

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

SKRIPSI

*Diajukan kepada Tim Penguji Skripsi Jurusan Kimia sebagai Salah
Satu Persyaratan Guna Memperoleh Gelar Sarjana Sains*



DEVITA EFRI

NIM. 84248/2007

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

ABSTRAK

Devita Efri. 2011. Penentuan Kadar RBB dalam Dye-inulin Secara HPLC Melalui Pembentukan Senyawa Inulin-RBB pada Variasi Konsentrasi Inulin
NIM : 84248

Inulin adalah senyawa karbohidrat alamiah yang merupakan polimer dari unit-unit fruktosa. 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 konsentrasi inulin, menentukan massa inulin terbanyak yang dapat bereaksi dengan RBB untuk menghasilkan senyawa dye-inulin, dan untuk 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 : air (60 : 40), laju alir 1 mL/menit, dan detektor UV-Vis. Massa RBB dalam dye-inulin yang ditentukan secara HPLC pada variasi 2 gram, 4 gram, dan 6 gram inulin berturut-turut adalah 0,023 gram, 0,115 gram, dan 0,192 gram. Massa inulin terbanyak yang dapat bereaksi dengan RBB dalam membentuk senyawa dye-inulin adalah sebanyak 6 gram dengan kadar RBB yang bereaksi membentuk dye-inulin adalah 38,4%.

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

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya terutama nikmat waktu dan kesehatan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul *“Penentuan Kadar RBB dalam Dye-Inulin Secara HPLC melalui Pembentukan Senyawa Inulin-RBB pada Variasi Konsentrasi Inulin”*. Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh Gelar Sarjana Sains Strata Satu Pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.

Dalam penulisan skripsi ini, penulis telah banyak mendapat bantuan dan dorongan baik moril maupun materil dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dra. Minda Azhar, M.Si. sebagai dosen pembimbing I dan Bapak Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D. sebagai dosen pembimbing II yang penuh perhatian dan kesabaran dalam membimbing penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
2. Bapak Drs. Iswendi, M.S. selaku Penasehat Akademik yang telah memberikan motivasi bagi penulis.
3. Bapak Drs. Amrin, M.Si, Bapak Drs. Bahrizal, M.S, dan Bapak Edi Nasra, S.Si, M.Si sebagai dosen penguji dalam penulisan skripsi ini.
4. Pimpinan Jurusan Kimia FMIPA UNP yang telah menyetujui penulisan skripsi ini.
5. Dosen serta karyawan/karyawati Jurusan Kimia FMIPA UNP yang telah memberikan bantuan dan motivasi dalam mengikuti perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini.
6. Bapak dan Ibu analis di laboratorium Kimia FMIPA UNP yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Penelitian.
7. Kedua orang tua tercinta dan adik-adik penulis yang telah memberikan do'a dan dukungan semangat baik moril maupun materil serta kasih sayang yang sangat berarti bagi penulis.

8. Seterusnya teman-teman Kimia 2007 yang telah banyak membantu penulis dalam berbagai hal.

Semoga bantuan, bimbingan dan petunjuk yang Bapak/Ibu, dan teman-teman berikan menjadi amal saleh dan mendapat balasan yang berlipat ganda dari Allah SV ii lis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak demi perbaikan dimasa yang akan datang. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis dan pembaca untuk perkembangan ilmu pengetahuan. Amin.

Padang, Juni 2011

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Batasan Masalah	4
D. Tujuan Penelitian	4
E. Manfaat Penelitian	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Inulin	6
1. Struktur dan Sifat Inulin.....	6
2. Sumber Inulin.....	7
3. Manfaat Inulin.....	11
B. <i>Remazol Brilliant Blue</i> (RBB)	12
C. HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	14
1. Sistem Peralatan HPLC.....	15
2. Jenis HPLC	19
3. Penentuan Kadar RBB dalam <i>dye</i> -inulin Secara HPLC	21
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	
A. Jenis Penelitian.....	23
B. Objek Penelitian	23
C. Alat dan Bahan.....	23
D. Prosedur Penelitian	
1. Ekstraksi Inulin dari Umbi Dahlia	23
2. Reaksi Dye-inulin	25

3. Pembuatan Larutan Standar RBB	26
4. Penentuan kondisi optimum HPLC untuk penentuan kadar RBB dalam <i>dye</i> -inulin.....	26
5. Penentuan Kadar RBB dalam <i>iv</i> lin Secara HPLC	26
6. Teknik Analisa Data.....	27

