	41
BAB IV HASIL dan PEMBAHASAN.....	42
4.1 Optimasi Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS.....	42
4.1.1 λ_{maks} Larutan Fruktosa Dengan Reagen DNS.....	42

4.1.2 Volume optimum larutan fruktosa	43
4.1.3 Pengaruh pH Fruktosa	44
4.1.4 Waktu Kestabilan dari Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS.....	45
4.1.5 Konsentrasi Optimum Reagen DNS dengan Fruktosa yang Bereaksi. ...	47
4.2 Kondisi Analisis Fruktosa Melalui Reaksi Redoks dengan Reagen DNS Menggunakan HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>).	48
4.3 Penentuan Kurva Regresi Linear Larutan Fruktosa.	55
4.4 Analisis Kandungan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin.	56
BAB V KESIMPULAN	59
DAFTAR PUSTAKA	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur inulin	7
2. Inulin dari umbi dahlia	9
3. Struktur primer inulinase dari <i>Aspergillus awamori</i>	13
4. Posisi struktur sekunder inulinase dari <i>Aspergillus awamori</i>	14
5. Struktur tersier endoinulinase dari <i>Aspergillus ficuum</i>	15
6. Struktur fruktosa	16
7. Struktur FOS (fruktoligosakarida)	17
8. Struktur DNS.....	19
9. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS	20
10. Skema kerja HPLC.....	22
11. Instrument Spektrofotometer Uv-Vis.....	29
12. λ_{maks} larutan fruktosa dengan reagen DNS pada rentang 300-700 nm.....	42
13. Kurva hubungan antara variasi volume fruktosa terhadap absorbansi.....	43
14. Kurva hubungan pH larutan fruktosa terhadap nilai absorbansi.....	44
15. Kurva Hubungan Variasi Waktu Kestabilan Warna dari Reaksi fruktosa dengan Reagen DNS.	46
16. Kurva Hubungan Variasi Konsentrasi Reagen DNS Terhadap Nilai absorbansi dari Reaksi Fruktosa dengan reagen DNS.....	47
17. Kromatogram analisis DNS tereduksi atau fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$ dengan menggunakan kolom ODS C-18, fase gerak etanol : air, A (etanol:air ; 10:90), B (etanol:air ; 30:70), C (etanol:air ; 50:50), D (etanol:air ; 70:30), E (etanol:air ; 90:10), F (blangko). Laju alir 0,5 mL/min, $\lambda = 499 \text{ nm}$	49
18. Kromatogram analisis DNS terekduksi atau fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$ dengan menggunakan kolom C-8, fase gerak etanol : air, A (etanol:air ; 10:90), B (etanol:air ; 30:70), C (etanol:air ; 40:60), D (etanol:air ; 50:50), E (etanol:air ; 60:40), F (etanol:air ; 70:30), G (etanol:air ; 90:10), H (blangko). Laju alir 0,5 mL/min, $\lambda = 499 \text{ nm}$	52
19. Kromatogram DNS tereduksi atau analisis fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$ dengan kolom CLC-Sil, fase gerak etanol:aquades 40:60. Laju alir 1 mL/min, $\lambda = 499 \text{ nm}$, kolom CLC-Sil.	54
20. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Fruktosa.	56
21. Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS.	72
22. Variasi volume larutan fruktosa yang direaksikan dengan reagen DNS.....	74

23. Variasi pH fruktosa	76
24. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS pada pH 4,5 dengan volume optimum larutan fruktosa 100 µL.	78
25. Variasi konsentrasi reagen DNS.	80
26. Larutan standar fruktosa.....	83
27. Fruktosa hasil hidrolisis inulin.....	84

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sumber Inulin dari berbagai tumbuhan.....	8
2. Komposisi pembuatan buffer asetat pada berbagai pH.....	35
3. Komposisi pembuatan buffer Fosfat pada berbagai pH.....	35
4. Data variasi konsentrasi inulin.....	57
5. Data kandungan fruktosa hasil hidrolisis inulin.....	57
6. Volume pembuatan larutan standar fruktosa.....	67
7. Data nilai absorbansi dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS berdasarkan pada variasi volume larutan fruktosa.	74
8. Data nilai absorbansi dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS.....	76
9. Data nilai absorbansi dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS berdasarkan pada variasi waktu pengukuran absorbansi.....	78
10. Data nilai absorbansi dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS berdasarkan pada variasi konsentrasi reagen DNS.....	80
11. Data nilai absorbansi berdasarkan larutan standar fruktosa.....	83

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Mengestraksi crude enzim inulinase dari umbi dahlia	63
2. Skema kerja secara umum.....	64
3. Perhitungan	65
4. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS	72
5. Penentuan Volume Optimum Larutan Fruktosa yang Direaksikan dengan reagen DNS.	73
6. Penentuan pH optimum terhadap reaksi fruktosa dengan reagen DNS.	75
7. Penentuan Waktu Kestabilan Warna Pembentukan dari Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS.	77
8. Penentuan konsentrasi optimum reagen DNS yang direaksikan dengan fruktosa.	79
9. Penentuan kondisi optimum pemisahan senyawa fruktosa melalui reaksi redoks dengan reagen DNS menggunakan HPLC (<i>High Performance Liquid</i> <i>Chromatography</i>).....	81
10. Penentuan kurva regresi linear dari larutan standar fruktosa dengan spektronik 20 D.	82
11. Penentuan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin menggunakan spektronik 20 D.	84
12. Perhitungan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin.....	85

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan inulin di bidang industri pangan sangat pesat, khususnya pada industri minuman dan makanan. Inulin dapat dijadikan *raw material* untuk pembuatan fruktosa. Inulin merupakan polimer mengandung 2 sampai 70 unit fruktosa yang dihubungkan satu sama lain dalam rantai lurus oleh ikatan β -2,1 fruktosil-fruktosa dan mempunyai glukosa pada ujung awal rantainya (Franck dan De Leenheer, 2003). Inulin jika dihidrolisis akan menghasilkan gula pereduksi yaitunya fruktosa dan FOS (fructoligosacarida). Fruktosa mempunyai tingkat kemanisan 1,7 kali lebih manis dibandingkan sukrosa. Fruktosa dan FOS banyak dimanfaatkan pada industri makanan, minuman, dan industri obat-obatan (Raharja, 2006).

Fruktosa juga dapat dihasilkan dari hidrolisis pati. Pembuatan fruktosa dari inulin lebih menguntungkan karena hanya memerlukan satu jenis enzim yaitu enzim inulinase, sedangkan pembuatan fruktosa dari pati membutuhkan 3 enzim yaitu amilolisis pati dengan katalis α -amilase dan amiloglukosidase, diikuti dengan pengubahan glukosa ke fruktosa yang dikatalisis oleh glukosa isomerase. Proses ini menghasilkan maksimal hanya sekitar 42% fruktosa, sisanya 50% glukosa dan 8% oligosakarida. Hidrolisis inulin menggunakan katalis inulinase dapat menghasilkan 98% fruktosa (L. Zittan, 1981), sehingga pembuatan fruktosa dari hidrolisis inulin lebih efektif dan efisien dibandingkan dengan pati.

Enzim Inulinase merupakan biokatalis hidrolisis inulin menghasilkan FOS atau fruktosa. Enzim inulinase dapat dihasilkan oleh bakteri, jamur, maupun

tumbuh-tumbuhan. Enzim inulinase juga terdapat pada bakteri yang diisolasi dari umbi dahlia. FOS dihasilkan dari pemutusan β -2,1, glikosida pada bagian internal dari inulin, sedangkan fruktosa dihasilkan dari pemutusan β -2,1, glikosida pada ujung non pereduksi secara berurutan (Baston & Barna, 2013).

