

# PERKEMBANGAN ANALISA GULA SECARA KLT DAN KCKT\*)

Julia Kantasubrata dan Sri Sumartini  
Puslitbang Kimia Terapan - LIPI

## INTISARI

Analisa gula memegang peranan penting, terutama dalam bidang pangan. Hingga saat ini masih selalu diusahakan mencari suatu metoda analisa gula yang spesifik, selektif, teliti, cepat dan tepat.

Gula dalam bahan makanan terdiri atas campuran monosakarida, disakarida dan trisakarida. Dengan metoda analisa konvensional dan spektrofotometri yang didasarkan pada sifat fisika atau reaksi kimia, kadar gula secara individual tidak dapat ditentukan.

Dengan munculnya teknik kromatografi, analisa gula secara individual mulai dapat dikembangkan. Kromatografi lapisan tipis (KLT) banyak dipakai pada analisa gula. KLT selalu populer karena sederhana, murah, cepat dan merupakan satu-satunya teknik yang dapat menganalisa beberapa cuplikan secara simultan.

Umumnya analisa gula pada KLT dilakukan di atas pelat silika. Pemisahan yang cukup memuaskan hanya dapat diperoleh apabila digunakan pelat silika yang sudah diimpregnasi dan dilakukan proses elusi berulang kali. Dalam usaha mempersingkat waktu analisa, telah dikembangkan jenis fasa diam yang baru untuk keperluan KLT, yaitu pelat HPTLC Si 50000.

Sejalan dengan perkembangan kolom fasa terikat, analisa gula dengan KCKT (Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi) mulai banyak dilakukan, menggunakan antara lain kolom penukar ion, kolom fasa terikat amina, kolom diol dan kolom C-18. Suatu cara pemisahan gula yang relatif baru menggunakan kolom silika dan eluen yang mengandung pereaksi poliamina telah dikembangkan beberapa tahun terakhir ini oleh WATERS. Teknik ini dinamakan "Silika Amine Modifier" (SAM), dimana reaksi pembentukan basa Schiff dapat dihindarkan, waktu hidup kolom menjadi lebih panjang dan dapat memberikan hasil pemisahan monosakarida yang lebih baik daripada teknik KCKT yang lain.

## ABSTRACT

Analysis of sugars plays an important role, mainly in foods. Up to now, the search of specific, selective, reproducible and accurate methods for sugar analysis is still being made.

Sugars in foods consist of monosaccharides, disaccharides and trisaccharides. Using conventional and spectrophotometric methods, which are based on measurement of physical properties or chemical reactions, such individual amount of sugars can not be determined.

The emergence of chromatographic techniques has initiated the development of individual sugar analysis. Thin layer chromatography (TLC) is widely used in sugar analysis, since it is simple, cheap, fast and it has a capability to analyse several samples simultaneously.

Commonly, TLC analysis of sugars is conducted using silica gel as stationary phase. Satisfactory separation could only be produced with impregnated silica plates and multiple TLC runs. In order to reduce the separation time, new stationary phase was developed. The rapid separation of sugars has been achieved by using HPTLC plates Si 50000.

In line with the development of bonded phase column, analysis of sugar using HPLC method has received considerable attention, using among others ion exchange columns, amino bonded silica phase, diol and C-18 columns.

A relatively new type of sugar separation with a silica based column and eluen containing polyamine reagent has been developed by WATERS. This technique is called a Silica Amine Modifier (SAM), in which the formation of Schiff base can be eliminated, the life time of the column becomes longer and better monosaccharide separation can be produced compared to other HPLC techniques.

\*) Sebagian dari makalah pernah dipresentasikan pada Kongres Ilmu Pengetahuan Nasional IV, Jakarta, 8-12 September 1986.

## PENDAHULUAN

Gula digolongkan dalam monosakarida, disakarida dan trisakarida, yang dalam bahan makanan umumnya jenis-jenis gula tersebut merupakan campuran. Analisa untuk menetapkan kadar berbagai jenis gula dalam bahan makanan merupakan suatu pekerjaan yang cukup sulit.

Metoda analisa konvensional dari sejumlah mono- di- dan trisakarida didasarkan pada pengukuran besaran fisika seperti osmometri, polarometri, hidrometri, dan refraktometri ataupun pada reaksi kimia dari gugus-gugus fungsional gula tersebut.

Hasil analisisnya hanya mampu menggambarkan kadar gula total atau semi total, dan tidak mungkin menentukan apakah gula tersebut glukosa, fruktosa, sakarosa atau bahkan campuran dari ketiganya. Analisa Luff Schoorl, Fehling, Somogyi dan Benedict merupakan metoda analisa kimia yang didasarkan pada reaksi gugus-gugus pereduksi dari gula (1,2). Untuk gula yang tak mempunyai gugus pereduksi, analisa dapat dilakukan dengan jalan menghidrolisanya terlebih dahulu sehingga dihasilkan gula pereduksi. Banyak laboratorium ternyata hingga sekarang masih menggunakan semua metoda konvensional tersebut di atas. Pemakaiannya terbatas pada analisa bahan makanan yang hanya mengandung satu atau dua macam gula saja, misalnya dalam industri sirup, minuman ringan, susu dan hasil olahannya.