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Ekstraksi Inulin dari Umbi Dahlia	28
2. Reaksi Dye-inulin	28
3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}) untuk kondisi Pengukuran dengan HPLC.....	29
4. Penentuan kondisi optimum HPLC untuk penentuan kadar RBB dalam <i>dye</i> -inulin.....	31
5. Penentuan Kadar RBB dalam Dye-inulin Secara HPLC	31

B. PEMBAHASAN

1. Ekstraksi Inulin dari Umbi Dahlia	35
2. Reaksi Dye-inulin	36
3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}) untuk kondisi Pengukuran dengan HPLC.....	38
4. Penentuan kondisi optimum HPLC untuk penentuan kadar RBB dalam <i>dye</i> -inulin.....	39
5. Penentuan Kadar RBB dalam Dye-inulin Secara HPLC	39

BAB V. PENUTUP

A. Kesimpulan	44
B. Saran	44

DAFTAR PUSTAKA	46
-----------------------------	----

LAMPIRAN	48
-----------------------	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Inulin	6
2. Kelarutan Inulin dalam Air pada Variasi Temperatur.....	7
3. Umbi dahlia.....	11
4. Rumus <i>Struktur Remazol Brilliant Blue</i>	13
5. Instrumentasi HPLC.....	15
6. Diagram Skematik Sistem Kromatografi Cair	16
7. Diagram Penyuntikan Sampel pada HPLC	18
8. Inulin	28
9. <i>Dye</i> -inulin.....	29
10. Spektrum UV-Vis larutan inulin	30
11. Spektrum UV-Vis larutan RBB 100 ppm	30
12. Spektrum UV-Vis larutan <i>dye</i> -inulin	31
13. Kromatogram HPLC larutan <i>dye</i> -inulin 1000 ppm.....	33
14. Kurva hubungan massa <i>dye</i> -inulin yang diperoleh pada variasi massa inulin	38
15. Kurva standar larutan RBB	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan inulin pada bahan pangan	9
2. Massa <i>dye</i> -inulin yang dihasilkan pada variasi massa inulin.....	29
3. Massa <i>dye</i> -inulin yang diperoleh pada variasi massa inulin	37
4. Data luas area dari larutan standar RBB pada berbagai konsentrasi.....	40
5. Luas area kromatogram larutan <i>dye</i> -inulin 1000 ppm	41
6. Konsentrasi RBB dalam <i>dye</i> -inulin pada variasi massa inulin	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram alir ekstraksi inulin.....	48
2. Reaksi <i>dye-inulin</i>	49
3. Pembuatan Larutan Standar RBB	50
4. Penentuan kadar RBB dalam dye-inulin secara HPLC.....	51
5. Kromatogram Penentuan Kondisi Optimum untuk Pengukuran Secara HPLC	52
6. Gambar kromatogram larutan standar RBB 20, 40, 60, dan 80 ppm.....	54
7. Perhitungan Konsentrasi RBB dalam 10 mL larutan <i>Dye-inulin</i>	56
8. Hasil Identifikasi Herbarium Bunga Dahlia.....	57
9. Perhitungan Massa RBB dalam <i>Dye-inulin</i>	58
10. Spektrum FTIR inulin	60
11. Spektrum FTIR senyawa <i>dye-inulin</i>	61

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Inulin adalah senyawa karbohidrat alamiah yang merupakan polimer dari unit-unit fruktosa. Polisakarida ini dapat dihasilkan oleh beberapa tanaman umbi-umbian (seperti dahlia, Jerusalem artichoke dan chicory) dan berperan sebagai karbohidrat cadangan (Grupta dkk, 1990). Umbi dahlia mengandung 69.50 - 75.48 % inulin yang berpotensi untuk dihidrolisis menjadi sirup fruktosa dan fruktooligosakarida atau sebagai substrat pada produksi alkohol secara fermentasi (Saryono dkk, 1998).

Inulin yang merupakan sumber utama fruktosa memiliki beberapa manfaat (Goutara dan Wijandi, 1985). Inulin dapat digunakan sebagai bahan tambahan makanan sebagai pengganti lemak (Crittenden, 1999). Selain itu, inulin dapat digunakan oleh penderita diabetes, karena memiliki rasa manis yang sangat ringan, tidak dapat diserap oleh tubuh sehingga tidak akan mempengaruhi kadar gula dalam darah (Bergner, 1997).

