



PENENTUAN KADAR FRUKTOSA HASIL HIDROLISIS INULIN DENGAN DNS SEBAGAI PENGOKSIDASI

Ruswandi¹⁾ Budhi Oktavia²⁾ Minda Azhar^{3*)}

^{1,2,3)}Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Negeri Padang
e-mail^{3*)}: minda@fmipa.unp.ac.id
DOI : 10.24036/eksakta/vol19-iss01/102

ABSTRACT

The content of fructose that produced by hydrolysis of inulin can be easily and practically determined by DNS reagent. The aim of this study is to determine the optimum condition of reaction between fructose and DNS reagent for determining the content of fructose produced by hydrolysis of inulin. The equipment used in this study are spectronic 20 D and HPLC. The mobile phase that used in HPLC is ethanol:water with various ratio. The column that used in this study ODS C-18, C-8 and CLC-Sil. The reaction between fructose and DNS reagent has λ_{maks} 499 nm, the optimum volume of fructose solution is 100 μ L, the optimum pH of fructose is 4.5 and the stability time of color of reduced DNS is in the minutes of 30th. The result of reduced DNS analysis using HPLC doesn't give the good separation at column ODS C-18 and CLS-Sil with several variations of mobile phase of ethanol:water. The contents of fructose that produced by hydrolysis of inulin with 0,5%, 1% and 2,5% concentrations of inulin are 183.6 μ g/mL, 295.6 μ g/mL and 512.6 μ g/mL.

Keywords : inulin, inulinase, fructose, DNS, HPLC, Spectronic 20 D

PENDAHULUAN

Penggunaan inulin di bidang industri pangan sangat pesat, khususnya pada industri minuman dan makanan. Inulin dapat dijadikan *raw material* pembuatan fruktosa dan FOS (fruktooligosakarida). Inulin merupakan polimer yang mengandung 2 sampai 70 unit fruktosa. Fruktosa pada inulin dihubungkan satu sama lain oleh ikatan β -2,1 fruktosil-fruktosa. Pada ujung polimer inulin dapat terikat glukosa (Franck, De Lenheer, 2003). Hidrolisis inulin menghasilkan gula pereduksi yaitunya fruktosa dan FOS. 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). Dengan demikian, pembuatan fruktosa dari hidrolisis inulin lebih efektif dan efisien dibandingkan dengan pati.

Enzim inulinase merupakan biokatalis hidrolisis inulin menghasilkan FOS atau fruktosa. Enzim ini dapat dihasilkan oleh bakteri, jamur, maupun tumbuh-tumbuhan. Enzim inulinase juga terdapat pada bakteri yang diisolasi dari rizosfer 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, O., Barna, O., 2013).

Fruktosa dan FOS termasuk kelompok gula pereduksi. Kadar 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 ini awalnya berwarna kuning bereaksi dengan fruktosa akan menghasilkan warna jingga kemerahan (Kusmiati dan Agustini N. W. S, 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}). 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 N. W. S, 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.

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-5-nitrosalisilat. Apabila terdapat gula pereduksi pada sampel, maka larutan DNS 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 N. W. S, 2010).

Berdasarkan uraian di atas peneliti tertarik menentukan kondisi optimum reaksi oksidasi reduksi antara fruktosa dengan reagen DNS serta mengujinya menggunakan spektroskopik 20 D dan HPLC. Kondisi analisis yang diperoleh digunakan untuk penentuan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin.

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang dari April 2017 sampai dengan Agustus 2017.

B. Alat dan Bahan

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari HPLC merek Agilent tipe 1120, Spektroskop Genesys 20 D, autoclav, inkubator, oven, *hot plate*, pipet mikro, erlenmeyer 50 mL, tabung mikro, lampu spiritus.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah crude inulinase, inulin, reagen DNS, larutan fruktosa sebagai standar, larutan CH_3COOH 0,2 M, larutan CH_3COONa 0,2 M, larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, etanol p.a.

C. Prosedur Penelitian

1. Ekstraksi crude enzim

Single coloni bakteri mesofilik dimasukan dalam medium cair 2 mL pada Erlenmeyer 50 mL dan dishaker selama 18-20 jam. Kultur bakteri dipipet 1,5 mL, kemudian dipindahkan ke medium cair 15 mL dan dishaker selama 20 jam. kultur bakteri tersebut dipindahkan ke dalam tabung mikro untuk disentrifus pada 12.000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan yang telah terpisah dari endapan bakteri dipipet ke dalam tabung mikro steril. Ekstrak ini merupakan crude enzim yang digunakan untuk menghidrolisis inulin menjadi fruktosa dan FOS.