Sejalan dengan berkembangnya teknik kromatografi, analisa yang selektif dari tiap jenis gula mulai dirintis (3) dengan menggunakan kromatografi lapisan tipis (KLT) dan kromatografi cairan tekanan tinggi (KCKT). Penelitian metoda analisa gula telah dikembangkan dengan menggunakan berbagai macam kolom. Jenis kolom yang digunakan pada analisa KCKT ini akan diuraikan secara lebih lengkap dalam makalah ini.

## ANALISA GULA DENGAN KROMATOLOGRAFI LAPISAN TIPIS (KLT)

Analisa gula menggunakan metoda KLT dimulai oleh Stahl dan Kaltenbach (4). Dua kelompok peneliti KLT lainnya Scherz (5) serta Ghebregzabher (6) kemudian mencoba merangkum hasil penelitian analisa gula dengan KLT. Sampai tahun 1984, penelitian analisa gula dengan KLT masih terus berlangsung (7)

terutama dalam usaha mengoptimasikan kondisi pemisahan menuju pada metoda analisa yang cepat dan tepat.

Fasa diam yang sering dipakai dalam analisa gula dengan KLT adalah tanah diatomea (kieselguhr), selulosa dan silika. Tanah diatomea mempunyai kelemahan karena mengandung pengotor yang dapat bereaksi dengan gula. Apabila dibandingkan dengan kieselguhr dan selulosa, fasa diam silika mempunyai kelebihan yaitu waktu analisa relatif cepat dan kapasitas noda relatif besar. Oleh sebab itu dari ketiga jenis fasa diam di atas, silika merupakan fasa diam yang paling banyak digunakan pada analisa gula dengan KLT.

Walaupun penelitian dengan fasa diam silika telah banyak dilakukan, tetapi hasil yang diperoleh sangat tidak memuaskan karena noda-noda yang dihasilkan berekor. Oleh sebab itu penelitian dengan fasa diam silika kemudian dilanjutkan dengan teknik impregnasi (8,9,10).

Impregnasi pada diam silika dapat dilakukan dengan mencampurkan impregnatan berupa garam anorganik atau asam lemah pada fasa diam. Garam-garam anorganik yang dipakai adalah garam natriumbisulfit, borat, tetraborat, fosfat, dan tungstat, sedangkan asam yang biasa digunakan sebagai impregnatan adalah asam borat.

Dari berbagai macam impregnatan tersebut di atas perlu diketahui impregnatan mana yang terbaik; Lato dan kawan-kawan (8) menyatakan bahwa masing-masing impregnatan mempunyai kelebihan dan kekurangannya tergantung dari jenis gula yang dianalisa dan eluen yang digunakan. Pemakaian natrium asetat dan dinatrium fosfat akan menghasilkan noda yang relatif lebih bundar dan efek difusi yang relatif lebih kecil. Selain itu, dinatrium fosfat menghasilkan warna noda yang lemah dan Rf yang lebih rendah. Pola pemisahan yang terjadi pada fasa diam yang diimpregnasi dengan ketiga jenis garam tersebut di atas akan berbeda dengan pola pemisahan yang dihasilkan oleh asam borat. Oleh sebab itu pada KLT dua dimensi, sering digunakan garam asetat atau fosfat sebagai impregnatan pertama dan asam borat sebagai impregnatan kedua.

Untuk suatu pemisahan yang baik, konsentrasi impregnatan dianjurkan antara 0,2-0,3 M. Konsentrasi yang lebih rendah atau lebih tinggi dapat menyebabkan pemisahan tidak efektif lagi. Akhir-akhir ini impregnatan tidak lagi dicampurkan pada fasa diam, melainkan dilarutkan dalam fasa gerak (7). Kelemahan dari cara ini adalah waktu elusi menjadi lebih lama dibandingkan dengan waktu elusi yang menggunakan sistim eluen tanpa impregnatan. Teknik impregnasi pada KLT, yang dilakukan dalam usaha mengefektifkan pemisahan ini hanya berlaku untuk gula sederhana (mono, di dan tri sakarida).

Pelat fasa terikat dengan gugus fungsional amina telah diteliti untuk analisa gula dengan menggunakan sistem eluen asetonitril/air. Ternyata dengan pelat amina dihasilkan noda yang berekor, hasil yang diperoleh ini menunjang hasil penelitian dari Brons & Olieman (11) yang menyebutkan bahwa penggunaan fasa diam amina untuk pemisahan gula mempunyai kendala, karena gugus karbonil bebas dari gula dapat bereaksi dengan gugus amina dari fasa diam. Untuk menghambat terjadinya reaksi ini Doner dan kawan-kawan (7) menambahkan sejumlah garam sebagai inhibitor, sehingga reaksi pembentukan basa Schiff antara gugus karbonil dari gula dan gugus amina dari pelat dapat dihambat. Hambatan pada reaksi pembentukan basa Schiff ini dapat terlihat dengan menghilangnya ekor dari noda yang semula tampak pada analisa gula di atas pelat amina tanpa penambahan garam.

Karena gula bersifat polar, maka eluen yang digunakan umumnya bersifat relatif polar. Pelarut organik yang digunakan

dalam sistim eluen biasanya merupakan campuran biner atau terner. Pada campuran biner atau terner tersebut sering ditambahkan air sekitar 10-20%. Masing-masing pelarut tersebut selain mengambil bagian dalam interaksi kromatografi, juga berfungsi untuk melarutkan komponen gula. Eluen yang biasa digunakan umumnya mengandung alkohol (propanol, isopropanol, butanol), asam-asam lemah (asetat, borat, fosfat) atau basa-basa lemah (amonia, piridin). Eluen yang mengandung piridin biasanya menghasilkan pemisahan yang paling efektif. (12).