Kadar fruktosa atau gula pereduksi dapat ditentukan dengan beberapa cara yaitu dengan metode kolorimetri dan kromatografi. Metode kolorimetri lebih sederhana dan ekonomis namun metode ini tidak memberikan hasil yang akurat karena dapat dipengaruhi oleh karbohidrat lain dalam sampel (Wang, *et al.*, 2010), sehingga metode kromatografi lebih banyak diterapkan untuk tujuan analisis karena lebih sederhana dan memiliki sensitivitas yang tinggi. Teknik kromatografi yang digunakan adalah HPLC (*high performance liquid chromatography*). Pada penelitian ini fruktosa hasil hidrolisis inulin direaksikan dengan reagen DNS (*Dinitrosalisilat*), dimana reagen DNS (*Dinitrosalisilat*) ini awalnya berwarna kuning bereaksi dengan fruktosa akan menghasilkan warna jingga kemerahan (Kusmiati dan Agustini, 2010) yang dapat dideteksi melalui HPLC dan spektrofotometer UV-Vis. Detektor yang digunakan dalam HPLC untuk penelitian ini adalah UV-Vis dengan kolom C-18, kolom C-8, dan kolom silika. Detektor serapan UV-Vis ini dapat digunakan untuk menganalisis komponen dalam sampel dengan kadar yang sangat kecil yaitu dalam jumlah nanogram (10^{-9}).

Pada penelitian sebelumnya belum ada yang melakukan penelitian yang berkaitan dengan penentuan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin dengan HPLC, sehingga merujuk pada penelitian yang berkaitan dengan penentuan inulin dengan

HPLC yaitunya menurut R.Dall' Amico, dkk (1995), menentukan kadar inulin dalam plasma dan urin menggunakan HPLC *reversed phase*. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril - 3,2 mM HCl (60:40 v/v) pH 2,5 dan fase diam yang digunakan adalah kolom C18. Reagen yang digunakan untuk direaksikan dengan inulin adalah hydroxymethylfuraldehyde (HMF). Selain HMF ada reagen lain yang digunakan yaitu DNS (*Dinitrosalisilat*). Menurut Wang *et al*, 2010, melaporkan tentang penentuan inulin dengan menggunakan HPLC (*High performance liquid chromatography*), dimana reagen yang digunakan untuk direaksikan dengan inulin adalah reagen DNS (*Dinitrosalisilat*), dengan detektor *reflative index*, dan kolom yang digunakan adalah SCR 101C sebagai *merk* dagang yang bersifat non polar yaitu ODS 4,6 mm x 25 cm, fase gerak yang digunakan *deionzed water* pada suhu 80°C. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilaporkan di atas, peneliti tertarik untuk menentukan fruktosa hasil hidrolisis inulin menggunakan HPLC dengan reagen DNS.

DNS (*Dinitrosalisilat*) merupakan senyawa aromatis yang jika bereaksi dengan gula pereduksi akan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, yakni senyawa yang dapat menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 550 nm (Kusmiati dan Agustini, 2010). Semakin tinggi kadar gula pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisat yang terbentuk, sehingga absorbansi sampel akan semakin tinggi.

Reaksi gula pereduksi dengan reagen DNS (*Dinitrosalisilat*) merupakan reaksi redoks dimana gugus aldehyd yang bertindak sebagai pereduksi akan

teroksidasi menjadi karboksil, sedangkan DNS (*Dinitrosalisilat*) yang bertindak sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrisalisat. Apabila terdapat gula pereduksi pada sampel, maka larutan DNS (*Dinitrosalisilat*) yang awalnya berwarna kuning bereaksi dengan gula pereduksi akan menimbulkan warna jingga kemerahan. Reaksi ini berlangsung pada suasana basa dan suhu 100°C (Kusmiati dan Agustini, 2010).

Berdasarkan uraian di atas peneliti tertarik untuk menentukan kondisi optimum pada reaksi oksidasi reduksi antara fruktosa dengan reagen DNS (*Dinitrosalisilat*) serta mengujinya menggunakan spektronik 20 D dan HPLC. Kondisi analisis yang diperoleh digunakan untuk penentuan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin. Untuk itu peneliti tertarik melakukan penelitian dengan judul adalah “ *Penentuan Kadar Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin dengan DNS sebagai Pengoksidasi* ”.

1.2 Rumusan Masalah

Rumus masalah pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimana pengaruh variasi volume larutan fruktosa, variasi pH, variasi konsentrasi reagen DNS serta waktu kestabilan warna dan panjang gelombang maksimum antara fruktosa dengan reagen DNS ?
2. Bagaimana pengaruh fasa gerak pada analisis fruktosa melalui reaksi redoks dengan reagen DNS menggunakan HPLC ?
3. Bagaimana hasil analisis fruktosa hasil hidrolisis inulin menggunakan HPLC dan spektronik 20 D ?

1.3 Batasan Masalah

Agar penelitian lebih terfokus maka, batasan masalah dari penelitian ini adalah sebaga berikut:

1. Kondisi optimum hasil reaksi antara fruktosa dengan reagen DNS yang ditentukan adalah panjang gelombang maksimum, volume optimum larutan fruktosa, pH optimum, serta waktu optimum kestabilan warna yang terbentuk dan konsentrasi optimum reagen DNS dengan menggunakan alat spektronik 20 D.
2. Fasa gerak yang digunakan dengan alat HPLC adalah etanol-air dan kolom yang digunakan adalah kolom C-18, kolom C-8, dan kolom silika
3. Variasi pH fruktosa adalah 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 7; 8.
4. Konsentrasi inulin yang digunakan adalah 0,5 %, 1 %, dan 2,5 %

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah .:

1. Untuk menentukan kondisi optimum hasil reaksi antara fruktosa dengan reagen DNS.
2. Untuk menentukan kondisi optimum dalam analisis fruktosa melalui reaksi redoks dengan reagen DNS menggunakan HPLC.
3. Untuk menentukan berapa kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin yang dihasilkan.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

1. Mendapatkan kondisi optimum hasil reaksi antara fruktosa dengan reagen DNS.
2. Mendapatkan kondisi optimum analisis fruktosa melalui reaksi redoks dengan reagen DNS menggunakan HPLC.
3. Memberikan informasi kandungan fruktosa hasil hidrolisis inulin

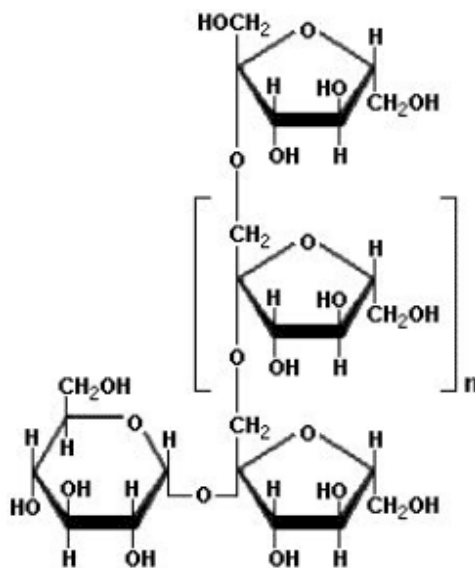
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inulin

2.1.1 Pengertian Inulin

Inulin merupakan polisakarida dengan monomer fruktosa melalui ikatan β -2-1 fruktofuranosida yang diawali oleh suatu molekul glukosa (Arisa, 2016). Ikatan β -2-1 fruktofuranosida adalah ikatan yang menghubungkan antara monomer fruktosa (Kalminskaya *et al.*, 2003). Inulin merupakan polimer alami tergolong dalam karbohidrat. Monomer inulin adalah fruktosa yang jumlah pada satu untai polimer bervariasi tergantung sumbernya. Sumber inulin banyak terdapat di tumbuhan terutama pada akar dan umbi, terkhususnya pada tanaman umbi dahlia. Antara monomer fruktosa pada inulin dihubungkan dengan ikatan (2-1) residu β -D fruktorufuranosyl (Azhar, 2009). Struktur inulin dimuat pada Gambar 1 adalah :



Gambar 1. Struktur inulin (Franck, 2003)

Formula molekul inulin dapat ditulis GF_n atau F_n. GF_n adalah fruktan dengan ujung terminal glukosa, dimana G merupakan unit glukosa terminal, F unit fruktosa, n nomor unit fruktosa atau derajat polimerisasi (DP). F_n adalah fruktan tanpa ujung terminal glukosa. Jika $2 < DP < 10$ dikenal dengan oligofruktosa. DP inulin bervariasi tergantung sumbernya.