2. Optimasi hasil reaksi fruktosa dengan reagen DNS

a. Penentuan λ_{maks} larutan fruktosa dengan reagen DNS

Tabung mikro diisi dengan 50 μL larutan fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$. Reagen DNS ditambahkan sebanyak 150 μL . Kemudian tabung mikro dipanaskan pada air mendidih selama ± 10 menit. Tabung mikro didinginkan pada suhu ruang, setelah itu ditambahkan aquades sebanyak 700 μL . Diukur serapannya pada panjang gelombang 300 sampai dengan 700 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

b. Penentuan volume optimum larutan fruktosa.

Tabung mikro diisi masing-masing dengan (50 μL , 60 μL , 70 μL , 80 μL , 90 μL , 100 μL , 110 μL dan 120 μL) larutan fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$. Reagen DNS ditambahkan sebanyak 150 μL , kemudian tabung mikro dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Tabung mikro didinginkan pada suhu ruang, setelah itu ditambahkan aquades sebanyak 700 μL . Absorbansi diukur pada λ_{maks} 499 nm.

c. Penentuan pH optimum fruktosa.

Tabung mikro diisi dengan volume optimum larutan fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$ yang telah ditentukan. Tabung mikro diisi sebanyak 100 μL buffer asetat 0,2 M (3,5; 4; 4,5; 5; dan 5,5) dan buffer fosfat 0,2 M (6; 7; dan 8). Reagen DNS ditambahkan pada masing-masing tabung mikro sebanyak 150 μL . Tabung mikro dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Tabung mikro didinginkan pada suhu ruang dan ditambahkan 700 μL aquades. Absorbansi diukur menggunakan spektrometri pada λ_{maks} 499 nm.

e. Penentuan waktu kestabilan fruktosa dengan reagen DNS.

Tabung mikro diisi dengan volume optimum larutan fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$ yang telah ditentukan. Tabung mikro diisi sebanyak 100 μL dengan buffer asetat 0,2 M pada pH 4,5. Reagen DNS ditambahkan sebanyak 150 μL pada tabung mikro. Tabung mikro dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Tabung mikro didinginkan pada suhu ruang dan ditambahkan 700 μL aquades. Absorbansi diukur pada λ_{maks} 499 nm dengan variasi lama waktu 0-90 menit dengan rentang waktu pengukuran nilai absorbansi 10 menit sekali. Waktu kestabilan warna diperoleh dari nilai absorbansi yang tetap selama kurun waktu tertentu.

f. Penentuan konsentrasi reagen DNS optimum dengan fruktosa yang bereaksi.

Tabung mikro diisi dengan volume optimum larutan fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$ yang telah ditentukan. Tabung mikro diisi sebanyak 100 μL dengan buffer asetat 0,2 M pada pH 4,5. Reagen DNS ditambahkan dengan variasi konsentrasi (5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM dan 50 mM) sebanyak 150 μL pada masing-masing tabung mikro. Tabung mikro dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Tabung mikro didinginkan pada suhu ruang, dan ditambahkan 700 μL aquades. Tabung mikro didiamkan pada waktu kestabilan warna terbentuk (30 menit). Absorbansi diukur pada λ_{maks} 499 nm.

3. Penentuan kandungan fruktosa dengan reagen DNS menggunakan HPLC.

a. Prosedur kerja secara umum penggunaan HPLC

Prosedur kerja secara umum penggunaan HPLC adalah panjang gelombang (λ_{maks}) ditentukan terlebih dahulu dengan menggunakan spektrofotometer UV- Vis. Pada analisis dengan HPLC fasa gerak dialirkan dengan kecepatan alir 1 mL/menit sehingga diperoleh *base line* yang stabil. Setelah itu diinjeksikan blanko terlebih dahulu kemudian baru diinjeksikan sampel. Data yang diperoleh berupa kromatogram.

b. Variasi perbandingan fase gerak untuk analisis reaksi antara fruktosa dengan reagen DNS.

Tabung mikro diisi dengan volume optimum larutan fruktosa 500 $\mu\text{g/mL}$ yang telah ditentukan. Tabung mikro ditambahkan sebanyak 100 μL dengan buffer asetat 0,2 M pada pH 4,5. Reagen DNS ditambahkan dengan konsentrasi optimum sebanyak 150 μL . Tabung mikro dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Tabung mikro didinginkan pada suhu ruang dan ditambahkan 700 μL aquades. Tabung mikro didiamkan pada waktu kestabilan warna terbentuk (30 menit) dan diukur pada λ_{maks} 499 nm. Sebanyak 20 μL diinjeksikan ke dalam 3 tipe kolom yang berbeda kolom C-18, kolom C-8 dan kolom CLC-Sil menggunakan fase gerak campuran etanol-air. Komposisi fase gerak yang memberikan pemisahan terbaik dipilih berdasarkan waktu retensi (t_R) dan luas puncak.