Percobaan analisa glukosa, fruktosa dan sukrosa dalam molasse dari pabrik gula Palimanan Cirebon telah dilakukan dengan menggunakan KLT pelat aluminium Sheets Silika gel 60G - E. Merck dan campuran pelarut etil asetat/piridin/air {8/2/1} sebagai eluen (13): Sebelum digunakan, pelat diimpregnasi dengan larutan natrium fosfat 0,2 M sebanyak 3 kali. Setelah proses impregnasi, pelat dikeringkan pada temperatur 85 °C selama 45 menit dan didinginkan kembali pada temperatur kamar selama 2-3 jam.

Larutan standar gula (glukosa, fruktosa dan sukrosa) dibuat dengan konsentrasi 0,80; 1,60; 3,30; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00 dan 10,00 mg/ml dalam etanol 20%, sedangkan larutan contoh molasse dibuat dengan konsentrasi ± 20 mg/ml dalam 20% etanol. Larutan standar dan contoh tersebut kemudian ditotolkan sebanyak 1-2 µl, dengan diameter totolan tidak melebihi 1,5 mm.

Pelat kemudian elusi sebanyak 3 kali; setiap akhir elusi pelat dikeringkan pada temperatur kamar selama ± 1 jam. Visualisasi noda dilakukan dengan menyemprot pelat dengan larutan yang mengandung 4g difenilamin, 4 ml anilin, 30 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% dalam 200 ml aseton. Pelat kemudian dibiarkan di udara terbuka selama 15 menit dan setelah itu dipanaskan dalam oven, pada temperatur 110 °C selama 20 menit. Selain pereaksi anilindifenilamin, masih terdapat beberapa jenis bahan penampak noda yang lain, yang biasa digunakan untuk visualisasi noda pada analisa gula yaitu: Anisaldehyd-asam sulfat dan naftol-resorsinol-asam sulfat (Tabel 1).

Tabel 1. Reaksi Warna Senyawa Gula Pada Lapisan Tipis (14)

Gula	Anisaldehyd asam sulfat*	Naftol resorsinol asam sulfat*	Anilin difenilamina
L. Rhamnosa	hijau	hijau	hijau pucat
D-Ribosa	biru	-	-
D-Silosa	abu-abu	hijau muda	biru terang
L-Arabinosa	hijau kuning	hijau biru	biru terang
L-Sorbosa	ungu	merah	-
D-Fruktosa	ungu	merah hitam	merah padam
D-Manosa	hijau	biru muda	-
D-Glukosa	biru muda	biru ungu	abu-abu hijau
D-Galaktosa	hijau abu-abu	biru ungu	abu-abu hijau
Sukrosa	ungu	merah	merah muda
Maltosa	ungu	-	-
Laktosa	kehijauan	merah ungu	biru ungu

- Fasa diam : Kieselguhr G yang diimpregnasi dengan 0,02 M natrium asetat. Pelarut: Etil asetat/isopropanol 65% [65/35].
- Fasa diam : Silika gel G yang diimpregnasi dengan 0,1 N asam borat. Pelarut: Benzena/asam asetat glasial/metanol [20/20/60]
- Fasa diam : Silika gel G dibufferkan dengan asam borat atau natrium asetat.

Deteksi noda untuk analisa kuantitatif dilakukan dengan menggunakan Camag KLT Scanner dengan parameter-parameter sebagai berikut: panjang gelombang 365 nm, panjang slit 4 mm, lebar slit 0,6 mm, kecepatan kertas rekorder 40 mm/menit dan kecepatan scanning 2 mm/detik. Luas puncak kromatogram dihitung dengan jalan mengalikan tinggi puncak dengan lebar puncak pada setengah tinggi.

Aplikasi metoda ini untuk analisa glukosa, fruktosa dan sukrosa dalam molasse, memberikan harga simpangan baku relatif berturut-turut 7,6; 1,9 dan 11,6%. Perolehan kembali dari glukosa, fruktosa dan sukrosa yang ditambahkan ke dalam molasse berturut-turut adalah 86,9; 99,8 dan 83,9%.

Dari uraian tersebut di atas, kelemahan yang paling menonjol pada analisa gula dengan KLT adalah elusi yang berulang kali (3X) dengan waktu elusi yang relatif panjang (setiap akhir elusi pelat dikeringkan pada temperatur kamar selama  $\pm$  1 jam). Dalam upaya mempersingkat waktu elusi, diperkenalkan "HPTLC plates Si 50000" (15). Sebelum digunakan, pelat harus dibersihkan terlebih dahulu, dengan jalan mengelusnya dengan campuran kloroform/metanol [1/1] dan kemudian pelat diaktifkan kembali dengan jalan memanaskan dalam oven selama 30 menit pada temperatur 110 °C. Campuran mono-, di- dan trisakarida ditotolkan pada pelat dan setelah itu pelat dielusi dengan campuran asetonitril/air [17/3] [v/v] dengan jarak migrasi 7 cm. Pelat kemudian dikeringkan selama 5 menit dalam aliran udara panas dan elusi dilakukan 1 kali lagi, juga dengan jarak migrasi 7 cm. Dengan pelat jenis ini untuk jarak migrasi 2 x 7 cm dibutuhkan waktu 2 x 10 menit. Limit deteksi yang dapat dicapai dengan cara ini adalah 10 ng.