Inulin dapat dihidrolisis menjadi fruktooligosakarida (FOS). FOS dikenal di Jepang sebagai Meioligo dan Neosugar, biasanya digunakan sebagai pemanis, peningkat aroma, pengembang, dan humektan. Sebagai pengganti sukrosa rendah kalori, FOS digunakan dalam pembuatan kue, roti, permen, produk susu, dan beberapa minuman (Ekandini, 2006). Dengan melihat beberapa manfaat inulin tersebut, maka inulin merupakan salah satu senyawa yang sangat potensial untuk dikembangkan.

Inulin dapat larut dalam air panas, tetapi hanya sedikit larut dalam air dingin atau alkohol (Bergner, 1997). Prinsip ekstraksi inulin adalah berdasarkan kelarutan inulin dalam air panas dan air dingin. Inulin hasil ekstraksi masih tercampur dengan senyawa-senyawa lain, sehingga kadar inulin yang dihasilkan belum diketahui. Untuk menentukan kadar inulin dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya spektrofotometri. Pada cara ini, inulin dilarutkan pada air panas dan dihidrolisis dengan asam pada temperatur 80°C . Fruktosa sebagai hasil hidrolisis inulin direaksikan dengan Cu^{2+} membentuk senyawa berwarna. Kekurangan cara ini adalah dapat terbentuk difruktosa anhidrat suatu senyawa yang berwarna. Senyawa ini dapat mengganggu dalam analisa dengan spektrofotometer sehingga dapat menurunkan keakuratan penentuan konsentrasi inulin.

Cara lain yang dapat digunakan untuk menentukan kadar inulin adalah dengan mereaksikan inulin dengan *Remazol Brilliant Blue* (RBB) membentuk senyawa *dye*-inulin yang berwarna biru. Senyawa ini dapat dideteksi melalui detektor UV-Vis pada HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

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 index sebagai detektor. Beberapa penelitian di atas dapat menentukan kadar inulin secara HPLC, namun penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin secara HPLC melalui pembentukan senyawa *dye*-inulin pada variasi konsentrasi inulin belum pernah dilakukan sebelumnya.

Senyawa *dye*-inulin yang dihasilkan dengan mereaksikan inulin dengan RBB dapat digunakan sebagai media untuk mendeteksi adanya bakteri penghasil inulinase. Di mana inulinase merupakan enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polisakarida inulin menjadi fruktosa dan atau fruktooligosakarida (Vandamme & Derycke, 1983). Bakteri penghasil inulinase dapat bertahan hidup pada media *dye*-inulin, ditandai dengan pudarnya warna biru dari senyawa *dye*-inulin, tempat hidup bakteri tersebut.

Beberapa kondisi reaksi perlu diperhatikan dalam mereaksikan inulin dengan RBB, karena akan berpengaruh pada kadar RBB dalam *dye*-inulin yang dihasilkan. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kadar RBB dalam *dye*-inulin diantaranya adalah konsentrasi inulin dan suhu yang digunakan pada saat pemanasan campuran. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan massa inulin yang paling tepat, dengan menggunakan beberapa variasi massa inulin yang akan direaksikan dengan RBB membentuk *dye*-inulin, kemudian kadar RBB dalam *dye*-inulin yang dihasilkan ditentukan dengan teknik HPLC.

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang di atas, maka yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah berapakah kadar RBB dalam *dye*-inulin yang diukur secara HPLC melalui pembentukan senyawa inulin-RBB pada variasi konsentrasi inulin dan berapakah massa RBB dalam *dye*-inulin yang dihasilkan?

C. BATASAN MASALAH

Penelitian ini terbatas pada hal-hal berikut:

1. Inulin yang digunakan diekstrak dari umbi dahlia
2. Suhu reaksi pembentukan *dye*-inulin adalah 50 °C
3. Kolom HPLC yang digunakan adalah *octadecylsilane* (ODS C18) dengan eluen campuran etanol dan air.

D. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk

1. Menentukan kadar RBB dalam *dye*-inulin secara HPLC melalui pembentukan senyawa inulin-RBB pada variasi konsentrasi inulin.
2. Menentukan massa inulin terbanyak yang dapat bereaksi dengan RBB untuk menghasilkan senyawa *dye*-inulin.
3. Menentukan kondisi optimum dari HPLC untuk penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin.