4. Penentuan kurva larutan standar fruktosa.

Larutan standar fruktosa dengan konsentrasi 100-900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yang telah diencerkan dari larutan induk fruktosa 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Masing-masing tabung mikro dipipet sebanyak 100 μL . Tabung mikro ditambahkan sebanyak 100 μL buffer asetat 0,2 M pada pH 4,5. Reagen DNS ditambahkan pada konsentrasi optimum sebanyak 150 μL . Tabung mikro dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Tabung mikro didinginkan pada suhu ruang dan ditambahkan 700 μL aquades. Tabung mikro didiamkan selama waktu kestabilan warna terbentuk (30 menit). Absorbansi diukur dengan spektrometri 20 D pada λ_{maks} 499 nm. Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan nilai absorbansi yang dihasilkan.

5. Penentuan kadar fruktosa dari hidrolisis inulin dengan variasi konsentrasi 0,5 %, 1 %, dan 2,5 % dengan menggunakan spektrometri 20 D.

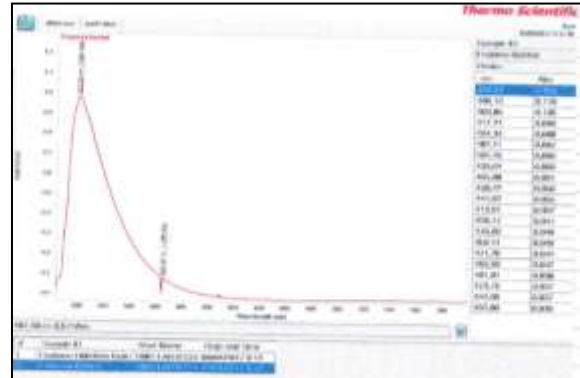
Masing-masing tabung mikro diisi dengan dengan 50 μL larutan inulin dengan variasi konsentrasi 0,5 %, 1 %, dan 2,5 % dan 50 μL crude enzim. Tabung mikro diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Tabung mikro ditambahkan 50 μL buffer asetat 0,2 M pH 4,5. Reagen DNS ditambahkan pada konsentrasi optimum (30 mM) sebanyak 150 μL . Tabung mikro dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Tabung mikro didinginkan pada suhu ruang dan ditambahkan 700 μL aquades. Tabung mikro didiamkan 30 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrometri 20 D pada λ_{maks} 499 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Optimasi Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS.

a. λ_{maks} Larutan Fruktosa dengan Reagen DNS.

Penentuan λ_{maks} larutan fruktosa dengan reagen DNS bertujuan untuk mendapatkan nilai absorbansi maksimum yang dapat memberikan sensitivitas pengukuran yang paling baik. Pengukuran ini dilakukan dengan alat spektrofotometer UV-Vis pada kisaran 300-700 nm. Hasil pengukuran λ_{maks} larutan fruktosa dengan reagen DNS dimuat pada Gambar 1. Nilai absorbansi paling besar terdapat pada λ_{maks} 499 nm.

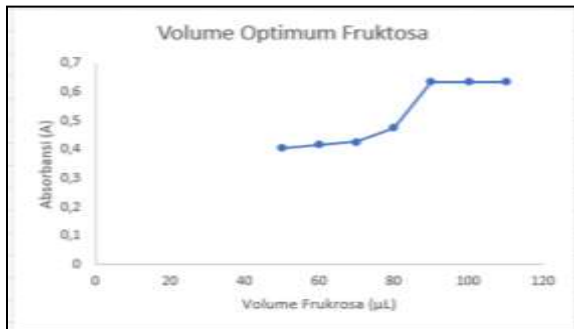


Gambar 1. λ_{maks} larutan fruktosa dengan reagen DNS pada rentang 300-700 nm.

Bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya maka λ serapan fruktosa yang direaksikan dengan DNS terdapat perbedaan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan (Tatjana Krivorotava, 2014) serapan maksimum gula pereduksi dengan reagen DNS adalah 540 nm dan menurut (Miller, 1959) serapan maksimum gula pereduksi dengan reagen DNS adalah 575 nm. Hal ini menunjukkan bahwa komposisi reagen DNS yang digunakan memiliki perbedaan, sehingga panjang gelombang yang didapatkan pada penelitian ini juga berbeda dan perbedaan ini juga disebabkan oleh pemakaian alat yang berbeda, sehingga memberikan hasil yang berbeda.

b. Volume optimum larutan fruktosa.