## ANALISA GULA DENGAN KROMATOGRAFI CAIRAN KINERJA TINGGI (KCKT)

Pemisahan gula pada kromatografi cairan mula-mula dilakukan dalam kolom penukar ion. Resolusi pemisahan yang lebih baik diusahakan melalui pemakaian resin dengan ukuran partikel yang lebih kecil. Waktu analisa yang semula relatif lambat (beberapa hari) dapat dipersingkat menjadi hanya beberapa jam saja.

Sejalan dengan perkembangan HPLC yang menggunakan fasa diam dengan butir partikel berukuran mikro, dikembangkan pula pembuatan penukar ion dengan bahan dasar silika. Dalam hal ini separuh bagian dari penukar ion terikat secara kimia pada inti silika. Penukar ion dari bahan dasar silika lebih tahan terhadap tekanan. Dengan bahan ini dapat digunakan kecepatan aliran eluen yang relatif besar, sehingga waktu analisa dapat dipersingkat. Selain itu, dengan bahan tersebut dapat dihasilkan selektivitas dan efisiensi pemisahan yang lebih baik.

Pemakaian fasa terikat, baik yang polar maupun yang tak polar pada aplikasi KCKT, menjadi sangat populer, telah dicoba pula pemakaian kolom amina, diol, C-18 dan kolom silika "amine modifier".

### KOLOM PENUKAR ION

Khym dan Zill (16) adalah peneliti-peneliti yang pertama kali memperkenalkan metoda pemisahan campuran gula yang telah terkomplekskan dengan borat pada kolom penukar anion. Mereka memisahkan campuran kompleks gula yang bermuatan negatif dengan teknik elusi bertahap dengan menggunakan larutan penyangga dari berbagai konsentrasi dan pH yang berbeda sebagai eluen. Selain kolom penukar anion, sering pula digunakan kolom penukar kation, seperti misalnya penukar kation  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ , dan  $\text{K}^{+}$  (3,11,17,18). Tetapi ternyata analisa gula dengan penukar ion memerlukan waktu analisa relatif panjang (60 jam). Penelitian analisa gula dengan kromatografi ion ini masih terus dilanjutkan antara lain dengan cara menaikkan temperatur kolom dan

mengganti resin dengan ukuran partikel yang lebih kecil, sampai akhirnya waktu analisa dapat makin dipersingkat. Dengan alat kromatografi ion otomatis buatan Technicon, Kesler (19) dapat melakukan analisa gula dalam waktu sekitar 5-6 jam.

Sejalan dengan perkembangan KCKT, muncul usaha untuk membuat fasa penukar ion yang stabil terhadap tekanan. Pada peralatan KCKT, kolom mengalami tekanan sebesar 1000-2000 psi. Bahan resin yang sifatnya relatif lunak, kurang tahan terhadap tekanan, sehingga mempunyai keterbatasan untuk dipakai pada kecepatan aliran eluen yang relatif tinggi. Dalam usaha membuat fasa penukar ion yang stabil terhadap tekanan, pertama-tama dicoba membuat penukar ion pelikular ("pellicular ionex-changers") dengan jalan melapisi butir gelas padat dengan lapisan tipis penukar ion. Ternyata bahan ini tidak memiliki kapasitas muat yang cukup memadai.

Kemudian dikembangkan bahan penukar ion yang dibuat dengan cara mengikat secara kimia gugus penukar ion pada permukaan silika. Partikel silika yang padat dan keras termasuk bahan pengisi kolom yang cukup stabil terhadap tekanan. Oleh karena itu dengan fasa diam yang dibuat dari bahan dasar silika dapat digunakan kecepatan aliran eluen yang relatif tinggi guna mempersingkat waktu analisa.

Pada penukar ion jenis ini biasanya digunakan partikel silika yang berpori, yang berikatan dengan suatu polimer yang mempunyai gugus-gugus fungsional berbentuk ion. Dengan bahan kolom jenis ini, analisa gula pada KCKT dengan kolom penukar ion dapat dilakukan dalam waktu yang relatif singkat yaitu 10-50 menit. Akan tetapi, waktu hidup kolom penukar ion relatif pendek. Setelah 20-30 kali injeksi, bagian ujung kolom akan berubah menjadi hitam dan untuk itu perlu diganti dengan sejumlah resin yang baru. Selain itu, kolom penukar ion setelah beberapa waktu harus diregenerasi secara berkala (8 jam untuk setiap regenerasi), kapasitas muat kolom ini sangat rendah dan memerlukan temperatur operasi kolom yang cukup tinggi.

Contoh yang mempunyai kadar ion atau garam sangat tinggi memerlukan perlakuan pendahuluan karena kadar garam yang sangat tinggi akan mempengaruhi waktu elusi sehingga tidak dapat diperoleh puncak yang cukup memadai untuk keperluan pengukuran kuantitatif. Kolom penukar ion kurang disukai, karena untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik dibutuhkan temperatur kolom yang tinggi. Selain itu kolom penukar ion memerlukan regenerasi secara berkala dan mempunyai waktu hidup yang relatif pendek.