2.1.2 Sumber Inulin

Inulin banyak terdapat pada tanaman umbi dahlia, chicory dan *jerusalem artichoke*. Sumber inulin yang banyak di Indonesia adalah umbi tanaman dahlia yang dikenal sebagai tanaman hias, yang dimanfaatkan bunganya. Kandungan inulin dalam umbi dahlia sekitar 60% (Sandiya, *et al*, 2014). Ada beberapa tanaman yang dapat menghasilkan inulin dalam jumlah sedikit terdapat pada bawang merah, bawang putih, asparagus, pisang, gandum, dan kecambah barley (Bioma, 2008). Sumber inulin dari tumbuhan dapat dimuat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sumber Inulin dari berbagai tumbuhan.

Sumber Inulin	Bagian pada tumbuhan	Kandungan Inulin (% dari Berat segar)
Bawang merah	Umbi	2-6
<i>Jerusalem artichoke</i>	Akar	14-16
Dahlia	Umbi	9-12,5
Chicory	Akar	15-20
Daun bawang	Umbi	3-10
Bawang putih	Umbi	9-16
Pisang	Buah	0,3-0,7
Gandum	Sereal	0,5-1
Barley	Sereal	0,5-1,5
Dandelion	Daun	12-15
Burdock	Akar	3,5-4
Camas	Umbi	12-22
Murnong	Akar	8-13
Yacon	Akar	3-19
Salsify	Akar	4-11

(Kango & Jain, 2011).

2.1.3 Sifat inulin

Inulin berbentuk bubuk berwarna putih, bersifat amorf, tidak berbau, dan higroskopik. Inulin tidak larut dalam air dingin, tetapi larut dalam air panas. Rumus molekul inulin adalah $C_6H_{11}O_5(C_6H_{10}O_5)_nOH$, berat molekul inulin merupakan polimer yang tergantung pada jumlah monomernya. Derajat polimerisasi inulin adalah 2 sampai 70 dan kemurnian inulin tidak boleh kurang dari 94% dan tidak boleh lebih dari 102% setelah kering. Pada konsentrasi tinggi (>25% inulin dalam air) inulin akan menyerupai gel dan berbentuk partikel-partikel gel sesudah pengadukan. Fruktan yang diaduk dengan kecepatan tinggi akan membentuk struktur berupa krim putih. Kekuatan gel yang terbentuk dari inulin bergantung pada konsentrasi inulin yang digunakan, kecepatan pengadukan, suhu, waktu, tekanan, dan alat pengaduk yang digunakan, akan tetapi pH tidak berpengaruh pada pH 4-9. Inulin dapat meningkatkan stabilitas emulsi, maka dari itu inulin dapat digunakan sebagai pengganti bahan penstabil dalam produk susu, es krim, dan saus (Franck dan De Leenheer, 2003). Foto serbuk inulin dimuat pada Gambar 2.



Gambar 2. Inulin dari umbi dahlia (Nora, 2015).

3.1.4 Proses Hidrolisis Inulin

Polisakarida jika dihidrolisis menghasilkan sejumlah monosakarida, dan oligosakarida yang terdiri dari dua sampai enam gula monosakarida. Monosakarida tidak dapat dihidrolisis menjadi bagian yang lebih kecil (Azhar, 2016). Pada kondisi sangat asam, ikatan β (2 $\rightarrow$ 1) pada tiap unit fruktosa dari inulin dapat terhidrolisis membentuk satuan unit fruktosa dan FOS. Hal ini akan terjadi lebih cepat pada keadaan pH rendah, suhu tinggi dan tingkat kekeringan bahan yang rendah. Meskipun dalam keadaan asam, tingkat hidrolisis inulin dapat ditekan pada keadaan bahan yang kering, dan disimpan pada suhu rendah ($<10^{\circ}\text{C}$). Peningkatan suhu dan suasana pH yang ekstrim dapat meningkatkan laju reaksi hidrolisis inulin (Franck dan De Leenheer, 2003).

Reaksi hidrolisis inulin juga bergantung dari jenis ikatan glikosida. Misalnya, ikatan glukosil-fruktosil 4-5 kali lebih resisten terhadap hidrolisis asam dibandingkan dengan ikatan fruktosil-fruktosil. Pemutusan ikatan glikosida pada inulin dengan penambahan air dikenal dengan reaksi hidrolisis. Reaksi ini akan menyebabkan terjadinya dekomposisi polimer inulin membentuk komponen-komponen monosakarida (Barclay, *et al.*, 2012). Inulin yang dihidrolisis akan menghasilkan fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS) dengan katalis inulinase sesuai dengan persamaan reaksi berikut :



Fruktosa yang terbentuk melalui hasil hidrolisis inulin dapat dideteksi menggunakan HPLC. Fasa gerak yang digunakan dalam penentuan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin yaitu etanol-Air. Fasa diam dapat digunakan pada HPLC

yaitu kolom ODS C-18, kolom C-8 dan kolom CLC-Sil. Detektor yang digunakan pada HPLC dalam analisis fruktosa hasil hidrolisis inulin yaitu UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm (Kusmiati dan Agustini, 2010). Hasil analisis fruktosa dapat diamati dari nilai waktu retensi dan luas puncak yang dihasilkan dalam pengukuran. Waktu retensi merupakan waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju ke detektor. Luas puncak menunjukkan konsentrasi fruktosa hasil hidrolisis.

Pada penentuan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin ditambahkan dengan reagen DNS agar terbentuk warna yang akan diinjeksikan ke dalam HPLC melalui injektor dengan bantuan *syringe*. Kemudian fasa gerak akan didorong ke dalam kolom menggunakan pompa. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen cuplikan. Komponen-komponen cuplikan tersebut akan masuk ke dalam detektor UV-Vis untuk mendeteksi komponen tersebut. Hasil yang diperoleh berbentuk kromatogram yang ditampilkan di layar.

2.2 Enzim Inulinase

Enzim inulinase merupakan biokatalis dari hidrolisis inulin yang menghasilkan fruktosa atau FOS. Enzim dapat dihasilkan oleh bakteri, jamur, maupun tumbuh-tumbuhan. FOS dihasilkan dari pemutusan β -2,1, glikosida pada bagian internal dari inulin, sedangkan fruktosa dihasilkan dari pemutusan β -2,1, glikosida pada ujung non pereduksi secara berurutan (Baston & Barna, 2013).

Enzim inulinase pertama kali diisolasi dari tanaman yang mengandung inulin yaitu dari familia Compositae. Enzim inulinase dapat diisolasi dari golongan jamur seperti *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Chrysosporium* sp, Khamir

(yeast) *Kluyveromyces* sp, *Candida* sp, *Debaromyces* dan *Saccharomyces* sp dari bakteri seperti *Arthrobacter* sp, *Flavobacterium* sp dan *Bacillus* sp (Wijarnaka, 2002). Produksi inulinase ekstraseluler dari *Bacillus polymyxa* 29, *B. Polymyxa* 722, dan *B. Subtilis* 68 berkisar pada suhu 33- 35 °C, pada pH 7, dengan waktu inkubasi selama 72 jam (Zherebtsou, 2003).