Penentuan volume optimum larutan fruktosa yang bereaksi dengan DNS bertujuan untuk memperoleh volume larutan fruktosa, sehingga fruktosa dapat teroksidasi semuanya oleh reagen DNS. Secara umum peningkatan volume fruktosa memberikan nilai absorbansi yang relatif sama (Gambar 2).

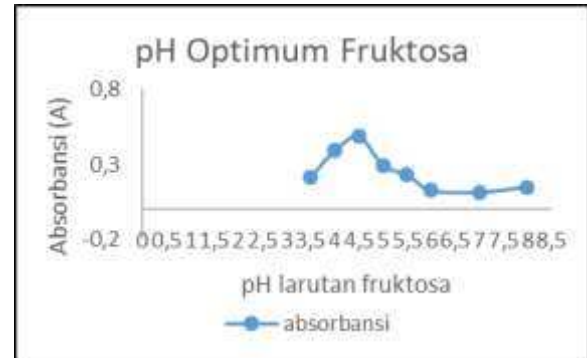


Gambar 2. Kurva hubungan antara variasi volume fruktosa terhadap absorbansi.

Pada Gambar 2. dapat dilihat bahwa nilai absorbansi serapan dengan reagen DNS meningkat pada variasi volume fruktosa dari 50 sampai 80 µL. Hal ini menunjukkan bahwa fruktosa belum teroksidasi secara keseluruhan, akan tetapi setelah penambahan volume fruktosa dari 90 sampai 110 µL nilai absorbansi dari peningkatan volume fruktosa relatif sama. Hal ini menunjukkan bahwa volume fruktosa pada 90 µL telah tepat bereaksi dengan reagen DNS dan jika ditambahkan jumlah larutan fruktosa 100 µL sampai 110 µL fruktosa akan berlebih didalam reaksi karena reagen DNS yang digunakan terbatas, sehingga volume fruktosa memberikan absorbansi yang relatif sama. Jadi volume optimum larutan fruktosa dimulai dari 90 µL.

c. Pengaruh pH Fruktosa

Penentuan pengaruh pH fruktosa terhadap reaksi redoks dengan reagen DNS ini bertujuan untuk memperoleh range pH yang cocok untuk fruktosa. Range pH larutan fruktosa yang digunakan berkisar antara pH 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 7; dan 8. Pada Gambar 3 dimuat kurva hubungan pH larutan fruktosa terhadap nilai absorbansi.



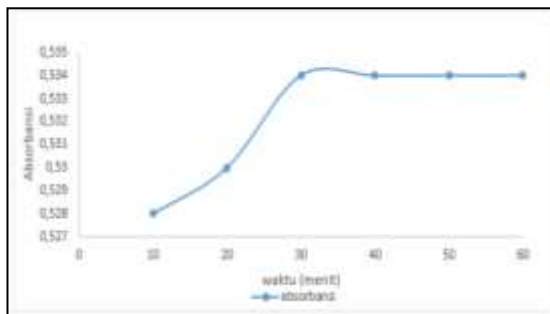
Gambar 3. Kurva hubungan pH larutan fruktosa terhadap nilai absorbansi.

Dari Gambar 3. terlihat bahwa pada pH 3,5 dan 4,5 nilai absorbansi dari fruktosa mengalami peningkatan. Hal ini dikarenakan fruktosa mulai teroksidasi dan pH 4,5 teroksidasi secara keseluruhan. pH 5; 5,5; 6; 7; dan 8 nilai absorbansinya mengalami penurunan. Hal ini dikarenakan fruktosa pada range pH 5 sampai 8 hanya sedikit yang teroksidasi, sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan mengalami penurunan. Penentuan pH optimum fruktosa berdasarkan pada nilai absorbansi yang paling tinggi. Pada pH 4,5 merupakan pH optimum fruktosa yang memberikan nilai absorbansi yang paling tinggi. Hal ini dikarenakan pada pH 4,5 fruktosa secara keseluruhan telah teroksidasi, sehingga pada pH 4,5 nilai absorbansinya paling tinggi yaitu 0,485. Jadi pH 4,5 adalah pH optimum fruktosa.

d. Waktu kestabilan warna dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS.