E. MANFAAT PENELITIAN

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Dapat memberikan informasi tentang penggunaan konsentrasi inulin yang tepat jika direaksikan dengan RBB untuk membentuk senyawa *dye*-inulin.
2. Dapat memberikan informasi tentang penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin secara HPLC.
3. Dapat memberikan sumbangan dalam pengembangan IPTEK tentang *dye*-inulin.

BAB II

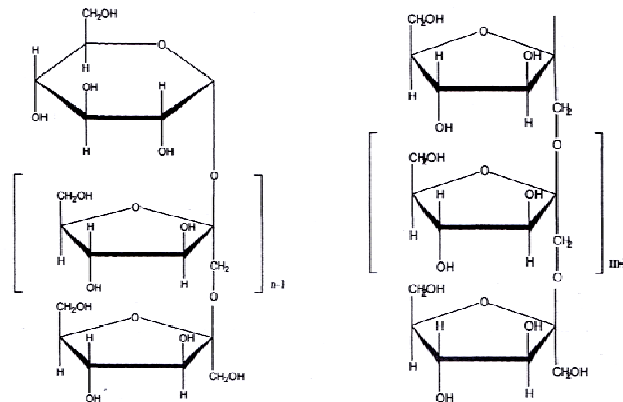
TINJAUAN PUSTAKA

A. INULIN

1. Struktur dan Sifat Inulin

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

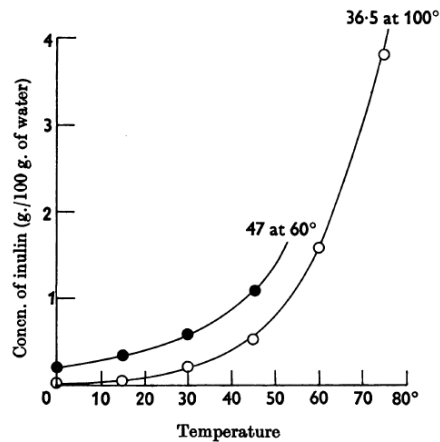
Inulin adalah suatu polisakarida yang dibangun oleh unit-unit monomer fruktosa melalui ikatan β -2-1 fruktofuransida yang diawali oleh satu molekul glukosa. Polifruktosa dengan derajat polimerisasi 30 ke atas disebut dengan inulin (Nakamura *et al*, 1995). Struktur inulin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur inulin

Sifat inulin yang penting untuk dipelajari adalah kelarutan inulin dalam air. Kelarutan inulin dalam air akan bervariasi, tergantung pada variasi temperatur, dan 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 10°C dan 35% pada 90°C.



Gambar 2. Kelarutan inulin dalam air pada variasi temperatur

- = inulin yang direkristalisasi dengan etanol,
 - = 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). Prinsip ekstraksi inulin dari tanaman adalah dengan memanfaatkan kelarutan inulin dalam air dan etanol tersebut. Oleh sebab itu, inulin dari tumbuhan dapat dengan mudah diekstrak dengan air panas dan pemisahan dengan air dilakukan dengan menurunkan temperatur.

Inulin standar memiliki rasa manis yang sangat ringan (10% kemanisan dibandingkan gula), sedangkan inulin yang lebih murni tidak memiliki rasa manis sama sekali. Inulin dapat dikombinasikan secara mudah dengan bahan tambahan lain tanpa merubah rasa dan aroma. Inulin

merupakan bahan yang larut dalam air (maksimum 10% dalam suhu ruang) dengan viskositas rendah (kurang dari 2 mPa.s untuk 5% b/b larutan dalam air). Di lain hal, inulin memiliki kapasitas untuk menggantikan lemak (Franck, 2003).

2. Sumber Inulin

Sumber utama inulin adalah dari tumbuhan, seperti pada umbi tanaman dahlia, akar chicory, dan umbi Jerusalem artichoke (Franck, 2003). Tanaman chicory, Jerusalem artichoke dapat tumbuh dengan 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, namun dalam jumlah sedikit. Kandungan inulin pada bahan pangan dimuat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan inulin pada bahan pangan

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	A. Buah	24-26	0,3-0,7
Gandum	B. 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 pada tumbuh-tumbuhan yang umumnya digunakan untuk pangan manusia terutama berasal dari kelompok *Liliacea* seperti bawang perai, bawang merah, bawang putih, asparagus dan *Compositae* seperti Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), dahlia (*Dahlia* sp), chicory (*Cichorium intybus*) dan dandelion (*Taraxacum officinalis*) yacon. Inulin pada tumbuh-tumbuhan merupakan *raw material* untuk produksi fruktosa dalam jumlah besar di masa yang akan datang, karena inulin tersedia dalam jumlah yang banyak (Ricca, 2007).