2.2.1 Struktur Inulinase

Tingkatan struktur inulinase adalah struktur primer, struktur sekunder, dan struktur tersier. Inulinase tidak mempunyai struktur quartener.

a. Struktur Primer

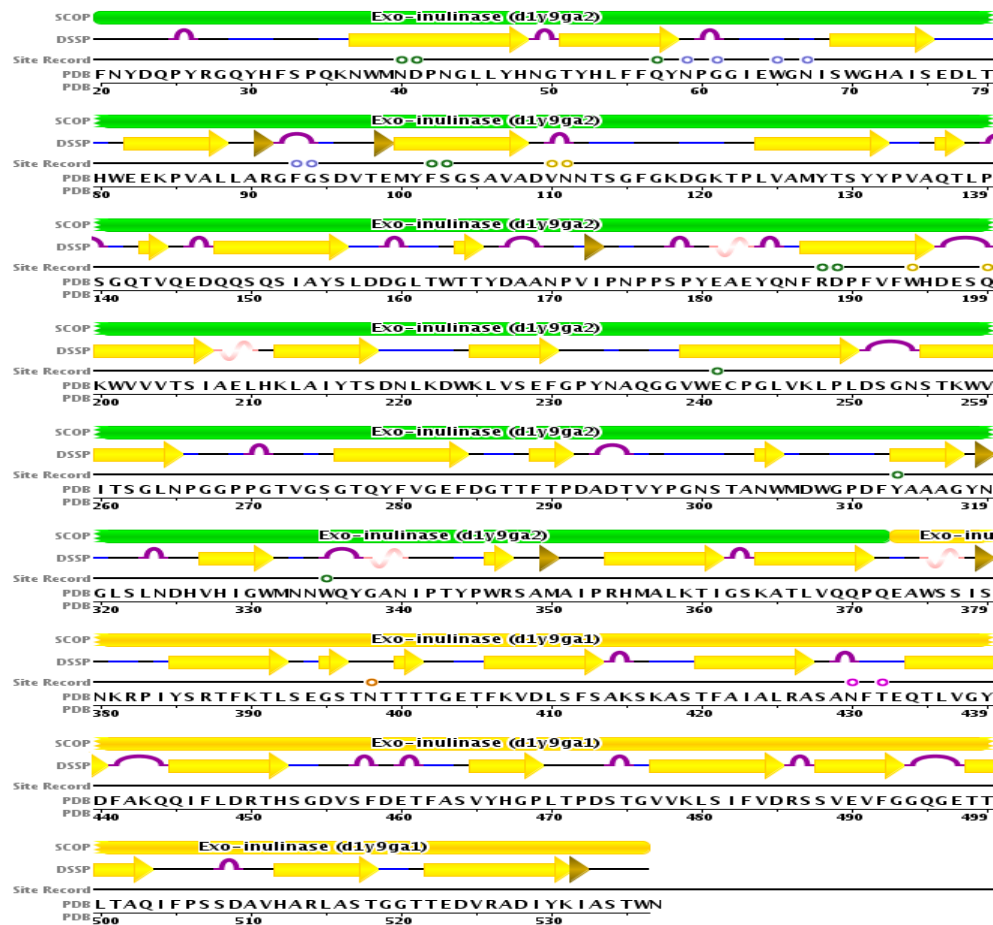
Struktur primer merupakan urutan-urutan residu asam amino yang tersusun pada suatu polipeptida. Struktur ini terbentuk melalui ikatan kovalen antara gugus α -amina pada residu asam amino yang satu dengan gugus α -karboksil pada residu asam amino yang berada di sebelahnya. Ikatan tersebut dinamakan ikatan peptida atau ikatan amida. Pada basis data *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb>), struktur primer suatu protein dapat ditulis seperti tatanan huruf, dimana pada setiap huruf merupakan kode residu asam amino penyusun protein tersebut. Gambar 3 dimuat struktur primer inulinase dari *Aspergillus awamori* yang memiliki 518 residu asam amino.

1	FNYDQPYRGQ	YHSPQKNWM	NDPNGLLYHN	GTYHLFFQYN	PGGIEWGNIS	WGHASEDLT
61	HWEEKPVALL	ARGFGSDVTE	MYFSGSAVAD	VNNTSGFGKD	GKTPLVAMYT	SYYPVAQTLF
121	SGQTVQEDQQ	SQSIAYSLDD	GLTWTTYDAA	NPVIPNPPSP	YEAEQNFRD	PFVFWHDESQ
181	KWVVVTSIAE	LHKLAIYTS	NLKDWKLVSE	FGPYNAQGGV	WECPLVKLP	LDSEGNSTKWV
241	ITSGLNPGGP	PGTVGSGTQY	FVGEFDGTF	TPDADTVYPG	NSTANWMDWG	PDFYAAAGYN
301	GLSLNDHVHI	GWMNNWQYGA	NIPTYPWRS	MAIPRHMALK	TIGSKATLVQ	QPQEAWSIS
361	NKRPIYSRTF	RTLSEGSTNT	TTTGETFKVD	LSFSAKSKAS	TFAIALRASA	NFTEQTLVGY
421	DFAKQIFLD	RTHSGDVSFD	ETFASVYHGP	LTPDSTGVVK	LSIFVDRSSV	EVFGGQGETT
481	LTAQIFPSSD	AVHARLASTG	GTTEDEVRA	DI	YKIASTWN	

Gambar 3. Struktur primer inulinase dari *Aspergillus awamori* (kode PDB: 1Y4W)

b. Struktur Sekunder

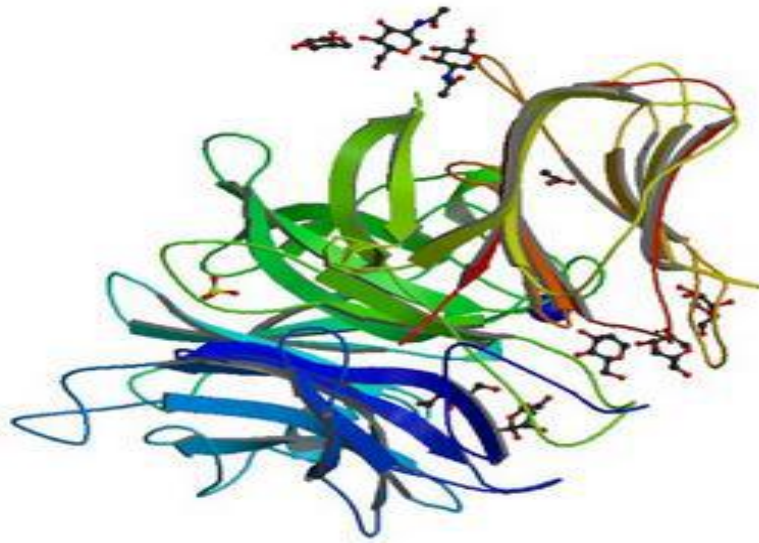
Struktur sekunder terbentuk karena adanya ikatan hidrogen antara gugus =CO dan -NH di sepanjang rantai polipeptida. Contoh struktur sekunder adalah α -heliks dan β -sheet. Struktur α -heliks terbentuk karena adanya ikatan hidrogen antara atom O (gugus =CO) dengan atom H (gugus -NH) pada ikatan peptida di sepanjang rantai polipeptida. Struktur sekunder β -sheet terbentuk melalui ikatan hidrogen antara atom O (gugus =CO) dengan atom H (gugus -NH) pada ikatan peptida lain dalam rantai peptida yang tidak sama. β -sheet dapat ditemukan antiparalel dan paralel. Keduanya berbeda dalam hal pola ikatan hidrogennya. Gambar 4 merupakan posisi struktur sekunder pada inulinase. Tanda panah pada Gambar 4 merupakan residu domain yang terdiri dari 353 residu β -Propeller dan 165 residu β -Sandwich. Sebuah domain dapat didefinisikan sebagai bagian dari sebuah rantai polipeptida yang stabil secara bebas atau dapat mengalami pergerakan sebagai sebuah kesatuan tunggal dengan *respect* ke seluruh protein.



Gambar 4. Posisi struktur sekunder inulinase dari *Aspergillus awamori* (Kode PDB: 1Y9G).

c. Struktur Tersier

Struktur tersier terjadi karena melipatnya struktur sekunder karena adanya interaksi gugus pada rantai samping residu asam amino, yaitu interaksi hidrofobik, ionik, ikatan hidrogen, gaya dispersi van der Waals dan jembatan disulfida sehingga membentuk struktur tiga dimensi. Gambar 5. merupakan Struktur tersier endoinulinase dari *Aspergillus ficuum*.



Gambar 5. Struktur tersier endoinulinase dari *Aspergillus ficuum* (Kode PDB: 3RWK)

Syarat utama enzim berkerja pada substrat adalah terjadinya kontak antara enzim dengan substrat pada bagian tertentu. Bagian enzim yang mengadakan kontak dengan substrat dinamakan sisi aktif enzim. Kontak antara enzim dengan substrat dapat menyebabkan terjadinya kompleks enzim substrat yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Bagian aktif inulinase akan memutus ikatan β - 2,1 -fruktosida dari molekul inulin (Zharebtsou, 2003). Pemutusan ini akan membentuk kompleks enzim substrat yang akan direaksikan dengan air sehingga membentuk fruktosa dan menghasilkan enzim kembali.

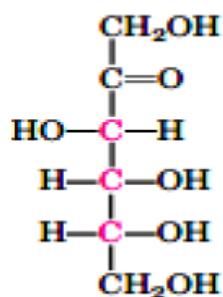
2.3 Produk Hasil Hidrolisis Inulin

Inulin yang akan dihidrolisis akan menghasilkan gula pereduksi yaitunya fruktosa dan FOS (fructoligosakarida).

2.3.1 Fruktosa

Fruktosa adalah suatu heksulosa, disebut juga levulosa karena memutar bidang polarisasi ke kiri. Fruktosa merupakan gula termanis, terdapat dalam madu dan buah-buahan bersama glukosa. Fruktosa dapat terbentuk dari hidrolisis suatu disakarida yang disebut sukrosa dan fruktosa adalah salah satu gula pereduksi.

Fruktosa juga dapat dihasilkan dari hidrolisis pati, tetapi hidrolisis inulin lebih menguntungkan karena hanya memerlukan satu jenis enzim yaitu enzim inulinase, sedangkan hidrolisis pati membutuhkan 3 enzim yaitu amilolisis pati dengan katalis α -amilase dan amiloglukosidase, diikuti dengan pengubahan glukosa ke fruktosa yang dikatalisis oleh glukosa isomerase. Proses ini menghasilkan maksimal hanya sekitar 42% fruktosa, sisanya 50% glukosa dan 8% oligosakarida. Hidrolisis inulin menggunakan katalis inulinase menghasilkan kurang lebih 98% fructosa (L. Zittan, 1981). Gambar 6. merupakan struktur fruktosa.

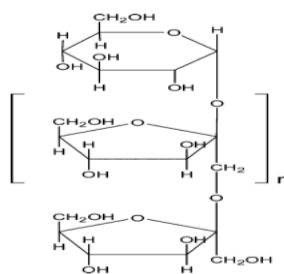


Gambar 6. Struktur fruktosa (Azhar, 2016).

2.3.2 FOS (Fruktoligosakarida)

FOS merupakan kelas karbohidrat yang terkandung di beberapa tanaman secara alami. FOS dapat ditemukan pada bawang, *artichoke*, inulin dan tumbuhan-tumbuhan lainnya. FOS umumnya digunakan sebagai pemanis pengganti sukrosa karena rendah kalori dalam produk seperti kue, roti, permen, produk susu, dan beberapa minuman. FOS dapat terbentuk dari hasil sintesis sukrosa dengan bantuan enzim transfruktosilase atau dengan hidrolisis enzimatis terkontrol dari ekstrak alami.

FOS merupakan oligosakarida yang terdiri dari monomer fruktosa yang dihubungkan oleh ikatan glikosida. Oligosakarida merupakan rantai gula dengan jumlah 3 – 20 unit. FOS memiliki struktur GF_n atau F_m, dengan huruf G menunjukkan satu terminal glukosa, F merupakan unit fruktosa, dan huruf n dan m menunjukkan banyaknya unit fruktosa dalam oligomer FOS. Antar unit fruktosa penyusunnya terdapat ikatan yang tidak dapat dipecah oleh enzim pencernaan, yaitu ikatan $\beta(2-1)$. FOS memiliki nilai DP yang lebih rendah dari inulin, yaitu berkisar antara 2 – 8 (Franck, 2003). Struktur FOS dimuat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur FOS (fruktoligosakarida) (Jing Li, *et al.*, 2014).

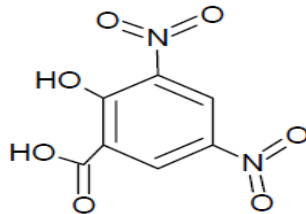
2.4 DNS (Dinitrosalisilat)

DNS adalah asam dinitro salisilat. DNS umumnya dapat digunakan sebagai pereaksi pada reaksi redoks dengan gula pereduksi, contohnya glukosa dan fruktosa. DNS merupakan senyawa aromatis yang jika bereaksi dengan gula pereduksi akan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, yakni senyawa yang dapat menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 550 nm (Kusmiati dan Agustini, 2010). Semakin tinggi kadar gula pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk, sehingga absorbansi sampel akan semakin tinggi.

Metode analisis dengan reagen DNS terlihat lebih spesifik untuk mengetahui seberapa besar kadar gula pereduksi yang terdapat dalam sampel. Selain itu metode analisis kadar gula pereduksi menggunakan reagen DNS merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk menentukan kadar gula pereduksi. Reagen dinitrosalisilat (DNS) dapat dibuat dengan melarutkan asam 3,5-dinitrosalisilat, NaOH, Na₂SO₃, Na-K-tartarat, fenol, dan aquades. DNS memiliki pH basa sehingga fruktosa mudah untuk teroksidasi karena berada pada kesetimbangan dengan dua aldehida diastereometrik serta penggunaan suatu zat antara tautomerik enadiol (Fessenden, 1982). Penggunaan DNS bisa menghasilkan intensitas absorbansi yang meningkat pada pengukuran dengan selang waktu 24 jam, akan tetapi jika DNS ditambahkan fenol dan sulfit akan mempertahankan kestabilan intensitas kompleks warna sekaligus dapat dilakukan penundaan pengukuran absorbansi pada selang 24 jam. Penambahan fenol berfungsi untuk menstabilkan warna, sedangkan sulfit dapat menanggulangi

kelarutan oksigen yang dapat mengoksidasi gula pereduksi (Rahmansyah, 2003).

Gambar 8 adalah struktur dari DNS.

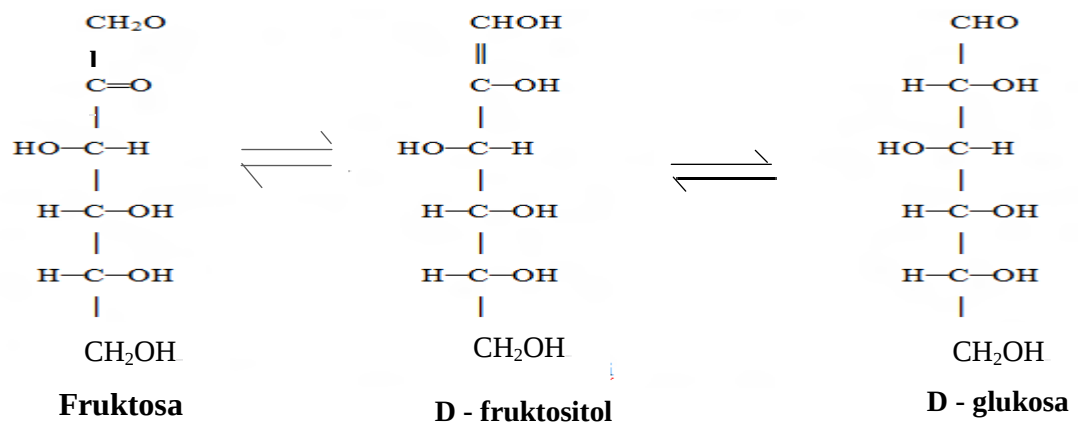


Gambar 8. Struktur DNS (Miloski, *et al.*, 2008).