### KOLOM FASA TERIKAT AMINA

Pemisahan campuran gula sederhana pada kolom fasa terikat amina dilaporkan pertama kali pada tahun 1975 oleh Palmer (20) dan sejak itu kolom amina banyak digunakan untuk keperluan analisa rutin gula-gula sederhana. Munculnya fasa terikat polar amina mengalihkan pemakaian kolom penukar ion untuk analisa gula pada kolom amina. Selama bertahun-tahun pemisahan gula dilakukan dengan kolom ini dengan campuran asetonitril/air 75/25 sebagai eluen (21,22).

Baru kemudian pada tahun 1983, Brons dan Olieman (11) dalam suatu publikasinya menyatakan bahwa pemisahan gula pada kolom amina dapat melibatkan reaksi antara gugus amina dari fasa diam itu sendiri dengan gugus karbonil dari molekul-molekul gula yang dianalisa membentuk basa Schiff. Terjadinya reaksi ini dapat menyebabkan kesalahan yang sangat besar karena sebagian gula tertinggal di dalam kolom. Dari hasil penelitian Brons terlihat bahwa kesalahan analisa yang diperoleh berkisar

antara 0-100%, tergantung dari jenis, temperatur dan umur kolom. Kesalahan yang relatif kecil didapatkan apabila digunakan kolom yang telah lama dipakai. Pada kolom tersebut, dapat dikatakan hampir tidak ada lagi gugus-gugus amina dari fasa diam yang masih bebas bereaksi karena telah jenuh terhadap pembentukan basa Schiff.

Brons kemudian menyimpulkan bahwa terjadinya reaksi di atas merupakan sebab utama dari waktu hidup kolom fasa terikat amina yang relatif pendek. Setelah sejumlah tertentu analisa/injeksi, puncak-puncak kromatogram yang dihasilkan kolom tersebut makin menjadi tak simetris dan terjadi pula evolusi waktu retensi.

Sebenarnya kemungkinan terjadinya reaksi pembentukan basa Schiff antara fasa diam dan molekul-molekul gula telah banyak dibicarakan di kalangan ahli kromatografi, jauh sebelum hasil penelitian Brons dan Olieman dilaporkan. Para peneliti mencoba mencari kemungkinan penggunaan jenis fasa diam yang lain sebagai pengganti fasa terikat amina.

### KOLOM FASA TERIKAT DIOL

Fasa terikat diol  $[Si-O-Si-(CH_2)_3-O-CH_2-(OH)-CH_2(OH)]$ , telah dicoba untuk digunakan pada pemisahan gula, dengan maksud melibatkan interaksi antara gugus OH dari fasa diol dengan gugus-gugus OH dari gula ke dalam mekanisme retensi. Dengan adanya perbedaan letak gugus-gugus OH dari tiap jenis gula diharapkan akan terdapat perbedaan yang cukup selektif pada retensi masing-masing jenis gula tersebut.

Telah dicoba untuk menginjeksikan campuran larutan gula ke dalam kolom Lichrosorb Diol-E Merck dan faktor kapasitas ( $k'$  yaitu  $t_r-t_0/t_0$ ) dari masing-masing jenis gula dapat dilihat pada Tabel 2. Pemisahan yang diperoleh cukup baik, tetapi dari pengamatan ternyata bahwa fasa diam Diol di dalam kolom dapat membengkak (*swelling*), jika air dipakai sebagai salah satu campuran eluen. Pembengkakan tersebut diduga disebabkan karena terjadi reaksi polimerisasi pada pambuan fasa Diol.

Tabel 2 :  $k'$  Gula pada Kolom Lichrosorb Diol.

Jenis Gula	$k'$
Rhamnosa	0,55
Xylosa	0,72
Fruktosa	0,93
Glukosa	1,17
Galaktosa	1,24
Sukrosa	1,88

Herman (25) menerangkan bahwa pembuatan fasa diol dapat menghasilkan bentuk polimer atau monomer tergantung dari cara bagaimana fasa tersebut dibuat. Jika yang diharapkan terjadi adalah bentuk monomerik, maka reaksi antara gugus-gugus silanol dari permukaan silika dengan GOX (glisidoksipropiltrimetoksisilan) harus berlangsung dalam media toluen anhidrat. Tetapi sebaliknya jika yang diharapkan bentuk polimerik, maka ke dalam campuran reaksi hendaknya ditetaskan sedikit air. Menurut keterangan perusahaan (E.Merck), Lichrosorb Diol yang digunakan hanya terdiri dari bentuk monomer, tetapi ditinjau dari mekanisme reaksi pembuatannya terlihat bahwa reaksi yang berlangsung tidak cukup selektif dalam menghasilkan suatu fasa

terikat yang 100% monomer. Terjadinya sebagian bentuk polimer rupanya tidak dapat dihindarkan dan terdapatnya bentuk polimer inilah yang merupakan sebab utama terjadinya pembengkakan.

Secara visual, pembengkakan ini dapat diamati dengan naiknya tekanan pada pompa secara terus-menerus, selama kolom disetimbangkan dengan eluen. Tekanan yang selalu berubah ini tidak memungkinkan pengerjaan analisa yang tepat karena waktu retensi komponen selalu berubah.

Terjadinya pembengkakan ini sebenarnya dapat dikurangi jika eluen tidak terlalu banyak mengandung air. Tetapi untuk pemisahan gula ini, mengurangi jumlah air dari eluen berarti memperkecil kelarutan gula di dalam eluen. Hal ini justru harus dihindarkan karena dapat mengakibatkan puncak komponen melebar (ber ekor), resolusi pemisahan akan menjadi lebih buruk dan yang lebih parah lagi ada kemungkinan sebagian gula akan mengendap di dalam kolom.

Selanjutnya dapat disimpulkan bahwa bila ternyata kolom diol tidak memberikan harapan, maka harus dipikirkan untuk mencari fasa diam lain. Kelihatannya kromatografi fasa terbalik dengan kolom tak polar (C-2, C-8 dan C-18) dapat memberikan harapan. Di dalam kromatografi fasa terbalik, air selalu dipakai sebagai campuran eluen dan hal ini sesuai jika kita kaitkan dengan kelarutan yang baik dari gula dalam air.

### KOLOM FASA TERIKAT C-18

Pemisahan gula invert, sukrosa dan rafinosa dilakukan pada kolom C18 (26). Di dalam suatu penelitian pendahuluan (27) telah dicoba melakukan pemisahan 10 jenis monosakarida, 5 jenis disakarida dan rafinosa melalui kromatografi fasa terbalik pada kolom RP-18, E, Merck: dengan menggunakan hanya air sebagai eluen (Tabel 3).

Ternyata pada kondisi ini masing-masing monosakarida tidak dapat dipisahkan karena setiap monosakarida keluar dalam waktu yang hampir bersamaan, segera setelah  $t_0$  (waktu retensi puncak pelarut). Jadi terlihat hampir tidak ada retensi komponen di dalam kolom.

Tabel 3:  $k'$  Gula pada Kolom RP-18

Jenis Gula	$k'$
Monosakarida	
- Triosa	D. Gliseraldehid 0,87
- Pentosa	Silosa 0,23
	Ribosa 0,39
- Heksosa	Glukosa 0,31
	Galaktosa 0,31
	Sorbosa 0,31
	Fruktosa 0,34
	Mannosa 0,34
	Rhamnosa 0,48
	Digitosa 0,74
- Disakarida	Laktosa 0,35
	Melibiosa 0,42
	Trehalosa 0,48
	Selobiosa 0,58
	Sakarosa 0,74
- Trisakarida	Rafinosa 1,38

Yang perlu diusahakan selanjutnya adalah mencoba agar kolom dapat menahan lebih lama komponen gula, sekaligus menghasilkan retensi yang lebih selektif untuk tiap jenis gula. Untuk maksud tersebut, yang perlu dicoba adalah analisa gula dengan kromatografi pasangan ion (suatu modifikasi dari kroma-

tografi fasa terbalik). Dengan jenis kromatografi ini, diusahakan untuk memodifikasi fasa diam (umumnya yang tak polar) agar sedikit berubah sifatnya sehingga dapat menahan komponen dengan lebih kuat dan selanjutnya komponen dapat dipisahkan secara lebih selektif pada fasa tersebut (28). Persoalan utama adalah mencari jenis pasangan ion yang sesuai, yang tampaknya harus dicari dengan sistim coba-coba, karena praduga teori dalam hal ini belum dapat berbicara banyak.

#### KOLOM SILIKA "AMINE MODIFIER"

Masih dalam usaha mengatasi kendala yang dihadapi dalam pemakaian kolom fasa terikat amina dengan umur kolom yang relatif pendek, beberapa penelitian berusaha mencari modifikasi dari jenis kolom ini. Pada tahun 1978, Aitzetmuller (29,30) mencoba menggunakan pereaksi polifungsional amina (NATEC Amine Modifier 1) untuk memodifikasi permukaan suatu kolom silika. Di dalam penggunaannya, pereaksi amina tersebut dicampurkan pada eluen dan diharapkan selama kolom disetimbangkan dengan eluen, pereaksi amina yang terdapat di dalam eluen tersebut dapat memodifikasi permukaan silika. Gugus polifungsional amina yang terikat pada permukaan silika ini dianggap sudah tidak reaktif lagi, sehingga pembentukan basa Schiff dapat dihindari. Ternyata kolom silika yang dimodifikasi ini mampu memisahkan campuran gula sederhana, sama baiknya seperti pada fasa terikat amina. Wheals dan White (31) juga melaporkan hasil penelitiannya dengan menggunakan berbagai jenis amina untuk melapisi/memodifikasi kolom silika. Mereka menyimpulkan bahwa setiap jenis amina menghasilkan retensi dan kemampuan yang juga berbeda dalam memisahkan komponen-komponen gula.

Salah satu jenis pereaksi polifungsional amina yang kemudian juga banyak dipakai oleh para peneliti lain (31,32,33,34) adalah TEPA (Tetraetilenpentamin). Dalam usaha menggantikan pereaksi TEPA yang relatif sukar diperoleh dalam keadaan dan kualitas yang sama, WATERS (35) mencoba memproduksi pereaksi SAM-1 dan SAM-2. Dilaporkan kemudian bahwa dengan pereaksi SAM-1 dapat diperoleh resolusi pemisahan yang sama baiknya seperti pada kolom amina atau kolom silika yang dimodifikasi dengan pereaksi TEPA. Selain itu dilaporkan bahwa dengan pereaksi tersebut dapat diperoleh garis dasar (base line) yang relatif stabil. Pereaksi SAM-2 dibuat untuk memberikan pemisahan yang sedikit berbeda dari pereaksi SAM-1. Pereaksi SAM-2 dikhususkan bagi pemisahan monosakarida dan pereaksi ini mampu memisahkan fruktosa, galaktosa dan glukosa, suatu hal yang tidak mungkin dapat dicapai baik oleh TEPA maupun SAM-1. Tetapi penggunaan pereaksi SAM-2 hanya efektif pada batas daerah konsentrasi asetonitril yang relatif sempit (80-87%) dibandingkan terhadap batas konsentrasi asetonitril yang digunakan pereaksi SAM-1 atau kolom amina (70-85%). Karena alasan inilah maka pereaksi SAM-2 hanya digunakan untuk memisahkan jenis-jenis gula yang tidak terpisahkan dengan baik pada kolom-kolom yang lain.