Selain tanaman dahlia, tumbuhan di Indonesia yang merupakan sumber inulin telah diteliti oleh Simanjuntak dkk (2004). Nama keluarga tumbuhan yang ditelitinya adalah *Amaryllidaceae*, *Asteraceae*, *Iridaceae* dan *Poaceae*, diantaranya brambang utan, bakung, tutup bumi, kenikir, alang-alang, tebu ireng, jinten dan sintrong. Kadar inulin pada tumbuh-

tumbuhan tersebut lebih 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.

Dahlia (*Dahlia pinnata Cav*) merupakan salah satu tanaman hias berbunga indah. Namun secara taksonomi tanaman dahlia merupakan tanaman perdu berumbi yang sifatnya tahunan (perennial). Tanaman ini berbunga pada musim panas sampai musim gugur. Dahlia berasal dari Meksiko dan mulai dibudidayakan di Eropa tahun 1789, tepatnya di Royal Botanical Garden Madrid, Spanyol, kemudian menyebar ke seluruh Eropa Barat. Di Indonesia tanaman dahlia pertama kali dikembangkan di Jawa Barat pada masa pemerintahan kolonial Hindia Belanda.

Menurut herbarium Universitas Andalas (ANDA) (2010), klasifikasi dari tanaman dahlia yang digunakan adalah sebagai berikut:

Divisi : *Magnoliophyta*
 Kelas : *Magnoliopsida*
 Ordo : *Asterales*
 Familia : *Asteraceae*
 Spesies : *Dahlia variabilis* (Willd)
 Nama lokal : *Dahlia*

Dahlia menghasilkan umbi yang mengandung 70% inulin. Umbi dahlia mengandung 69,50-75,48% inulin, yang berpotensi untuk

dihidrolisis menjadi sirup fruktosa dan fruktooligosakarida atau sebagai substrat pada produksi alkohol secara fermentasi (Saryono dkk, 1988).



Gambar 3. Umbi dahlia

3. Manfaat Inulin

Potensi utama inulin adalah inulin dapat dijadikan *high fructose syrup* (HFS) dan *fructo-oligosaccharides* (FOS) (Ricca *et al.*, 2007). HFS dan FOS merupakan senyawa yang sangat penting pada industri makanan, minuman dan farmasi (Tohamy, 2006).

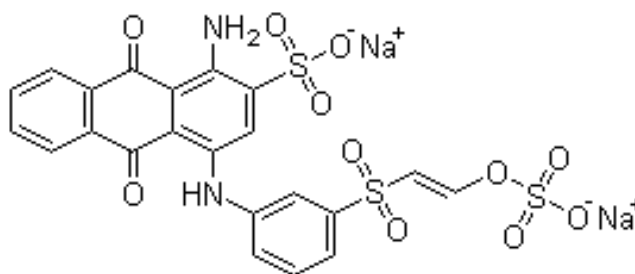
Senyawa FOS dapat digunakan sebagai pemanis atau pengganti sukrosa. FOS dikatakan sebagai pangan fungsional karena tidak terdekomposisi oleh enzim-enzim pencernaan manusia dan dapat dimanfaatkan oleh bakteri-bakteri baik yang terdapat dalam kolon atau usus besar, khususnya *Bifidobacterium* sp dan *Bacteroides* sp serta akan menghambat pertumbuhan bakteri pathogen penyebab penyakit (Firmansyah, 2007).

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, 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 (Wijayanti, 2007).

FOS adalah *ingredient* yang penting pada industri makanan dan farmasi (Singh, 2006). FOS dipandang sebagai '*functional food*' karena mempunyai pengaruh positif terhadap komposisi mikroflora usus manusia (Roberfroid, 1998; Kaplan, 2003). Selain itu, inulin dapat dijadikan *raw material* untuk pembuatan bioetanol, asam sitrat, aseton, 2,3-butanadiol.