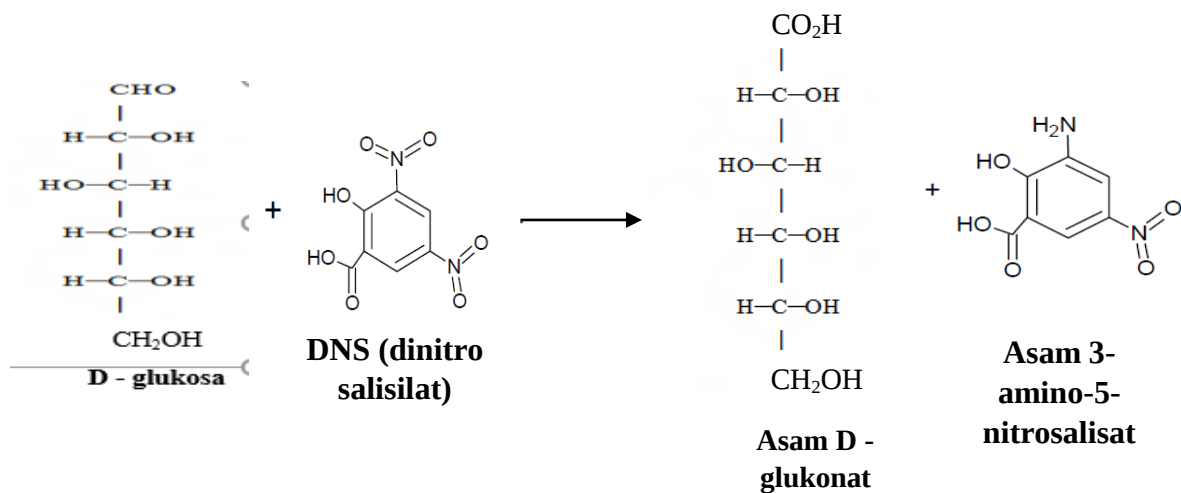
2.5 Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS

Gula pereduksi dapat bereaksi dengan reagen DNS. Reaksi gula pereduksi dengan reagen DNS merupakan reaksi redoks dimana gugus aldehyd yang bertindak sebagai pereduksi akan teroksidasi menjadi karboksil, sedangkan DNS yang bertindak sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrisalisat. Jika terdapat gula pereduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning bereaksi dengan gula pereduksi dalam suhu tertentu menimbulkan warna jingga kemerahan. Reaksi berlangsung pada suasana basa dan suhu yang tinggi 100°C (Kusmiati dan Agustini, 2010). Reduksi DNS terhadap gula pereduksi berjalan cepat dan sempurna diperlukan pemanasan 100°C selama 15 menit, sehingga diperoleh pembentukan warna yang lebih intensif. Gambar 9 adalah reaksi fruktosa dengan reagen DNS (Miller, 1959).

Tahap I proses tautomerik



Tahap II reaksi D-glukosa dengan DNS (Dinitro Salisilat).



Gambar 9. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS (Miloski, *et al.* 2008).

2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi adalah suatu proses pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Kromatografi merupakan suatu metode pemisahan fisik dimana komponen – komponen yang dipisahkan distribusikan di antara dua fase, salah satu fase tersebut adalah suatu lapisan stasioner dengan permukaan yang luas, yang lainnya

sebagai fluida yang mengalir lembut di sepanjang landasan stasioner (Day R.A dan Underwood, 2002).

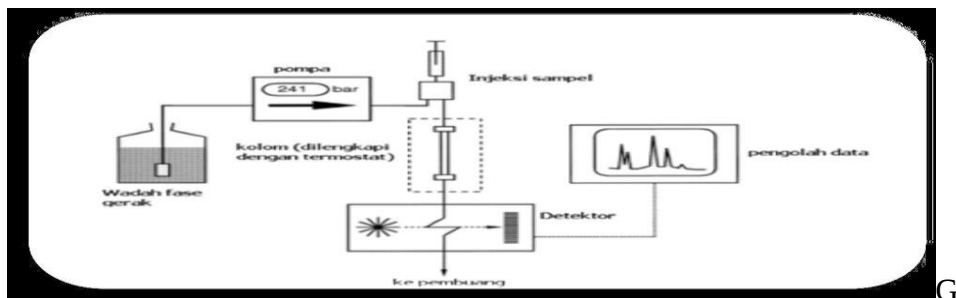
Jenis kromatografi berdasarkan fase gerak yang digunakan dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu kromatografi gas dan kromatografi cair. Kromatografi dapat dibagi atas : kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), dan kromatografi gas (Olivia, 2013).

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau biasa disebut dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dikembangkan pada akhir tahun 1960an dan awal tahun 1970an. HPLC merupakan suatu metode kromatografi yang menggunakan suatu padatan, cairan, resin ion (*ion exchange resin*) atau berpori (*porous polymer*) pada kolom sebagai fasa diam, sedangkan fasa gerak berupa suatu cairan yang melewati pada tekanan tinggi. Teknik analisis menggunakan HPLC sudah luas digunakan untuk analisa sampel dan permurnian dalam variasi sampel baik dalam bidang farmasi, bioteknologi, lingkungan, polimer, industri minuman dan makanan (Settle, 1997). Inulin yang dihidrolisis menghasilkan gula pereduksi yaitunya fruktosa dan FOS dapat dianalisa melalui HPLC.

2.4.1 Prinsip Kerja HPLC

Prinsip kerja HPLC adalah dengan bantuan pompa, fasa gerak cair dialirkan melalui kolom tipe *agilent ODS C18* ke detektor UV-Vis, sehingga cuplikan akan dimasukan dalam injektor dengan penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen – komponen campuran karena perbedaan kekuatan interaksi antara

solute-solut terhadap fasa diam. Zat yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom terlebih dahulu, sebaliknya zat yang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih lama. Setiap komponen campuran yang dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram (Hendayana, 2010). Skema HPLC dimuat pada Gambar 10.



ambar 10. Skema kerja HPLC (Mayer, 2010).

2.4.2 Fase Diam

Pada kromatografi cair-cair, fase diamnya adalah cairan yang dilapisi pada permukaan zat padat penyangga dan dipakai sebagai bahan isian (*packing material*) untuk kolom yang terdiri dari 3-10 μm partikel silika *porous*. Fase diam secara parsial dapat larut dalam fase gerak, yang menyebabkan fase diam tersebut dapat keluar dari kolom terus menerus. Untuk mencegah kehilangan fase diam tersebut, maka fase diam tersebut berikatan secara kovalen dengan partikel silika di dalam kolom. Kebanyakan fase diam pada HPLC berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. Permukaan silika adalah polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH).

Silika yang dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen-reagen yang akan bereaksi dengan gugus silanol dan menggantinya dengan gugus-gugus fungsional yang lain. Hasil reaksi yang diperoleh disebut dengan silika fase terikat yang stabil terhadap hidrolisis karena terbentuk ikatan-ikatan siloksan (Si-O-O-Si). *Oktadesil silika* (ODS atau C₁₈) merupakan fase diam paling sering digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi.

2.4.3 Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan HPLC adalah berupa cair yang biasa disebut eluen atau pelarut yang berfungsi membawa komponen-komponen campuran menuju detektor (Hendayana, 2010). Fase gerak atau eluen biasanya terdiri dari campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi, yang ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk HPLC fase normal (fase diam HPLC lebih polar daripada fase gerak), sedangkan untuk HPLC fase terbalik (fase diam kurang polar dibandingkan fase gerak).

Pada umumnya fase gerak yang digunakan dalam HPLC adalah fase terbalik. Fase terbalik adalah campuran metanol atau asetonitril dalam air dengan berbagai perbandingan. Untuk penentuan kadar gula pereduksi hasil hidrolisis inulin digunakan fase terbalik dimana campurannya adalah metanol dan air dengan perbandingan tertentu.

Adapun ciri-ciri yang harus dimiliki oleh fase gerak pada HPLC, yaitu :

- A. Kemurnian tinggi (*high purity*), yaitu cairan eluen yang tidak terkontaminasi.
- B. Kestabilan tinggi, yaitu eluen yang tidak bereaksi dengan sampel atau zat yang berfungsi sebagai fase diam.
- C. Kekentalan rendah, yaitu kerapatan eluen sekecil mungkin.
- D. Dapat melarutkan sampel, tidak mengubah kolom dan sifat kolom serta cocok dengan detektor.

2.4.4 Komponen HPLC

A. Wadah Fase Gerak HPLC

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah fase gerak biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel kecil. Selain itu, adanya gas dalam fase gerak juga harus dihilangkan sebab adanya gas berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis (olivia, 2013).

B. Pompa

Pompa dalam HPLC berfungsi untuk mengalirkan fase gerak cair melalui kolom yang berisi serbuk halus. Pompa yang sering digunakan dalam HPLC adalah pompa reciprocating. Jenis pompa ini memiliki kelebihan adalah volume internalnya kecil sekitar 35 – 400 μl , tekanan hingga 10.000 psi, kemampuan untuk adaptasi menggunakan elusi gradien, aliran yang konstan sehingga terbebas dari tekanan balik kolom dan akibat dari kekentalan solvent (Skoog, 2004).

D. Injektor (penyuntikan sampel)

Injektor merupakan tempat untuk memasukkan sampel ke kolom. Waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor adalah waktu retensi. Waktu retensi diukur berdasarkan waktu dimana sampel diinjeksikan sampai sampel menunjukkan ketinggian puncak yang maksimum dari senyawa itu. Senyawa-senyawa yang berbeda memiliki waktu retensi yang berbeda.

Sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung kedalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (sampel loop) internal atau eksternal.

Sistem dengan pipa dosis (sampel Loop) merupakan pilihan yang tepat pada HPLC khususnya untuk analisa kuantitatif. Untuk memasukkan cuplikan ke dalam aliran fase gerak menggunakan sistem loop diperlukan dua langkah yakni sejumlah cuplikan ke dalam loop dalam posisi load. Kemudian kran diputar untuk mengubah posisi load menjadi injeksi dan fase gerak membawa cuplikan kedalam kolom. Loop di ganti-ganti dan tersedia dalam berbagai ukuran volume dari 5 hingga 500 μL . Sistem ini memungkinkan untuk memasukkan cuplikan sample pada tekanan 7000 psi dengan ketelitian tinggi (Hendayana, 2010).

F. Kolom

Kolom HPLC secara umum dibuat dari bahan tabung stainless steel, walaupun untuk tekanan di bawah 600 psi kolom kaca dapat digunakan. Kolom untuk analisis HPLC memiliki ukuran panjang kolom berkisar dari 10 – 30 cm

berbentuk lurus. Diameter dalam kolom 4 – 10 mm dengan ukuran partikel 5 – 10 μm . Kolom dari jenis ini mempunyai 40.000 hingga 60.000 lempeng/meternya.

Kolom HPLC terdiri dari kolom utama dan kolom pengaman. Kolom utama berisi fase diam yang jenisnya bervariasi sesuai keperluan. Kolom jenis C-18 dan C-8 merupakan jenis kolom yang banyak dipakai dalam HPLC. Pada kolom pengaman (*guard column*) yang diletakkan sebelum sistem pemasukan cuplikan memiliki 2 fungsi yaitu menyaring kotoran yang terbawa dalam fase diam dan menjenuhkan fase diam untuk menghindari terjadinya erosi fase diam oleh pelarut (Hendayana, 2010).

G. Detektor

Detektor yang digunakan pada HPLC adalah detektor UV-Vis, karena sebagian besar senyawa mempunyai serapan khusus pada daerah ultraviolet dan pada daerah tampak pada λ 190-800 nm oleh spesies solut yang mempunyai struktur-struktur atau gugus kromoforik. Detektor UV dilengkapi dengan pengaturan panjang gelombang sehingga λ UV yang digunakan dapat dipilih sesuai dengan jenis cuplikan yang diukur. Pada detektor UV-Vis, aliran akan mengalir melalui detektor dari kolom kromatografi. Untuk meminimalkan pelebaran puncak, detektor dirancang dalam volume yang sekecil mungkin. Ukuran volume dibatasi 1 – 10 μl dengan panjang sel 2 – 10 mm. Umumnya sel detektor mampu menahan tekanan hingga 600 psi sehingga peralatan pengurang tekanan diperlukan sebelum aliran memasuki detektor (Khopkar.2008). Fruktosa hasil hidrolisis inulin tidak berwarna, sehingga dilakukan penambahan reagen

DNS yang akan menghasilkan warna. Oleh sebab itu fruktosa hasil hidrolisis inulin dapat diukur menggunakan detektor UV-Vis.

H. Rekorder

Alat pengumpulan data seperti komputer, integrator atau rekorder dihubungkan dengan detektor. Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya dalam bentuk kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh pengguna.

2.4.5 Waktu Retensi

Waktu retensi adalah waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju ke detektor. Waktu retensi diukur berdasarkan waktu dimana sampel diinjeksikan sampai sampel menunjukkan ketinggian puncak yang maksimum dari senyawa tersebut. senyawa-senyawa yang berbeda memiliki waktu retensi yang berbeda. Untuk beberapa senyawa, waktu retensi akan sangat bervariasi dan bergantung pada :

- a. Tekanan yang digunakan (karena itu akan berpengaruh pada laju alir dari pelarut).
- b. Kondisi dari fase diam (tidak hanya terbuat dari material apa, tetapi juga pada ukuran partikel)
- c. Komposisi yang tepat dari pelarut
- d. Temperatur pada kolom.

2.7 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu. Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Pengukuran spektrofotometri menggunakan alat spektrofotometer yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Spektrum UV-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada λ tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan linieritas antara absorban dengan konsentrasi larutan analit dan berbanding terbalik dengan transmittan. Dalam hukum Lambert-Beer tersebut ada beberapa pembatasan, yaitu :

1. Sinar yang digunakan dianggap monokromatis
2. Penyerapan terjadi dalam suatu volume yang mempunyai penampang yang sama
3. Senyawa yang menyerap dalam larutan tersebut tidak tergantung terhadap yang lain dalam larutan tersebut
4. Tidak terjadi fluoresensi atau fosforisensi
5. Indeks bias tidak tergantung pada konsentrasi larutan

Hukum Lambert-Beer dinyatakan dalam rumus sbb :

$$A = e \cdot b \cdot c$$

dimana :

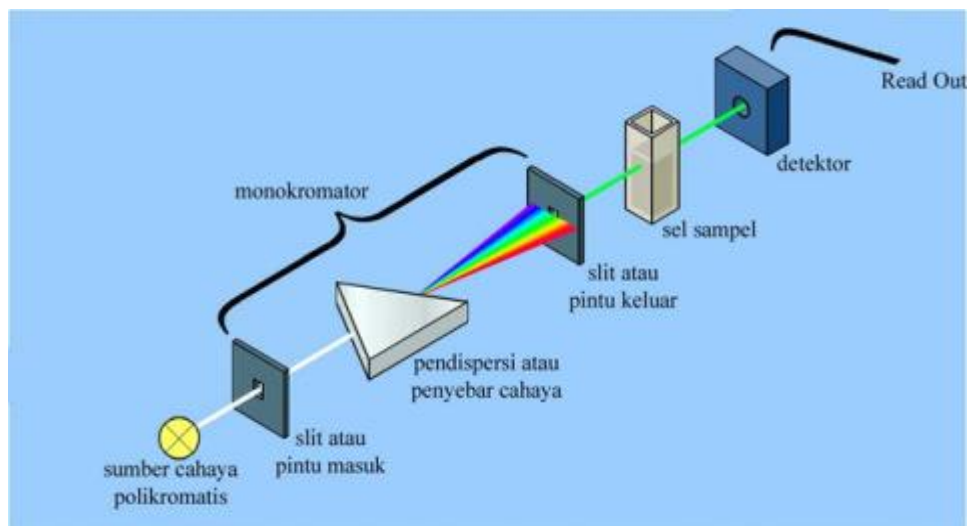
A = absorban

e = absorptivitas molar

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi

a) Instrumen Spektrofotometri Uv – Vis



Gambar 11. Instrument Spektrofotometer Uv-Vis.