Penentuan warna kestabilan reaksi fruktosa dengan reagen DNS bertujuan untuk menentukan selang waktu berapa warna yang terbentuk stabil dan baik untuk dianalisis. Menurut (Ramansyah, 2003) Penggunaan reagen DNS tanpa penambahan fenol dan sulfit dapat diukur dalam selang waktu 24 jam, akan tetapi jika reagen 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 penambahan sulfat dapat menghalangi kelarutan oksigen yang dapat mengoksidasi gula pereduksi. Berikut ini adalah kurva hubungan variasi waktu kestabilan warna dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS terhadap nilai absorbansi dapat dilihat pada Gambar 4.

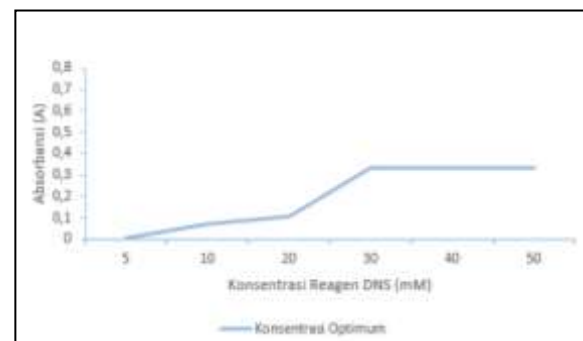


Gambar 4. Kurva hubungan variasi waktu kestabilan warna dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS.

Dari kurva diatas terlihat bahwa nilai absorbansi pada waktu pendiaman antara reaksi fruktosa dengan reagen DNS dari 0 sampai 30 menit terjadi peningkatan absorbansi. Hal ini menunjukkan semakin banyak fruktosa yang teroksidasi seiring dengan bertambahnya waktu. Pada selang waktu ke-30 hingga 60 menit terjadi serapan yang stabil dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS yang terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa DNS tanpa penambahan fenol dan sulfat dapat diukur pada selang waktu 24 jam, sehingga pada menit ke 30 pengukuran fruktosa dengan reagen DNS sudah bisa dilakukan. Jadi pada waktu ke-30 menit merupakan waktu optimum kestabilan warna pembentukan reaksi fruktosa dengan reagen DNS yang baik untuk dianalisis. Untuk pengukuran selanjutnya dilakukan pada waktu ke-30 menit untuk reaksi fruktosa dengan reagen DNS.

e. Konsentrasi optimum reagen DNS dengan fruktosa yang bereaksi

Penentuan konsentrasi optimum reagen DNS bertujuan untuk memperoleh konsentrasi reagen DNS yang tepat bereaksi dengan fruktosa sehingga reagen DNS digunakan optimal dan tidak berlebihan dalam reaksi. Secara umum peningkatan konsentrasi reagen DNS akan meningkatkan jumlah fruktosa yang bereaksi sehingga akan mencapai titik optimum. Berikut ini adalah kurva hubungan variasi konsentrasi reagen DNS terhadap nilai absorbansi dapat dilihat pada Gambar 5.



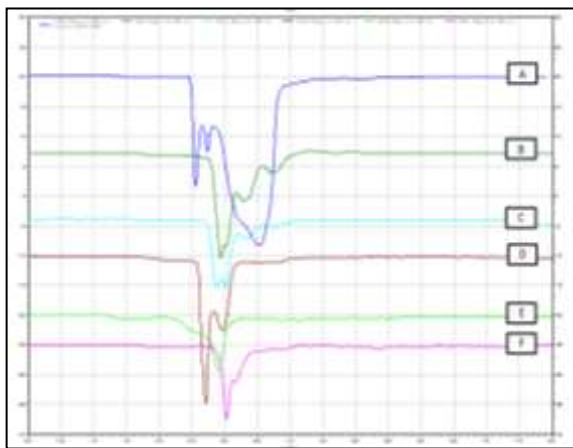
Gambar 5. Kurva hubungan variasi konsentrasi reagen DNS terhadap nilai absorbansi dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS.

Dari Gambar 5. dapat dilihat bahwa nilai absorbansi serapan dari reaksi fruktosa dengan reagen DNS meningkat pada variasi konsentrasi reagen DNS 5 mM sampai 20 mM. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi reagen DNS yang bereaksi dengan fruktosa belum optimal, akan tetapi setelah konsentrasi 30 mM sampai 40 mM nilai absorbansi dari peningkatan konsentrasi relatif sama. Hal ini menunjukkan bahwa reagen DNS yang bereaksi dengan fruktosa telah berlebih atau tetap bereaksi dengan fruktosa. Jadi konsentrasi reagen DNS yang optimum untuk pembentukan reaksi fruktosa dengan reagen DNS adalah 30 mM.

2. Kondisi analisis fruktosa melalui reaksi redoks dengan reagen DNS Menggunakan HPLC

Kondisi yang ditentukan pada analisis fruktosa menggunakan HPLC adalah fase gerak dan kolom yang cocok dalam analisis fruktosa. Penentuan fase gerak bertujuan untuk memperoleh pemisahan yang baik untuk analisis DNS yang tereduksi. Fase gerak yang digunakan adalah variasi etanol : air dengan perbandingan 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 dan 10:90. Kolom yang digunakan adalah kolom ODS C-18, kolom C-8, dan kolom CLC-Sil.

a. Kolom ODS C-18

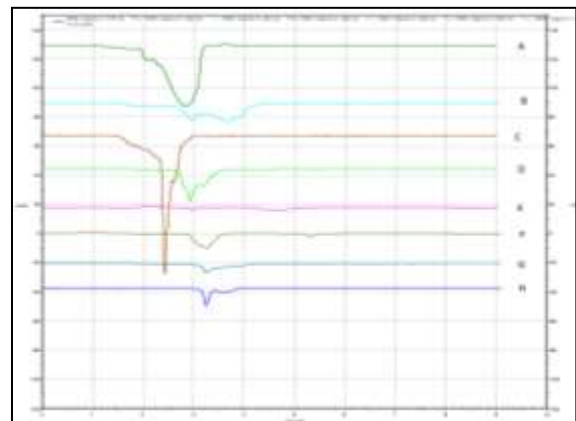


Gambar 6. Kromatogram analisis DNS tereduksi atau fruktosa 500 µg/mL dengan menggunakan kolom ODS C-18, fase gerak etanol : air, A (etanol:air ; 10:90), B (etanol:air ; 30:70), C (etanol:air ; 50:50), D (etanol:air ; 70:30), E (etanol:air ; 90:10), F (blangko). Laju alir 0,5 mL/min, $\lambda = 499$ nm.

Berdasarkan kromatogram analisis DNS tereduksi dengan variasi perbandingan beberapa fase gerak etanol : air pada Gambar 6. Kromatogram yang dihasilkan pada perbandingan eluen 10:90 muncul pada waktu retensi 2,88 menit yang merupakan puncak DNS yang tereduksi karena memberikan waktu

retensi yang berbeda dengan blangko (DNS belum tereduksi) yaitu 3,01 menit akan tetapi kromatogram yang dihasilkan *broad* dan saling tumpang tindih, sehingga tidak bagus digunakan untuk analisis. Pada kromatogram yang dihasilkan pada eluen 30:70, 50:50 dan 90:10 muncul pada waktu retensi berturut-turut adalah 2,94 menit, 3,01 menit dan 3,11 menit. Hal ini menunjukkan bahwa kromatogram yang dihasilkan pada eluen 30:70, 50:50 dan 90:10 sama waktu retensi dengan blangko yaitunya DNS yang belum tereduksi, sehingga pada perbandingan eluen tersebut belum bagus digunakan untuk analisis selanjutnya. Pada kromatogram yang dihasilkan pada perbandingan eluen 70:30 muncul puncak DNS yang tereduksi pada waktu retensi 2,92 menit karena memberikan waktu retensi yang berbeda dengan blangko yaitu DNS yang belum tereduksi, akan tetapi pemisahan pada perbandingan eluen 70:30 belum memberikan pemisahan yang bagus untuk analisis.

b. Kolom C-8

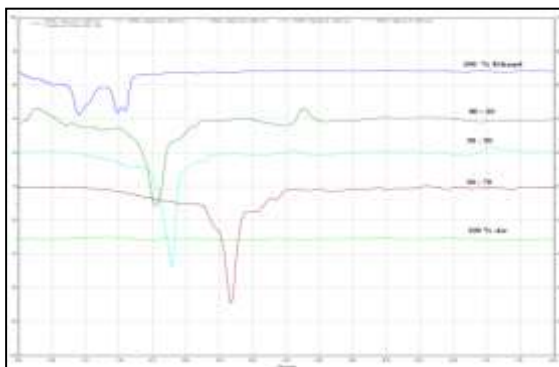


Gambar 7. Kromatogram analisis DNS tereduksi atau fruktosa 500 µg/mL dengan menggunakan kolom C-8, fase gerak etanol : air, A (etanol:air ; 10:90), B (etanol:air ; 30:70), C (etanol:air ; 40:60), D (etanol:air ; 50:50), E (etanol:air ; 60:40), F (etanol:air ; 70:30), G (etanol:air ; 90:10), H (blangko). Laju alir 0,5 mL/min, $\lambda = 499$ nm.

Berdasarkan kromatogram analisis DNS tereduksi dengan variasi perbandingan beberapa fase gerak

etanol:air pada Gambar 7. Kromatogram yang dihasilkan pada perbandingan eluen 10:90, 30:70, 50:50, 60:40, 70:30, dan 90:10 muncul pada waktu retensi adalah 3,29 menit, 3,31 menit, 3,22 menit, 3,38 menit, dan 3,63 menit yang merupakan puncak DNS yang belum tereduksi karena puncak pada perbandingan eluen tersebut memiliki waktu retensi yang sama dengan blangko (DNS belum tereduksi) yaitu 3,49 menit, sehingga pada perbandingan eluan tersebut belum bisa digunakan untuk analisis selanjutnya. Pada kromatogram DNS tereduksi dengan perbandingan eluen 40:60 muncul satu puncak yang tajam pada waktu retensi 2,78 menit. Puncak pada waktu retensi 2,78 menit berkemungkinan merupakan puncak DNS yang tereduksi karena memberikan perbedaan waktu retensi yang berbeda dengan blangko (DNS belum tereduksi) yaitu pada waktu retensi 3,49 menit, akan tetapi puncak pada perbandingan eluen 40:60 belum memberikan hasil yang bagus untuk pemisahan, sehingga pada perbandingan eluen 40:60 belum bisa digunakan pada pengukuran selanjutnya.

c. Kolom CLC-Sil

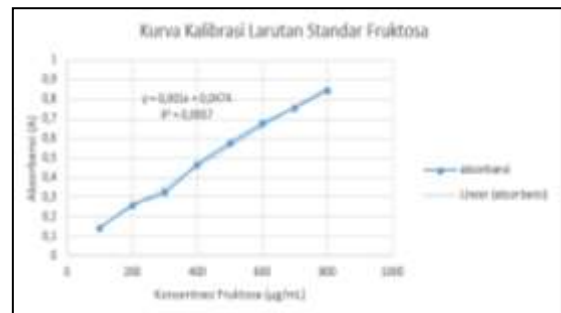


Gambar 8. Kromatogram DNS tereduksi atau analisis fruktosa 500 µg/mL dengan kolom CLC-Sil, fase gerak etanol:aquades 40:60. Laju alir 1 mL/min, λ = 499 nm, kolom CLC-Sil.

Dari Gambar 8. di atas, terlihat bahwa perbandingan variasi eluen etanol : aquades belum memberikan hasil yang

baik. Hal ini terlihat pada kromatogram yang dihasilkan pada perbandingan fase gerak etanol 100 %, 80:20, 50:50 dan 30:70 menghasilkan puncak yang *broad* (melebar) dan saling tumpang tindih yang belum terpisahkan secara sempurna. Kemudian pada eluen aquades 100% dihasilkan garis lurus (noise). Hal ini menunjukkan bahwa DNS yang tereduksi tidak tertahan didalam kolom yang menyebabkan pemisahannya kurang baik. Jadi dapat disimpulkan bahwa pemisahan dengan menggunakan kolom CLC-Sil dan fase gerak etanol : aquades belum menunjukkan hasil yang baik.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dengan 3 tipe kolom yaitu kolom yang bersifat non polar (C-18), semipolar (C-8) dan polar (CLC-Sil) belum dihasilkan pemisahan yang baik karena memberikan kromatogram yang *broad* dan waktu retensi yang lama, sehingga pengukuran selanjutnya dilakukan dengan spektronik 20 D untuk penentuan kurva kalibrasi dari larutan fruktosa dan juga untuk penentuan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin.



Gambar 9. Kurva kalibrasi larutan standar fruktosa.

Berdasarkan Gambar 9. Diperoleh persamaan regresi linier larutan standar fruktosa adalah $Y = 0,001X + 0,0474$ dengan regresi adalah 0,9957. Persamaan regresi linier ini berfungsi untuk menentukan kadar fruktosa atau gula pereduksi pada sampel yang merupakan produk dari hidrolisis inulin, menggunakan inulinase sebagai katalisator.

3. Analisis kandungan fruktosa hasil hidrolisis inulin.

Analisa kandungan fruktosa hasil hidrolisis inulin dilakukan dengan menggunakan spektrometri 20 D. Absorbansi fruktosa yang dihasilkan dari hidrolisis inulin menggunakan inulinase sebagai katalisator yang dilakukan pada pH 4,5. Hidrolisis ini dilakukan pada suhu 27°C dan waktu inkubasinya adalah 30 menit yang diukur pada λ_{maks} 499 nm. Data hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data absorbansi variasi konsentrasi inulin.

No	Variasi Konsentrasi Inulin (%)	Absorbansi
1	0,5	0,231
2	1	0,343
3	2,5	0,560

Berdasarkan dari data pada Tabel 1. ditentukan kandungan fruktosa hasil hidrolisis inulin dengan menggunakan persamaan regresi yang telah diperoleh pada kurva kalibrasi larutan standar fruktosa. Dimana semakin tinggi absorbansi yang dihasilkan maka tinggi pula gula pereduksi yang dihasilkan. Persamaan regresinya adalah $Y = 0,001X + 0,0474$. Data kandungan fruktosa hasil hidrolisis inulin dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data kandungan fruktosa hasil hidrolisis inulin.

No.	Konsentrasi Inulin (%)	Konsentrasi Fruktosa ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,5	183,6
2	1	295,6
3	2,5	512,6

Berdasarkan dari Tabel 5, maka diperoleh kandungan fruktosa hasil hidrolisis inulin 0,5 % adalah 183,6

$\mu\text{g/mL}$, fruktosa hasil hidrolisis inulin 1 % adalah 295,6 $\mu\text{g/mL}$ dan fruktosa hasil hidrolisis inulin 2,5 % adalah 512,6 $\mu\text{g/mL}$. Semakin banyak konsentrasi inulin yang dihidrolisis maka semakin besar gula pereduksi yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa enzim inulinase berkerja secara optimal dan semua sisi aktif pada enzim inulinase sudah ditempati oleh substat sehingga hasil hidrolisis inulin yang dihasilkan meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi inulin. Berdasarkan penelitian sebelumnya inulin yang dihidrolisis dengan enzim inulinase pada konsentrasi inulin 0,5 %, 1 % dan 2,5 % memberikan absorbansi secara berturut – turut adalah 0,140, 0,192 dan 0,381 (Arisa, 2016).

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 μL .
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 $\mu\text{g/mL}$, 295,6 $\mu\text{g/mL}$ dan 512,6 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan spektrometri 20 D.

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, asetonitril : air dan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Arisa, Boni. 2016. *Penentuan Aktivitas Tipe Aksi Inulinase Isolat Bakteri dari Rizorfer Umbi Dahlia (Dahlia sp).* skripsi, jurusan kimia, FMIPA, UNP.
- Baston, O., Barna, O. 2013. *Lactic Acid Production by Bacteria Isolated From Rhizosphere of Dahlia Tubers.* Food and Environment Safety : 186 – 191.
- Franck, De Lenheer. 2003. *Inulin.* Email : ann.franck@orafiti.com. Diakses 25 Maret 2004.
- Kusmiati dan Agustini N.W.S. 2010. *Pemanfaatan Limbah Onggok untuk Produksi Asam Sitrat dengan Penambahan Mineral Fe dan Mg pada Substrat Menggunakan Kapang Tricoderma sp dan Aspergillus Niger.* Seminar Nasional Biologi, 856-866.
- L. Zittan, Bagsvaerd. 1981. *Enzymatic Hydrolysis of Inulin an Alternative Way to Fructose Production.* Strach / starke 33. Nr. 11, 5. 373 – 377.
- Miller GL. 1959. *Use of Dinitrisalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.* Anal. Chem. 31 : 426 – 428.
- Raharja, Sapta. 2006. *Produksi Sirup Fruktosa dari Inulin Dahlia Dinata CAV. Secara Hidrolisis Asam.* Jurusan Teknologi Industri Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB. Vol. 11 (3), 119 – 124.
- Ramansyah, M., I made, S. 2003. *Optimasi Analisis Amilase dan Glukanase yang Diekstrak dari Miselium pleurotus ostreatus dengan Asam 3,5 Dinitrosalisilat.* Berk, penel, Hayati : 9 (7-12), 2003.
- Wang, H., Zhesheng, Z., Liya, L., Shengping, W., Chunyan, L., Xiaojun, X. 2010. *A Comparative Study of High Performance Liquid Chromatography and Colorimetric Method for Inulin Determination.* Eur Food Res Technol. Vol. 230 : 701 – 706.
- Tatjana Krivorotava, Jalanta sereikaite. 2014. *Determination of Fructon Exohidrolase Activity In The Crude Extracts.* Electronic Journal of Biotechnology : 329 – 333.