Telah dicoba pemakaian pereaksi SAM-1 pada pemisahan gula (36) dalam aplikasinya untuk berbagai macam keperluan seperti: memantau proses fermentasi jambu mete (37,38), memeriksa kandungan sukrosa, glukosa dan fruktosa dalam gula nira (39) serta memantau proses degradasi sukrosa yang terjadi pada air nira, pada saat penampungan dan selama waktu penyimpanan (sebelum air nira tersebut diproses menjadi gula). Ternyata air nira yang baru disadap dari pohonnya, hanya mengandung sukrosa saja. Oleh aksi mikroorganisme, sukrosa tadi dapat terurai menjadi glukosa dan fruktosa. Kandungan glukosa dan fruktosa yang relatif tinggi tidak dikehendaki karena dapat menjadikan gula yang terbentuk tidak cukup keras. Untuk analisa gula ini

telah dicoba pula untuk melakukan studi perbandingan metoda HPLC dengan cara Nelson Somogyi (spektrofotometer). Berdasarkan hasil yang diperoleh (37) dapat disimpulkan bahwa antara metoda HPLC dan metode Spektrofotometri terdapat korelasi yang cukup baik. Selain itu metoda HPLC menawarkan keunggulan pemisahan dan penentuan gula secara individual.

#### KESIMPULAN

Penelitian di bidang analisa gula masih memerlukan banyak perhatian. Metoda kromatografi terlihat memberikan harapan untuk dapat menyelesaikan masalah analisa yang cukup rumit ini.

Analisa gula menggunakan TLC banyak dilakukan pada pelat silika yang telah diimpregnasi dan sejak tahun 1990 telah pula diperkenalkan pelat HPTLC Si 50000 yang diperuntukkan khusus untuk pemisahan gula.

Metoda pemisahan gula secara HPLC menggunakan kolom amina sempat merupakan metoda yang banyak dipakai selama bertahun-tahun. Baru kemudian keluar pernyataan bahwasanya pemisahan gula pada kolom amina dapat melibatkan reaksi antara gugus karbonil dari gula dengan gugus amina dari fasa diam membentuk basa Schiff. Dengan tujuan mengelimasi pembentukan basa Schiff, pemisahan gula kemudian banyak dilakukan pada kolom yang mengandung gugus polifungsional amina yang sudah tidak reaktif lagi.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. A.M.L. Hart, H.J. Fischer, *Modern Food Analysis*, Springer Verlag, New York, 1972.
2. K. Robards, M. Whitelaw, *Chromatography, of Monosaccharides and Disaccharides*, *J. Chromatogr.*, 373: 81-110 (1986).
3. E.C. Conrad, J.K. Palmer, *Rapid analysis of carbohydrates by High-Pressure Liquid Chromatography*, *Food Technology*, 30:84-92 (1976).
4. E. Stahl, U. Kaltenbach, *Trace Analysis of Sugar Mixtures on layers of Kieselguhr* *G. J. Chromatogr.*, 5: 50-61 (1961).
5. H. Scherz, G. Stehlik, E. Bancher, K. Kaindl, *Thin Layer Chromatography of Carbohydrate*, *Chromatogr Rev.*, 10: 1-30 (1968)
6. M. Ghebrezabher, S. Rufini, G.M. Safia, M. Lato, *Improved thin-layer chromatography methods for sugar separations*, *J. Chromatogr.*, 180: 1-15 (1979).
7. L.W. Doner, L.M. Biller, *High Performance Thin Layer Chromatographic-separations of sugars; preparation and application of aminopropyl bonded phase silica plates impregnated with monosodium phosphate*, *J. Chromatogr.*, 287:391 (1984).
8. M. Lato, B. Brunelli, G. Ciufanni, *Thin layer chromatography of carbohydrate on silica gel impregnated with sodium acetate, monosodium acetate and disodium phosphate*, *J. Chromatogr.*, 39: 407-417 (1969).
9. L. Bruce, P. Welch, E. Martin, *Quantitative analysis of sugars by densitometric inspection of thin layer chromatogram; analysis methods*, *J. Chromatogr.*, 72: 359-364 (1972).
10. R. Gauch, U. Leuneunberger, E. Baumgartner, *Quantitative determination of mono-, di- and trisaccharides by thin-layer chromatography*, *J. Chromatogr.*, 72: 359-364 (1972).
11. C. Brons and C., Olieman. *Study of the high performance liquid chromatography separation of reducing sugar applied to*