B. Remazol Brilliant Blue (RBB)

Remazol Brilliant Blue merupakan salah satu jenis zat warna sintetis dengan warna biru yang memiliki berat molekul 626,54 dengan rumus molekul $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$. Rumus struktur RBB dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Rumus struktur *Remazol Brilliant Blue* (www.chemblink.com)

Zat warna *remazol brilliant blue* merupakan zat warna reaktif yang biasanya banyak digunakan untuk proses pencelupan tekstil. Zat warna ini telah dipakai sebagai pewarna dalam beberapa penelitian. Fullop, Laszlo (1997) menggunakan RBB dalam penentuan aktivitas mannanase. Correa, Marcos Jose, dkk (1998) juga telah menggunakan RRB untuk mewarnai Avicel untuk penentuan aktivitas selulosa.

Zat warna RBB ini dapat direaksikan dengan inulin membentuk *dye*-inulin yang berwarna biru. Di mana 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 pada posisi kedua dari monomer fruktosa dalam inulin dengan atom C pada RBB.

C. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Kromatografi merupakan suatu cara pemisahan campuran di mana unsur-unsur yang akan dipisahkan terdistribusikan antara dua fasa, satu dari fasa-fasa ini membentuk suatu lapisan stasioner dengan luas permukaan yang besar dan yang lainnya merupakan cairan yang merembes lewat atau melalui lapisan yang stasioner. Fasa stasioner mungkin suatu zat padat atau suatu cairan, dan fasa yang bergerak mungkin suatu cairan atau suatu gas (Underwood, 1986).

HPLC merupakan metoda yang sensitif dan akurat untuk penentuan kuantitatif serta baik untuk pemisahan senyawa yang tidak mudah menguap seperti asam amino, protein, pestisida, dan lain-lain (Skoog, 1985). Pemisahan dengan HPLC mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan metoda konvensional seperti waktu analisis yang cepat, biaya yang rendah serta kemungkinan untuk menganalisis sampel yang tidak stabil, daya pisahnya baik, kolom dapat dipakai kembali, ideal untuk molekul besar dan ion (Johnson, 1991).

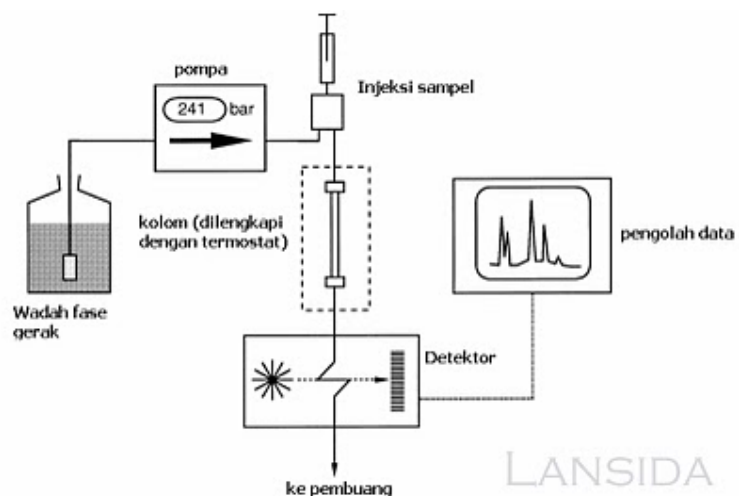
Pada saat ini, HPLC merupakan metoda kromatografi cair yang pemakaiannya sudah sangat berkembang, baik untuk analisis rutin, maupun untuk preparatif pada banyak laboratorium. Dibandingkan dengan kromatografi gas, HPLC dioperasikan pada suhu kamar, di mana senyawa yang tidak tahan panas dapat ditentukan dengan mudah dan sifat fasa gerak dapat diubah dengan merubah komposisi dari fasa gerak yang digunakan (Gritter *et al*, 1991). Alat HPLC dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 5. Instrumentasi HPLC

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 integrator atau perekam. Diagram skematik sistem kromatografi cair seperti ini :



Gambar 6. Diagram skematik sistem Kromatografi cair

a. Wadah Fase Gerak dan Fase Gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (inert). Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini biasanya 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. Daya elusi 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 mengacaukan analisis.

Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan buffer 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.