2.7.1 Prinsip Kerja

Cahaya yang berasal dari lampu deuterium maupun wolfram yang bersifat polikromatis di teruskan melalui lensa menuju ke monokromator pada spektrofotometer dan filter cahaya pada fotometer. Monokromator kemudian akan mengubah cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis (tunggal). Berkas-berkas cahaya dengan panjang tertentu kemudian akan dilewatkan pada sampel yang mengandung suatu zat dalam konsentrasi tertentu. Oleh karena itu, terdapat

cahaya yang diserap (diabsorpsi) dan ada pula yang dilewatkan. Cahaya yang dilewatkan ini kemudian diterima oleh detector. Detector kemudian akan menghitung cahaya yang diterima dan mengetahui cahaya yang diserap oleh sampel. Cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel sehingga akan diketahui konsentrasi zat dalam sampel secara kuantitatif.

2.7.2 Sumber cahaya

Sumber cahaya pada spektrofotometer harus memiliki pancaran radiasi yang stabil dan intensitasnya tinggi. Sumber cahaya pada spektrofotometer UV-Vis ada dua macam :

- A. Lampu Tungsten (Wolfram), Lampu ini digunakan untuk mengukur sampel pada daerah tampak. Bentuk lampu ini mirip dengan bola lampu pijar biasa. Memiliki panjang gelombang antara 350-2200 nm. Spektrum radiasinya berupa garis lengkung. Umumnya memiliki waktu 1000jam pemakaian.
- B. Lampu DeuteriumLampu ini dipakai pada panjang gelombang 190-380 nm. Spektrum energy radiasinya lurus, dan digunakan untuk mengukur sampel yang terletak pada daerah uv. Memiliki waktu 500 jam pemakaian.

2.7.3 Monokromator

Monokromator adalah alat yang akan memecah cahaya polikromatis menjadi cahaya tunggal (monokromatis) dengan komponen panjang gelombang tertentu. Bagian-bagian monokromator, yaitu :

- A. Prisma

Prisma akan mendispersikan radiasi elektromagnetik sebesar mungkin supaya di dapatkan resolusi yang baik dari radiasi polikromatis.

B. Grating (kisi difraksi)

Kisi difraksi memberi keuntungan lebih bagi proses spektroskopi. Dispersi sinar akan disebarkan merata, dengan pendispersi yang sama, hasil dispersi akan lebih baik. Selain itu kisi difraksi dapat digunakan dalam seluruh jangkauan spektrum.

C. Celah optis

Celah ini digunakan untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diharapkan dari sumber radiasi. Apabila celah berada pada posisi yang tepat, maka radiasi akan dirotasikan melalui prisma, sehingga diperoleh panjang gelombang yang diharapkan.

D. Filter

Berfungsi untuk menyerap warna komplementer sehingga cahaya yang diteruskan merupakan cahaya berwarna yang sesuai dengan panjang gelombang yang dipilih.

2.7.4 Detektor

Detektor akan menangkap sinar yang diteruskan oleh larutan. Sinar kemudian diubah menjadi sinyal listrik oleh amplifier dalam rekorder dan ditampilkan dalam bentuk angka-angka pada reader (komputer). Detektor dapat memberikan respons terhadap radiasi pada berbagai panjang gelombang Ada beberapa cara untuk mendeteksi substansi yang telah melewati kolom. Metode umum yang mudah dipakai untuk menjelaskan yaitu penggunaan serapan ultra-violet. Banyak

senyawa-senyawa organik menyerap sinar UV dari beberapa panjang gelombang. Jika penyinaran sinar UV pada larutan yang keluar melalui kolom dan sebuah detektor pada sisi yang berlawanan, akan mendapatkan pembacaan langsung berapa besar sinar yang diserap. Jumlah cahaya yang diserap akan bergantung pada jumlah senyawa tersebut. Senyawa-senyawa akan menyerap dengan sangat kuat pada bagian-bagian yang berbeda dari spektrum UV. Misalnya, metanol, menyerap pada panjang gelombang dibawah 205 nm dan air pada gelombang dibawah 190 nm. Jika menggunakan campuran metanol-air sebagai pelarut, sebaiknya menggunakan panjang gelombang yang lebih besar dari 205 nm untuk mencegah pembacaan yang salah dari pelarut (Day, R.A dan Underwood, A.L, 2002).

BAB V

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pengukuran senyawa fruktosa dilakukan pada λ_{maks} 499 nm dan volume optimum larutan fruktosa adalah 100 μ L.
2. pH optimum dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS adalah 4,5
3. Waktu kestabilan warna dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS pada menit ke 30.
4. Analisis fruktosa menggunakan HPLC dengan tipe kolom C18, C8 dan Silika belum memberikan pemisahan yang bagus.
5. Inulin dengan konsentrasi 0,5%, 1% dan 2,5% dihidrolisis menghasilkan fruktosa adalah 183,6 μ g/mL, 295,6 μ g/mL dan 512,6 μ g/mL menggunakan spektronik 20 D.

5.2 Saran

Bagi pembaca yang tertarik dengan penelitian ini, penulis menyarankan Penelitian lebih lanjut untuk analisis fruktosa dengan HPLC menggunakan variasi fasa gerak lain seperti methanol : air, asetronitril : air dan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amico, R.D, G. Montini, L., Disanello, G., Piovesan, S., Bottora, A. T., Cracco, G., F. Zacchello. 1995. *Determination of Inulin in Plasma and Urine by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*. journal of chromatography B, 672 (1) 155-159.
- Arisa, Boni. 2016. *Penentuan Aktivitas Tipe Aksi Inulinase Isolat Bakteri Mesofilik Dari Rizosfer Umbi Dahlia (Dahlia sp.)*. skripsi, jurusan kimia, FMIPA, UNP.
- Azhar, Minda. 2016. *Biomolekul Sel*. Padang: Universitas Negeri Padang
- Azhar, Minda. 2009. *Inulin Sebagai Prebiotik*. Jurnal saintesk. Edisi september, vol XII. No 1. Hal 2.
- Barclay, T., M. G. Markovic, M. R. Johnston, Peter D. C., Nikolai, P. 2012. *Analysis Of The Hydrolysis Of Inulin Using Real Time ¹H NMR Spektroskopi*. Elsevier. Carbohydrate research. 352, 117-125.
- Baston, O., Barna, O. 2013. *Lactic Acid Production by Bacteria Isolated From Rhizosphere of Dahlia Tubers*. Food and Environment Safety : 186 – 191.
- Bioma. 2008. *Inulin Sebagai Kesehatan*. Book Company. New York.
- Boni, R., Minda, A., Budhi, O. 2014. *Penentuan Aktivitas Tipe Aksi Inulinase Isolat Bakteri Mesofilik Dari Rizosfer Umbi Dahlia (Dahlia sp.)*. Chemistry journal of state university of padang. ISSN 2339-1197.
- Day, R.A., Underwood, A.L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*, Erlangga, Jakarta.
- Fessenden. 1982. *Kimia Organik Edisi ketiga Jilid 2*. Penerbit Erlangga , dicetak PT. Gelora Aksara Pratama.
- Franck, De Lenheer. 2003. *Inulin*. Email : ann.franck@orafti.com. Diakses 25 maret 2004.
- Hendayana, Sumar. 2010. *KIMIA PEMISAHAN Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung : PT. REMAJA ROSDAKARYA.
- Jing, L., Dejun, H., Wanrong, Z., Guanping, L., Jing, Z., Shaoping, L. 2014. *Determination of Inulin Type Fructooligosaccharides In Edible Plants by High Performance Liquid Chromatography With Aerosol Detector*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62, 7707 – 7713.
- Kango, N., Jain, S. C. 2011. Production and Properties of Microbial Inulinases : Recent Advances. *Food Biotechnology*, 25, 165-212.