- the determination of lactose in milk. *J. Chromatogr.*, 259: 79-86 (1983).
12. J.L. Kwan, N. David and Z. Albert, Determination of glucose, fructose and sucrose in molasses by high performance thin layer chromatography, *J. Chromatogr.*, 174 (1979) 187-193.
  13. S. Sumartini, J. Kantasubrata, Analisa Glukosa, Fruktosa dan Sukrosa dari molasse menggunakan KLT yang di Impregnasi, Proceedings Kongres Nasional ke 3 dan Seminar Ilmiah Himpunan Kimia Indonesia, Jakarta, Juli 7-9, 1988, hal. 463-472.
  14. E. Stahl, Thin layer Chromatography-A Laboratory Handbook, Springer Verlag, 2nd edition, 1969.
  15. W. Funk, F. Gilles, S. Netz, K. Patsch, Let's make things hot for sugars, *MERCK Spectrum*, I: 14-15 (1990)
  16. J.X. Khym, L.P. Zill, The separation of sugars by ion exchange *J. Am. Chem. Soc.*, 74:2090 (1952).
  17. R.R. Rojas, R.E. Lee, J.G. Baust, D.L. Hendrix, D. Friday, H. James, Comparative Separation of Low Molecular Weight Carbohydrates and Polyols by HPLC: Radially Compressed Amine Modified Silica Versus Ion Exchange". *J. Chromatogr.*, 261: 65-75 (1983).
  18. R.C. Pettersen, V.H. Schwandt, J.J. Efland, An Analysis of the Wood Sugar Assay using HPLC: A Comparison with Paper Chromatography, *J. Chrom. Sci.*, 22: 478-484 (1984).
  19. R.B. Kesler, Rapid quantitative anion-exchange chromatography of carbohydrates, *Anal. Chem.*, 39: 1416-1422 (1967).
  20. J.K. Palmer, W.B. Brandes, Determination of sucrose, glucose, and fructose by liquid chromatography, *J. Agr. Food Chem.*, 22: 709-712 (1974).
  21. Rippahn. Chromatographie dans l'analyse alimentaire, Manuel pour le praticien, E. Merck, Darmstadt, 94 (1981).
  22. V. Pechanek, G. Blaicher, W. Pannhauser, H. Woidich, Application of column Liquid Chromatography (HPLC) to Special Problems in Food Chemistry, *Chromatographia*, 13: 421-427 (1980).
  23. Julia Kantasubrata, Etude des Proprietes Chromatographiques de la Phase Diol, Rapport de Stage de DEA (Diplome D'Etudes Approfondies), Universite D'AIX Marseille III - France, 1983.
  24. A.M. Siouffi, J. Kantasubrata, G. Guiochon, Evaluation of the potentialities of diol column in normal and reversed phase liquid chromatography, Proceedings of the 15th international symposium on chromatography, Nurnberg, 1984, pp.173.
  25. D.P. Herman, L.R. Field and Abboth, The size exclusion chromatographic behavior of syntetic water-soluble polymers on diol bonded phase supports, *J. Chromatogr. Sci.* 19:470-76 (1981).
  26. G. Palla, C18 reversed-phase liquid chromatographic determination of invert sugar, sucrose, and raffinose, *Anal. Chem.* 53: 1966 (1981).
  27. J., Kantasubrata, S. Sumartini, Problems on sugars analysis by chromatographic method. Proceedings of Ninth Australian Symposium on Analytical Chemistry, 1: 230-233 (1987).
  28. J. Kantasubrata, tidak diterbitkan.
  29. K. Aitzetmuller, Sugar analysis by high performance liquid chromatography using silica columns, *J. Chromatogr.*, 156:156 (1978).
  30. K. Aitzetmuller, M. Bohr, E. Arzberger, Separation of Higher Sugars using HPLC Amine Modifier, *J. of H.R.C. & C.C.*, 2: 589 (1979).
  31. B.B. Wheals, P.C. White, In-situ modification of silica with amines and its use in separating sugars by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 176:421 (1979).
  32. D.L. Hendrix, R.E. Lee Jr., J.G. Baust, H. James, Separation of Carbohydrates and polyols by a radially compressed high performance liquid chromatographic silica column modified with tetrathylene pentamine, *J. Chromatogr.*, 210: 45 (1981).
  33. J.G. Baust, R.E. Lee Jr., R.R. Rojas, D.L. Hendrix, D. Friday, H. James, Comparative separation of low-molecular weight carbohydrates and polyols by high-performance liquid chromatography: Radially compressed amine modified silica versus ion exchange, *J. Chromatogr.*, 261: 65 (1983).
  34. R.E. Lee Jr., D. Friday, R.R. Rojas, H. James, J.G. Baust, An evaluation of eluent recycling and column life for HPLC analysis of carbohydrates, *J. of Liq Chromatogr.*, 6:1139-1151 (1983).
  35. Choosing the right column chemistry for carbohydrate analysis. *Notes Food & Beverage, Waters Chromatography Division Millipore Corporation* 2: 4-6 (1987).
  36. S. Sumartini, J. Kantasubrata, The determination of sugars by chromatographic method, makalah dipresentasikan pada International Chemistry, Brisbane, 28 August-2 September 1989.
  37. J. Kantasubrata, A.T. Karossi dan A.S. Pramudi, HPLC in the analysis of cashew apple juice fermentation broths, makalah dipresentasikan pada International Conference: Biotechnology and Food, Stuttgart, 20-24 Februari 1989.
  38. Julia Kantasubrata dan A.T. Karossi, Alternative methods used for monitoring cashew-apple fermentation process, Food Forum Proceedings, Chemistry International, Brisbane, 1989, hal. 133.
  39. Soemanto Imamkhasani, Julia Kantasubrata, Sri Sumartini, Analysis of Mono and Disaccharides in Indonesia Palm Sugars using HPLC method, *J. Chromatogr. Sci.*, 27:676-679 (1989).