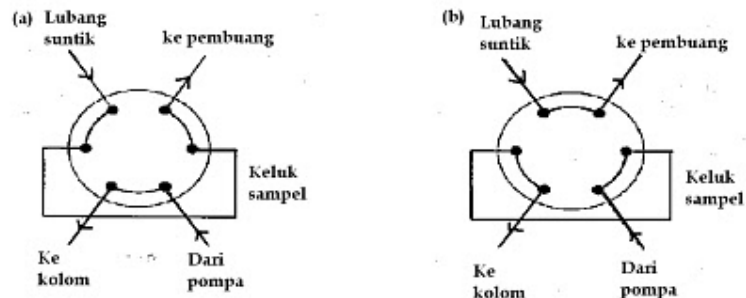
b. Pompa

Pompa yang cocok digunakan untuk HPLC adalah pompa yang 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, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan.

c. Tempat Penyuntikan Sampel

Sampel-sampel cair dan 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

d. Kolom dan Fase Diam

Ada dua jenis kolom pada HPLC yaitu kolom konvensional dan kolom mikro. Kolom merupakan bagian HPLC di mana terdapat fase diam untuk berlangsungnya proses pemisahan solute/analit.

Octadecylsilane (ODS atau C_{18}) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, dan tinggi.

e. 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 yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia.

2. Jenis HPLC

Pemisahan dengan HPLC dapat dilakukan dengan fase normal (jika fase diamnya lebih polar dibanding dengan fase geraknya) atau fase terbalik (jika fase diamnya kurang non polar dibanding dengan fase geraknya). Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, seringkali HPLC dikelompokkan menjadi HPLC fase normal dan fase terbalik.

Selain klasifikasi di atas, HPLC juga dapat dikelompokkan berdasarkan pada

sifat fase diam atau berdasarkan mekanisme sorpsi solute dengan jenis-jenis HPLC sebagai berikut:

a. Kromatografi Adsorpsi

Pemisahan kromatografi adsorpsi biasanya menggunakan fase normal dengan menggunakan fase diam silika gel dan alumina, meskipun demikian sekitar 90% kromatografi ini memakai silika sebagai fase diamnya.

b. Kromatografi Fase Terikat

Fase diam yang paling banyak digunakan adalah oktadesilsilan (ODS atau C18) dengan kebanyakan pemisahannya adalah fase terbalik. Sebagai fase gerak adalah campuran metanol atau asetonitril dengan air atau dengan larutan bufer.

c. Kromatografi Penukar Ion

Kromatografi penukar ion menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak, seperti polistiren.

d. Kromatografi Pasangan Ion

Kromatografi pasangan ion dapat digunakan untuk pemisahan sampel-sampel ionik dan mengatasi masalah-masalah yang melekat pada metode penukaran ion.

e. Kromatografi Eksklusi Ukuran

Fase diam berupa silika atau polimer yang bersifat porus sehingga solut dapat melewati porus (lewat di antara partikel), atau berdifusi lewat fase diam. Molekul solut yang mempunyai BM yang jauh lebih besar, akan terelusi terlebih dahulu, kemudian molekul-molekul yang ukuran medium, dan terakhir adalah molekul yang jauh lebih kecil. Hal ini disebabkan solut dengan BM yang besar tidak melewati porus, akan tetapi lewat diantara partikel fase diam. Dengan demikian, dalam pemisahan dengan eksklusi ukuran ini tidak terjadi interaksi kimia antara solut dan fase diam seperti tipe kromatografi yang lain.

f. Kromatografi Afinitas

Kromatografi jenis ini dapat digunakan untuk mengisolasi protein (enzim) dari campuran yang sangat kompleks (www.lansida.com).

Dari keenam jenis kromatografi di atas, penentuan kadar dye-inulin yang dilakukan termasuk ke dalam jenis kromatografi fase terikat karena menggunakan *octadecylsilane* (ODS C18) sebagai fase diam dan campuran etanol dan air sebagai fasa gerak (eluen).

3. Penentuan Kadar RBB dalam *Dye-inulin* Secara HPLC

Salah satu cara yang cepat dan akurat untuk menentukan kadar RBB dalam dye-inulin adalah dengan menggunakan kromatografi yaitu secara HPLC. Pada HPLC tekanan yang digunakan pada pengatur tekanan adalah 1000-6000 psi. Kolom yang digunakan biasanya mempunyai panjang berkisar antara 15-150 cm. Pengisi kolom biasanya adalah silika gel dan alumina. Pengisi kolom seperti partikel pellicular, yaitu butiran gelas yang dilapisi dengan materi yang berpori seperti silika gel, alumina, atau penukar ion, juga sering digunakan. Besar aliran fasa gerak dan sampel diatur dengan menggunakan pengendali aliran. Biasanya besar alirannya antara 0,5-20 mL/menit (Khopkar, 1990: 170).

Untuk penentuan kadar RBB dalam *dye-inulin* secara HPLC digunakan *oktadecylsilane* ODS C18 sebagai fasa diam. Sedangkan sebagai fasa gerak digunakan campuran metanol/air. Prinsip kerja HPLC adalah berdasarkan sifat kepolaran analit-analit yang akan dipisahkan.

Panjang gelombang maksimum untuk analisis secara HPLC ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis. Analisis HPLC dilakukan pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan tersebut.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan

1. Kadar RBB dalam *dye*-inulin yang ditentukan secara HPLC pada variasi massa 2 g inulin, 4 g inulin, dan 6 g inulin berturut-turut adalah 0,023 g, 0,115 g, dan 0,192 g.
2. Massa inulin terbanyak yang dapat bereaksi dengan RBB dalam pembentukan senyawa *dye*-inulin adalah 6 gram.
3. Kondisi optimum HPLC untuk menentukan kadar RBB dalam *dye*-inulin adalah dengan perbandingan eluen etanol : air (60 : 40) dan laju alir 1 mL/menit.

B. SARAN

Pada penelitian ini telah diperoleh variasi massa inulin yang paling baik dalam penentuan kadar RBB dalam *dye*-inulin yang dihasilkan. Pada penelitian selanjutnya dapat disarankan untuk

1. Menentukan kondisi optimum kadar RBB dalam *dye*-inulin yang dihasilkan dengan memvariasikan massa RBB yang digunakan.
2. Menentukan kondisi optimum kadar RBB dalam *dye*-inulin yang dihasilkan dengan memvariasikan waktu kontak yang digunakan dalam pemanasan pada reaksi pembentukan *dye*-inulin.

3. Menentukan kondisi optimum untuk menghilangkan gangguan atau pengotor dalam *dye*-inulin yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- 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 Juli 2010.
- Crittenden, R.G & M.J.Playne. 1996. Production, Properties and Applications of Food-grade Oligosaccharides Trends in Food Science and Technology 7, 353-361.
- Ekindini, Astrid Indrajati. 2006. Produksi FOS (Fruktooligosakarida) dari Tepung Inulin secara Hidrolisis Asam. Bogor: Intitut Pertanian Bogor.
- Firmansyah, Agus. 2007. Membentengi Anak Lewat Pencernaan (2). <http://www.sahabatnestle.co.id>. [18 Maret 2009].
- Franck, Anne; Leenheer, Leen De (2003). "Inulin". Email: ann.franck@orafti.com. Diakses 25 Maret 2004
- Gritter, R.J., J. M. Bobbitt. A.E Schwarting (1985). *Introduction to Cromatography*. Halden Day Inc Oakland, USA. Diterjemahkan oleh Padmawinata (1991). *Pengantar Kromatografi*. ITB Bandung.
- Gupta A.K., P. Rathore, N. Kaur and R. Singh, 1990, Production Thermal Stability and Immobilization Of Inulinase From *Fusarium oxysporum*, *J. Chem. Tech. Biotech.*, p:245- 251.
- Horiza, Hevi. 2009. Ekstraksi dan Karakterisasi Inulin dari Umbi Dahlia (*Dahlia*, Sp.L) Segar. Padang: FMIPA UNP.
- Johnson, Edward dan Robert Stevenson. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Bandung:ITB.
- Khopkar. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Leita,JTC; Martinelli,P; Murr,FEX; Park, KJ.(2004).Study of the inulin concentration by physical method. Proceedings of the 14th internasional drying symposium Brazil vol 8 868-875.
- Phelps,CF (1965). The physical properties of inulin solution. *Biochem.J* 95:41-47.
- Ricca, E; Calabro,V; Curcio, S; Iorio, G (2007). The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical Reviews in Biotechnology*. Jul-sep 2007129-145.
- Rukmana, R.(2004). *Dahlia Prospek Agribisnis dan Teknik Budi Daya*. Yogyakarta: Kanisius.
- R.A Day Jl/Al Underwood (1986). *Analisa Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga.