



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE ANALISIS INULIN DALAM SIRUP
MULTIVITAMIN SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI – DETEKTOR INDEKS BIAS**

SKRIPSI

**LISA NAFTALI
0706264785**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE ANALISIS INULIN DALAM SIRUP
MULTIVITAMIN SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI – DETEKTOR INDEKS BIAS**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Farmasi**

**LISA NAFTALI
0706264785**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2011**

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Lisa Naftali

NPM : 0706264785

Tanda Tangan : 

Tanggal : 7 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Lisa Naftali
NPM : 0706264785
Program Studi : S1 Farmasi
Judul Skripsi : Validasi Metode Analisis Inulin dalam Sirup
Multivitamin secara Kromatografi Cair Kinerja
Tinggi – Detektor Indeks Bias

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian dari persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Harmita, Apt. (.....)

Pembimbing II: Drs. Hayun, MS., Apt. (.....)

Penguji I : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt. (.....)

Penguji II : Dra. Retnosari Andrajati, MS., Ph.D., Apt. (.....)

Penguji III : Dr. Katrin, MS., Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “Validasi Metode Analisis Inulin dalam Sirup Multivitamin secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Detektor Indeks Bias.” Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dorongan dan sumbangan pikiran sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik, khususnya kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia beserta segenap staf pengajar.
2. Bapak Dr. Harmita, Apt., selaku pembimbing I yang telah bersedia menyediakan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk memberikan bimbingan, motivasi, serta saran yang bermanfaat selama proses penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Bapak Drs. Hayun, MS., Apt., selaku pembimbing II yang telah bersedia memberikan pengajaran, bimbingan, dan pengarahan selama proses penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Ibu Dr. Dra. Berna Elya, M.Si., Apt., selaku pembimbing akademis, yang telah menyediakan waktu dan tenaganya untuk memberikan saran dan dukungan selama masa pendidikan.
5. PT. Merck Indonesia, PT. Abbot Indonesia, dan PT. Kimia Farma yang telah memberikan bantuan bahan baku untuk keberlangsungan penelitian penulis.
6. PT. Ditek Jaya, terutama kepada Bapak Ikin, Bapak Ian, dan Bapak Dian yang telah membantu, menyediakan waktu, dan tenaga selama proses penelitian penulis.
7. Bapak Rustam selaku laboran Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif, dan Kak Wulan selaku karyawan Laboratorium Pusat Pelayanan

pada Masyarakat atas bantuan, perhatian, saran, arahan, dan bimbingan kepada penulis selama penelitian serta penulisan skripsi.

8. Seluruh laboran dan karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah membantu kelancaran dalam masa perkuliahan, penelitian, serta penulisan skripsi.
9. Keluargaku tersayang, Papa, Mama, Anne, dan Indra yang telah memberikan doa dan dukungan penuh selama masa perkuliahan, serta tak henti-hentinya memberikan dorongan moril, penghiburan, dan kekuatan, untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
10. Sahabat-sahabat terdekat, keluargaku di Farmasi, dan teman-teman KBI Kimia Farmasi atas kesediaannya mendengarkan keluhan penulis, memberikan saran, perhatian, dan dukungan tiada henti selama masa penelitian dan penyusunan skripsi.
11. Teman-teman Farmasi 2007 yang telah melalui masa perkuliahan selama empat tahun ini dengan penuh kebersamaan. Terima kasih telah membuat hari-hari di Farmasi menjadi sungguh bermakna.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, yang telah memberikan bantuan dan dukungan yang sangat berharga bagi penulis.

Penulis menyadari penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun dari semua pihak sangat penulis harapkan karena bermanfaat bagi penulis sebagai acuan di masa yang akan datang. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca, baik untuk menambah wawasan dan pengetahuan maupun sebagai referensi penelitian selanjutnya.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lisa Naftali
NPM : 0706264785
Program Studi : S1 Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Validasi Metode Analisis Inulin dalam Sirup Multivitamin secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Detektor Indeks Bias

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 7 Juli 2011

Yang menyatakan,



(Lisa Naftali)

ABSTRAK

Nama : Lisa Naftali
Program Studi : Farmasi
Judul : Validasi Metode Analisis Inulin dalam Sirup Multivitamin secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Detektor Indeks Bias

Inulin merupakan polimer fruktosa dan termasuk ke dalam golongan karbohidrat yang tidak dapat dicerna oleh tubuh. Manfaat inulin sebagai serat yang dapat memelihara kesehatan pencernaan manusia dan meningkatkan penyerapan kalsium dalam tubuh diaplikasikan pada sediaan sirup multivitamin untuk anak-anak. Adanya karbohidrat lain seperti sukrosa dan glukosa dapat mengganggu analisis inulin dalam sirup multivitamin. Untuk tujuan pengawasan mutu, suatu metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor indeks bias yang optimum dan valid telah dikembangkan untuk analisis inulin dalam sirup multivitamin tersebut. Metode analisis meliputi proses hidrolisis terhadap inulin dengan menggunakan 5,0 mL H₂SO₄ 1N (pH ±2) dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 1 jam dan total fruktosa yang dihasilkan dari proses tersebut ditetapkan dengan KCKT. Sistem kromatografi terdiri dari kolom *Carbohydrate Analysis* (Waters) dengan fase gerak asetonitril-air (85:15), laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor indeks bias. Metode yang diperoleh valid dengan hasil kurva kalibrasi yang linier ($r = 0,9998$), presisi dengan nilai koefisien variasi (KV) sebesar 0,96%, dan akurat dengan nilai perolehan kembali pada 3 konsentrasi sebesar 98,32% sampai 102,20%. Kadar inulin dalam sampel sirup multivitamin dihitung dan diperoleh persentase perolehan kembali sebesar 101,13% ±0,31%.

Kata kunci : fruktosa, inulin, KCKT, sirup, validasi
xiii + 81 halaman : 12 tabel; 14 gambar; 11 lampiran
Daftar pustaka : 29 (1970-2010)

ABSTRACT

Name : Lisa Naftali
Study Program : Pharmacy
Title : Validation of Analytical Method of Inulin in Multivitamin Syrup by High Performance Liquid Chromatography – Refractive Index Detector

Inulin is a polydisperse fructose and included in the category of non-digestible carbohydrate. Inulin as a dietary fiber can promote the health of digestive system and the absorption of minerals in our body, thus inulin is applied in multivitamin syrup for kids. Other carbohydrates, such as sucrose and glucose can interfere with inulin determination in multivitamin syrup. Due to quality control, an optimal and valid high performance liquid chromatographic with refractive index detection method was developed for analyzing inulin in the multivitamin syrup. The method includes hydrolysis of inulin with 5,0 mL H₂SO₄ 1N (pH ±2), heated at 100°C for 1 hour; and the total of released fructose from that process is determined by using HPLC. Chromatographic system is performed on a Carbohydrate Analysis column (Waters), with the acetonitrile-water (85:15) as the mobile phase, flow-rate of the eluent of 1,0 mL/min, and a refractive index detection. The method is valid by the calibration curve with good linearity ($r = 0,9998$); precision by the coefficient of variation (CV) of 0,96%; and accurate by the recovery for 3 concentrations ranged from 98,32% to 102,20%. The percentage of inulin in multivitamin syrup has been determined and satisfactory recovery of 101,13% ±0,31% has been obtained.

Keywords : fructose, HPLC, inulin, syrup, validation
xiii +81 pages : 12 tables; 14 figures; 11 appendices
Bibliography : 29 (1970-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Inulin.....	4
2.2 Sirup Multivitamin.....	9
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	12
2.4 Validasi Metode Analisis.....	16
2.5 Metode Analisis Inulin.....	19
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	24
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
3.2 Alat dan Bahan.....	24
3.3 Tahapan Penelitian.....	25
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Optimasi Kondisi Analisis Inulin.....	32
4.2 Uji Kesesuaian Sistem.....	34
4.3 Penentuan Faktor Konversi Inulin Menjadi Fruktosa.....	34
4.4 Penentuan Faktor Konversi Sukrosa Menjadi Fruktosa.....	35
4.5 Validasi Metode Analisis Inulin dalam Sirup.....	35
4.6 Pengukuran Kadar Inulin dalam Sampel Sirup.....	39
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
5.1 Kesimpulan.....	41
5.2 Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
DAFTAR SINGKATAN.....	81

DAFTAR TABEL

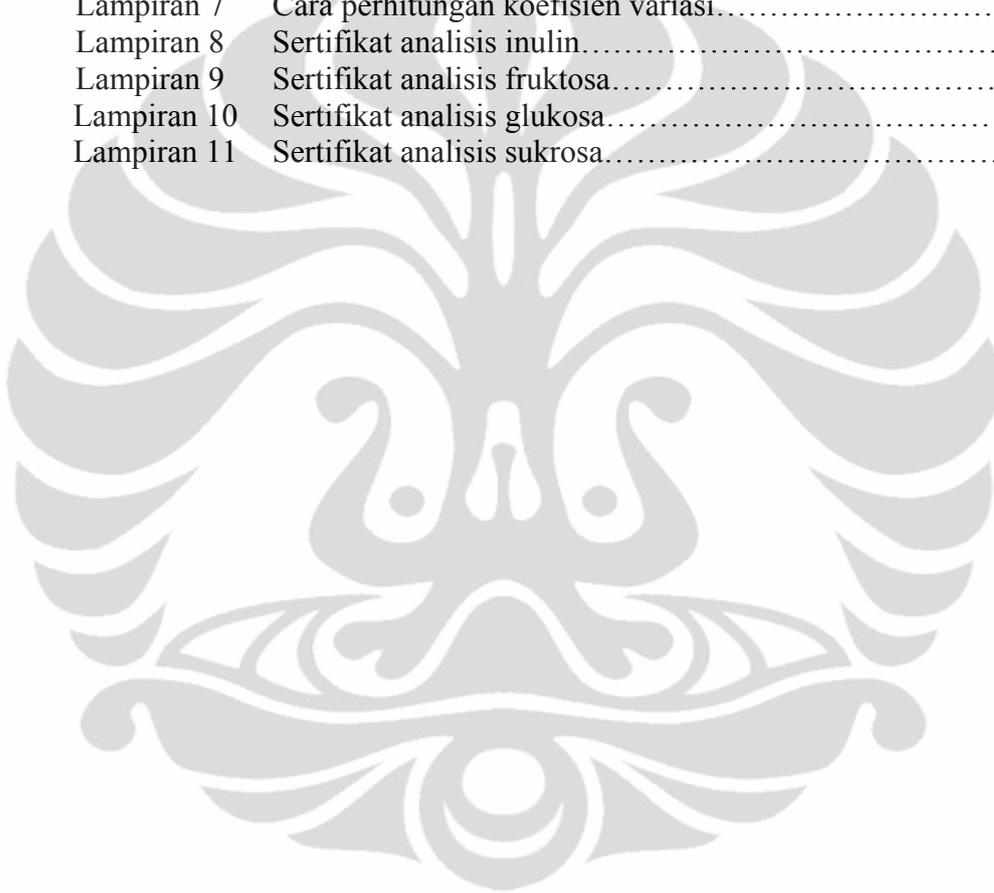
Tabel 2.1	Karakteristik detektor pada KCKT.....	15
Tabel 4.1	Data hasil pemilihan metode analisis standar fruktosa dan glukosa.....	45
Tabel 4.2	Data hasil pemilihan metode analisis inulin.....	46
Tabel 4.3	Data hasil optimasi kondisi hidrolisis.....	47
Tabel 4.4	Data hasil uji kesesuaian sistem.....	48
Tabel 4.5	Data hasil penentuan faktor konversi inulin menjadi fruktosa.....	49
Tabel 4.6	Data hasil penentuan faktor konversi sukrosa menjadi fruktosa.....	50
Tabel 4.7	Data hasil pengukuran kurva kalibrasi standar fruktosa.....	51
Tabel 4.8	Data hasil uji presisi hidrolisis standar inulin menjadi fruktosa.....	52
Tabel 4.9	Data hasil uji presisi inulin dalam sirup plasebo.....	53
Tabel 4.10	Data hasil uji akurasi inulin dalam sirup plasebo.....	54
Tabel 4.11	Data hasil pengukuran kadar inulin dalam sampel sirup.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus struktur inulin.....	6
Gambar 3.1	Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).....	56
Gambar 4.1	Kromatogram larutan standar fruktosa 30000 µg/mL (A) dan glukosa 7500 µg/mL (B) dengan fase gerak asetonitril-air (83:17).....	57
Gambar 4.2	Kromatogram larutan standar fruktosa 30000 µg/mL (A) dan glukosa 7500 µg/mL (B) dengan fase gerak asetonitril-air (85:15).....	58
Gambar 4.3	Kromatogram hasil hidrolisis larutan standar inulin 2931 µg/mL menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B) dengan fase gerak asetonitril-air (83:17).....	59
Gambar 4.4	Kromatogram hasil hidrolisis larutan standar inulin 2931 µg/mL menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B) dengan fase gerak asetonitril-air (85:15).....	60
Gambar 4.5	Kromatogram larutan standar fruktosa (A) 5000 µg/mL.....	61
Gambar 4.6	Kromatogram hasil hidrolisis larutan standar sukrosa 9000 µg/mL menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B).....	62
Gambar 4.7	Kromatogram larutan blanko.....	63
Gambar 4.8	Kromatogram hasil hidrolisis larutan plasebo sirup multivitamin menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B).....	64
Gambar 4.9	Kromatogram hasil hidrolisis larutan sampel sirup menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B).....	65
Gambar 4.10	Kromatogram larutan standar sukrosa 12000 µg/mL (C) yang tidak dihidrolisis.....	66
Gambar 4.11	Kromatogram larutan sampel sirup yang tidak dihidrolisis menjadi sukrosa (C).....	67
Gambar 4.12	Kurva kalibrasi fruktosa.....	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara memperoleh efisiensi kolom.....	69
Lampiran 2	Cara memperoleh resolusi.....	70
Lampiran 3	Cara memperoleh regresi linear.....	71
Lampiran 4	Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi.....	72
Lampiran 5	Cara perhitungan limit deteksi dan limit kuantitasi.....	73
Lampiran 6	Cara perhitungan uji akurasi.....	74
Lampiran 7	Cara perhitungan koefisien variasi.....	75
Lampiran 8	Sertifikat analisis inulin.....	76
Lampiran 9	Sertifikat analisis fruktosa.....	77
Lampiran 10	Sertifikat analisis glukosa.....	78
Lampiran 11	Sertifikat analisis sukrosa.....	80



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inulin adalah karbohidrat yang termasuk ke dalam golongan fruktan atau disebut juga polimer fruktosa (Kaur dan Gupta, 2002). Inulin mengandung 2 sampai 70 unit fruktosa yang dihubungkan satu sama lain dalam rantai lurus oleh ikatan β -2,1 fruktosil-fruktosa dan mempunyai glukosa pada ujung awal rantainya (Franck dan De Leenheer, 2002). Hasil hidrolisis parsial dari inulin disebut oligofruktosa, mengandung 2 sampai 8 unit fruktosa (Gropper, Smith, dan Groff, 2009).

Menurut Roberfroid (1993), inulin adalah serat yang sukar larut dalam air yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim pencernaan manusia karena enzim tersebut hanya spesifik menghidrolisis ikatan α -glikosida, sedangkan ikatan pada inulin dan oligofruktosa adalah ikatan β -2,1 fruktosil-fruktosa (Gropper, Smith, dan Groff, 2009). Inulin akan melewati lambung dan usus halus tanpa mengalami metabolisme yang berarti hingga inulin berada dalam usus besar (Franck dan De Leenheer, 2002). Di dalam usus besar manusia terdapat bakteri yang dapat mencerna inulin, contohnya adalah *Bifidobacteria* yang memiliki enzim β -fruktosidase (Gropper, Smith, dan Groff, 2009). Adanya pencernaan inulin oleh bakteri tersebut dapat menyebabkan perubahan komposisi flora usus manusia melalui fermentasi spesifik dan memberikan hasil dimana komunitas bifidobakter menjadi yang paling dominan dan menekan pertumbuhan bakteri lain yang merugikan (Kaur dan Gupta, 2002). Hal ini memberikan dampak yang menguntungkan bagi kesehatan manusia. Efek inulin yang secara selektif dapat meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas metabolisme dari bakteri yang menguntungkan, terutama bifidobakter, dan menekan bakteri yang merugikan (contoh: *Clostridium sp.*, *E. coli*) disebut efek prebiotik (Franck dan De Leenheer, 2002).

Efek prebiotik inulin dimanfaatkan dalam berbagai produk untuk memelihara kesehatan pencernaan salah satunya pada produk sirup pertumbuhan untuk anak-anak. Dalam produk sirup tersebut, inulin tidak hanya membantu memelihara kesehatan pencernaan, tetapi juga dapat meningkatkan penyerapan

kalsium terutama pada masa pertumbuhan untuk perkembangan tulang dan gigi anak (Kaur dan Gupta, 2002). Dari sudut pandang formulasi, inulin memberikan peningkatan karakteristik organoleptis dan rasa dari suatu produk, serta meningkatkan stabilitas emulsi (Franck dan De Leenheer, 2002).

Inulin digolongkan sebagai karbohidrat sehingga adanya karbohidrat lain seperti sukrosa dan glukosa yang sering digunakan sebagai komponen utama dalam formulasi sirup menjadi perhatian utama sebagai bahan yang dapat mengganggu penetapan kadar inulin. Selain itu, nilai nutrisi yang tinggi dan harganya yang lebih mahal dibandingkan dengan karbohidrat lainnya menjadikan inulin sebagai target untuk meningkatkan nilai ekonomi suatu produk (Wang, Zhang, Liang, Wen, Liu, dan Xu, 2010). Oleh karena itu diperlukan suatu metode analisis yang tepat dan akurat yang dapat menganalisis inulin dalam sirup untuk tujuan pengawasan mutu.

Di Indonesia belum ada penelitian mengenai metode analisis untuk penetapan kadar inulin dalam produk sirup. Ada berbagai macam metode untuk analisis inulin diantaranya adalah 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 sehingga metode kromatografi lebih banyak diterapkan untuk tujuan analisis (Wang, Zhang, Liang, Wen, Liu, dan Xu, 2010). Salah satu metode analisis kromatografi yang digunakan berdasarkan studi literatur adalah metode analisis kuantitatif inulin secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor indeks bias. KCKT adalah metode yang paling banyak digunakan, serta memiliki sensitifitas, presisi, dan kecepatan yang baik (Wang, Zhang, Liang, Wen, Liu, dan Xu, 2010), sedangkan detektor indeks bias cocok untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang aktivitas kromofornya rendah seperti senyawa gula (Ahuja dan Wong, 2005).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini melibatkan proses hidrolisis inulin dalam suasana asam sehingga diperoleh produk akhir berupa monosakarida fruktosa yang dapat dianalisis dengan menggunakan kolom silika dengan ikatan propilamin dan fase gerak berupa asetonitril-air. Metode tersebut adalah metode berdasarkan hasil studi literatur dimana lingkungan, kondisi analisis, dan

peralatan yang digunakan berbeda dengan yang tersedia di laboratorium pengujian. Oleh karena itu metode tersebut harus divalidasi terlebih dahulu sehingga hasil yang diperoleh dapat dipercaya dan dipertanggungjawabkan untuk tujuan pengawasan mutu. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah-masalah analisis (Gandjar dan Rohman, 2007).

1.2 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh kondisi optimum untuk analisis inulin dalam sirup multivitamin secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor indeks bias.
2. Memperoleh metode yang valid untuk analisis inulin dalam sirup multivitamin secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor indeks bias.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inulin

2.1.1 Definisi Inulin

Inulin adalah suatu polisakarida yang dapat dihidrolisis menjadi sebagian besar fruktosa. Kemurniannya tidak boleh kurang dari 94% dan tidak boleh lebih dari 102% $C_6H_{11}O_5(C_6H_{10}O_5)_nOH$, dihitung setelah dikeringkan (USP 30, 2006). Inulin mengandung 2 sampai 70 unit fruktosa yang dihubungkan satu sama lain dalam rantai lurus oleh ikatan β -2,1 fruktosil-fruktosa dan mempunyai glukosa pada ujung awal rantainya (Franck dan De Leenheer, 2002). Inulin mirip dengan amilum, terdapat dalam umbi akar *jerusalem artichoke*, dan larut dalam air panas (Adrian, Legrand, dan Frangne, 1988).

2.1.2 Monografi (Franck dan De Leenheer, 2002; USP 30, 2006)

Nama dagang	: Orafti [®]
Sinonim	: Ekstrak <i>chicory</i> , <i>chicory</i> inulin, ekstrak dahlia, dahlia inulin, frukto-oligosakarida, inulina, inuline, oligosakarida rantai panjang, prebiotik
Sumber	: Akar <i>chicory</i> (<i>Cichorium intybus</i>), umbi akar <i>jerusalem artichoke</i> (<i>Helianthus tuberosus</i>), dan umbi bunga dahlia (<i>Dahlia variabilis</i>)
Rumus molekul	: $C_6H_{11}O_5(C_6H_{10}O_5)_nOH$
Berat molekul	: Merupakan polimer, tergantung pada jumlah monomernya (n)
Kemurnian	: 94% - 102%
Organoleptis	: Serbuk putih, tidak berbau, rasa netral, tidak ada rasa yang tertinggal (<i>after-taste</i>). Inulin dari <i>chicory</i> sedikit manis (10% rasa manis dari gula), dimana inulin dengan rantai yang lebih panjang sama sekali tidak manis

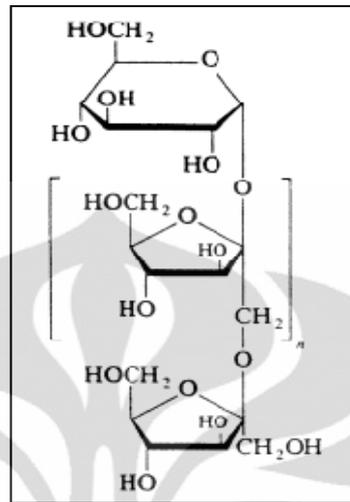
Kelarutan	: Maksimum 10% bagiannya larut dalam air pada suhu kamar, tidak larut dalam air dingin, mudah larut dalam air panas (50-100°C)
Viskositas	: 1,65 mPa.s larutan inulin 5% pada suhu 10°C, 100 mPa,s larutan inulin 30% pada suhu 10°C
Derajat polimerisasi	: 2 sampai 70
Rotasi spesifik	: (-)32,0° - (-)40,0°
Stabilitas terhadap panas	: Baik
Stabilitas terhadap asam	: Cukup baik
Penyimpanan	: Simpan pada wadah tertutup baik, simpan pada suhu kamar 25°C atau antara 15°C – 30°C

2.1.3 Sifat Kimia dan Fisika

Waterhouse dan Chatterton (1993) mendefinisikan inulin sebagai polimer karbohidrat yang mengandung ikatan β (2 \rightarrow 1) fruktosil-fruktosa dengan adanya glukosa pada ujung rantai. Inulin dapat diperoleh baik dari tanaman maupun bakteri. Derajat polimerisasi inulin yang berasal dari tanaman (kurang dari 200) lebih kecil dari pada yang berasal dari bakteri (10.000-100.000). Inulin pada tanaman *chicory* mengandung unit fruktosa yang beragam dari 2 sampai 70 unit. Ini berarti inulin dapat disebut sebagai oligomer atau polimer. Inulin dari alam biasanya masih mengandung sedikit glukosa, fruktosa, sukrosa, dan sebagian kecil oligosakarida (Franck dan De Leenheer, 2002). Rumus struktur inulin dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Pada konsentrasi tinggi (>25% inulin dalam air) inulin akan menyerupai gel dan membentuk partikel-partikel gel setelah pengadukan. Fruktan yang diaduk dengan kecepatan tinggi akan membentuk struktur berupa krim putih. Kekuatan gel yang terbentuk dari inulin bergantung pada seberapa besar konsentrasi inulin yang digunakan, kecepatan pengadukan, suhu, waktu, tekanan, dan alat pengaduk yang digunakan, namun pH tidak mempengaruhi (pada pH 4-9). Inulin dapat meningkatkan stabilitas emulsi, oleh karena itu inulin dapat digunakan sebagai

pengganti bahan penstabil dalam produk susu, es krim, dan saus (Franck dan De Leenheer, 2002).



[Sumber: Franck dan De Leenheer, 2002]

Gambar 2.1 Rumus struktur inulin

2.1.4 Hidrolisis Inulin

Pemutusan ikatan glikosida pada inulin dengan adanya penambahan air dikenal dengan reaksi hidrolisis. Reaksi ini akan menyebabkan terjadinya dekomposisi polimer inulin membentuk komponen-komponen monosakarida. Inulin stabil terhadap hidrolisis pada suhu kamar dan pH netral, akan tetapi peningkatan suhu dan suasana pH yang ekstrim dapat meningkatkan laju reaksi hidrolisis inulin (Barclay, Ginic-Markovic, Cooper, dan Petrovsky, 2010).

Pada kondisi yang sangat asam, ikatan β (2 \rightarrow 1) pada tiap unit fruktosa dari inulin dapat terhidrolisis parsial membentuk satuan unit fruktosa. Hal ini akan terjadi lebih cepat pada keadaan pH rendah dengan suhu tinggi dan tingkat kekeringan bahan yang rendah. Inulin stabil pada keadaan pH >4. Meskipun dalam keadaan asam, tingkat hidrolisis dari inulin dapat ditekan pada keadaan bahan yang kering, dan disimpan pada suhu rendah (<10°C) (Franck dan De Leenheer, 2002). Reaksi hidrolisis inulin juga bergantung dari jenis ikatan glikosida. Misalnya, ikatan glukosil-fruktosil 4-5 kali lebih resisten terhadap hidrolisis asam dibandingkan dengan ikatan fruktosil-fruktosil (Barclay, Ginic-Markovic, Cooper, dan Petrovsky, 2010).

Pada suhu dan pH yang ekstrim, dekomposisi terhadap bentuk monosakarida dapat juga terjadi selama proses hidrolisis. Beberapa cara untuk mencegah terjadinya dekomposisi monomer adalah dengan menggunakan proses metanolisis dibandingkan dengan proses hidrolisis karena bentuk metilasi monosakarida yang dihasilkan akan lebih stabil. Selain itu meminimalkan adanya oksigen selama proses hidrolisis dengan menggunakan asam klorida atau asam trifloroasetat juga dapat membantu mencegah terjadinya dekomposisi monosakarida (Barclay, Ginic-Markovic, Cooper, dan Petrovsky, 2010).

2.1.5 Sifat Biologi dan Nutrisi

2.1.5.1 Inulin Tidak Dapat Dicerna (*Nondigestibility*)

Struktur kimia dengan ikatan $\beta(2\rightarrow1)$ tidak dapat dihidrolisis oleh enzim pencernaan manusia, inulin masuk melalui mulut, menuju lambung, dan usus halus manusia tanpa mengalami perubahan yang berarti, dan tanpa dimetabolisme. 88% inulin yang dikonsumsi akan ditemukan dalam kolon manusia yang artinya selama melewati lambung dan usus halus inulin tidak mengalami metabolisme (Kaur dan Gupta, 2002). Inulin kemudian memasuki usus besar dan akan termetabolisme sempurna oleh bakteri intestinal. Bahkan pada asupan inulin dalam dosis besar, inulin tidak ditemukan dalam jumlah yang signifikan dalam feses (Franck dan De Leenheer, 2002).

β konfigurasi pada C_2 dari monomer fruktosa menyebabkan fruktan resisten terhadap enzim pencernaan manusia, seperti α -glukosidase, maltase, isomaltase, sukrase, yang hanya spesifik untuk menghidrolisis ikatan α -glikosida (Kaur dan Gupta, 2002). Namun, di dalam tubuh ikatan ini dapat dihidrolisis oleh beberapa bakteri usus, contohnya adalah *Bifidobacteria* yang memiliki enzim β -fruktosidase (Gropper, Smith, dan Groff, 2009).

2.1.5.2 Efek Inulin pada Fungsi Saluran Cerna

Menurut Roberfroid (1993), inulin digolongkan sebagai serat karena tidak dapat dihidrolisis oleh enzim pencernaan manusia sehingga inulin juga memiliki sifat seperti menurunkan pH saluran cerna, mengobati konstipasi, meningkatkan massa feses, dan meningkatkan frekuensi buang air besar yang serupa dengan

serat lainnya, seperti pektin dan gom. Menurut Gibson *et al.* (1995), mekanisme antikonstipasi adalah berdasarkan kemampuan inulin dalam meningkatkan massa feses dan menghasilkan feses yang lunak sehingga memudahkan proses defekasi (Franck dan De Leenheer, 2002).

2.1.5.3 Inulin Mampu Memodulasi Mikroflora Usus

Dalam kolon terdapat lebih dari 400 macam bakteri. Inulin secara selektif dapat meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas metabolisme dari bakteri yang menguntungkan, terutama komunitas bifidobakter, dan menekan bakteri yang merugikan, seperti *Clostridium sp.*, dan *E. coli*. Efek inulin ini disebut efek prebiotik atau bifidogenik (Franck dan De Leenheer, 2002).

Prebiotik adalah komponen makanan yang tidak dapat dicerna manusia namun memberikan efek yang menguntungkan dimana secara selektif dapat menstimulasi pertumbuhan atau aktivitas bakteri usus, sehingga dapat meningkatkan kesehatan manusia. Inulin dan oligofruktosa tidak dapat dicerna kecuali melalui aktivitas bakteri; keduanya dapat merubah komposisi flora usus manusia melalui fermentasi spesifik dan memberikan hasil dimana komunitas bifidobakter menjadi yang paling dominan (Kaur dan Gupta, 2002). Berdasarkan Miller-Catchpole (1989), efek menguntungkan dari inulin adalah berdasarkan kemampuan dari bifidobakter dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang merusak melalui pembentukan bakterisodin, yaitu substansi protein yang mempunyai kemampuan membunuh bakteri (Kaur dan Gupta, 2002).

2.1.5.4 Inulin Meningkatkan Penyerapan Mineral

Inulin dapat meningkatkan penyerapan kalsium yang bermanfaat untuk membantu pembentukan struktur tulang dan gigi (Kaur dan Gupta, 2002). Scholz-Ahrens *et al.* (1998) meneliti efek pemberian inulin terhadap peningkatan penyerapan kalsium yang terlihat dari meningkatnya densitas mineral pada tulang tikus percobaan (Franck dan De Leenheer, 2002).

Penelitian Van den Heuvel *et al.* (1999) terhadap 30 remaja perempuan memberikan hasil bahwa 8,0 g inulin per hari dapat meningkatkan absorpsi

kalsium yang signifikan. Coudray *et al.* (1997) melakukan penelitian pada orang dewasa diperoleh bahwa diperlukan 40,0 g inulin per hari untuk memberikan peningkatan absorpsi kalsium yang signifikan. Penelitian-penelitian diatas menunjukkan bahwa ada suatu masa tertentu dimana tubuh membangun cadangan kalsium secara efektif dan masa tersebut sangat penting untuk meminimalkan kemungkinan osteoporosis di masa yang akan datang (Franck dan De Leenheer, 2002).

Menurut Carabin dan Flamm (1999), peningkatan penyerapan kalsium ini mungkin disebabkan karena penurunan pH saluran cerna akibat pembentukan asam lemak rantai pendek yang merupakan hasil dari fermentasi inulin oleh bakteri usus. Penurunan pH saluran cerna menyebabkan peningkatan konsentrasi bentuk ion dari kalsium meningkatkan kelarutannya, dan meningkatkan penyerapan ion kalsium di usus besar (Kaur and Gupta, 2002).

2.2 Sirup Multivitamin

2.2.1 Sirup

Sirup adalah sediaan jenuh atau hampir jenuh dari larutan gula. Sirup yang tidak mengandung bahan obat dikenal sebagai sirup pembawa (*flavouring syrup*), seperti sirup ceri dan sirup koko. Sedangkan sirup yang mengandung bahan obat dikenal sebagai sirup obat (*medicinal syrup*), seperti sirup klorfeniramin maleat dan sirup efedrin sulfat (Parrott, 1970). Rasa sirup yang manis menjadikannya sebagai bahan pembawa yang menyenangkan untuk pemberian obat secara oral. Sirup-sirup terutama efektif dalam pemberian obat untuk anak-anak, karena rasanya yang enak biasanya menghilangkan keengganan pada sebagian anak-anak untuk meminum obat (Ansel, 1989).

Sirup obat dibuat dengan menggabungkan masing-masing komponen tunggal dari sirup seperti sukrosa, air murni, bahan pemberi rasa, bahan pewarna, dan bahan obat. Namun, asosiasi yang kuat antara air dan gula dapat menyebabkan bahan obat yang larut air menjadi sulit tercampur dalam sirup. Oleh karena itu, bahan obat tersebut perlu dilarutkan dahulu dalam sejumlah air dan kemudian ditambahkan sirup pembawa (Parrott, 1970). Sebagian besar sirup

mengandung komponen-komponen utama yaitu gula, pengawet, pewarna, dan pemberi rasa disamping air murni dan bahan-bahan obat.

2.2.1.1 Gula

Sukrosa adalah gula yang paling sering digunakan dalam sirup, walaupun dalam keadaan khusus dapat diganti dengan gula-gula lainnya seperti glukosa atau senyawa bukan gula seperti sorbitol, gliserin, dan propilen glikol. Karakteristik yang ingin dicapai dengan penambahan sukrosa dan zat-zat penggantinya adalah dicapainya viskositas yang tepat dan kestabilan dari sirup. Kandungan sukrosa dalam sirup biasanya 60% - 80%. Larutan gula yang kurang pekat merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme, sebaliknya larutan gula yang pekat lebih resisten terhadap pertumbuhan mikroorganisme (Ansel, 1989). Penambahan bahan-bahan seperti sorbitol sebanyak 20% dapat mengurangi kecenderungan sirup mengkristal pada mulut botol, dan gliserin berperan sebagai kosolven yang dapat meningkatkan kelarutan dari bahan obat dalam sirup (Parrott, 1970).

2.2.1.2 Pengawet

Jumlah pengawet yang dibutuhkan untuk menjaga sirup terhadap pertumbuhan mikroba berbeda-beda sesuai dengan banyaknya air yang terkandung dalam sirup sebagai media pertumbuhan, sifat, dan aktivitas dari pengawet yang digunakan (Ansel, 1989). Pengawet yang umum digunakan pada sirup dengan konsentrasi lazim yang efektif adalah asam benzoat (0,1% - 0,2%), natrium benzoat (0,1% - 0,2%), dan campuran metilparaben (0,18%) dengan propilparaben (0,02%) (Wade dan Weller, 1994).

2.2.1.3 Pemberi Rasa

Untuk meningkatkan penerimaan pasien, sediaan obat harus dapat memberikan rasa dan penampakan yang menarik. Khususnya pada anak-anak, mereka akan memilih obat yang memiliki rasa yang enak. Rasa yang tidak enak dari obat dapat disalut atau disamarkan dengan penambahan bahan-bahan pemberi rasa seperti vanilin, minyak lemon, minyak jeruk, dan *peppermint* (Parrott, 1970).

2.2.1.4 Pemberi Warna

Untuk menambah daya tarik sirup, umumnya digunakan zat warna yang berhubungan dengan pemberi rasa yang digunakan, misalnya hijau untuk rasa permen, coklat untuk rasa coklat, dan sebagainya. Pewarna yang digunakan umumnya mempunyai sifat yang larut dalam air, tidak bereaksi dengan komponen-komponen lain dalam sirup, dan warnanya stabil pada kisaran pH dan dibawah cahaya yang intensif (Ansel, 1989).

2.2.2 Multivitamin

Vitamin adalah kelompok nutrien organik yang dibutuhkan dalam jumlah kecil untuk berbagai fungsi biokimia dan umumnya tidak dapat disintesis oleh tubuh sehingga harus diperoleh dari makanan (Murray, Granner, Mayes, dan Rodwell, 2003). Vitamin penting untuk perkembangan fisik, mental, dan emosional anak. Selama masa pertumbuhan, kebutuhan kalori anak dapat diperoleh dari metabolisme lemak, protein, dan karbohidrat, namun tanpa vitamin dan mineral proses metabolisme tersebut tidak dapat berjalan dengan baik. Setiap vitamin memiliki perannya masing-masing dalam sistem metabolisme dan tidak ada vitamin yang dapat digantikan oleh vitamin lain dalam menjalankan fungsinya (Mindell, 1981).

Berdasarkan kelarutannya, vitamin dibagi menjadi dua kelompok, yaitu vitamin larut lemak dan vitamin larut air. Vitamin larut lemak contohnya adalah vitamin A, vitamin D, vitamin E, dan vitamin K. Sedangkan vitamin larut air adalah vitamin B dan vitamin C (Linder, 1985). Untuk vitamin yang larut air kelebihan vitamin tersebut akan diekskresikan (tidak disimpan dalam tubuh), hal ini berarti kebutuhan vitamin harus dicukupi setiap hari. Vitamin dapat diperoleh dari makanan sehari-hari atau suplemen dalam bentuk sediaan tablet, kapsul, cairan, maupun parenteral. Suplemen vitamin tersebut biasanya mengandung beberapa jenis vitamin yang disebut suplemen multivitamin. Suplemen multivitamin sering dikombinasikan dengan elemen mineral anorganik untuk menunjang pertumbuhan dan perkembangan anak secara optimal (Mindell, 1981).

Sirup multivitamin merupakan bentuk sediaan yang paling mudah dikonsumsi dan direkomendasikan untuk mencukupi asupan vitamin anak sehari-

hari. Sediaan ini berupa cairan sehingga sesuai untuk anak-anak yang tidak dapat mengonsumsi vitamin dalam bentuk tablet atau tablet kunyah. Sirup multivitamin mengandung vitamin-vitamin dalam dosis yang tepat untuk dikonsumsi setiap harinya (Mindell, 1981).

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2.3.1 Teori Dasar KCKT

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan teknik analisis yang paling cepat berkembang dalam kimia analitik. Penggunaannya yang sangat banyak terdiri atas berbagai metode dalam kromatografi cair. Metode kromatografi cair dibagi atas dua macam, yaitu kromatografi cair retensif, dan kromatografi cair non-retensif. Pemisahan pada kromatografi cair retensif dicapai melalui interaksi antara zat terlarut dengan fase diam. Tipe ini mencakup fase normal, fase terbalik, dan kromatografi ion. Sedangkan pada kromatografi cair non-retensif pemisahan dicapai bergantung pada perbedaan besar molekul zat terlarut dimana terjadi interaksi antara zat terlarut dengan pori-pori yang terdapat pada permukaan fase diam. Tipe ini dikenal sebagai kromatografi eksklusi (Harmita, 2006).

2.3.2 Keuntungan KCKT (Johnson dan Stevenson, 1991)

- a. Kecepatan; waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15-30 menit. Untuk analisis yang tidak rumit, waktu analisis dapat dicapai kurang dari 5 menit.
- b. Resolusi atau daya pisahnya baik.
- c. Kepekaan; pada KCKT bergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan.
- d. Kolom dapat digunakan kembali.
- e. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi.
- f. Dapat digunakan untuk molekul besar dan ion; KCKT dalam ragam eksklusi dan pertukaran ion ideal untuk menganalisis molekul besar dan ion.

- g. Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan; sebagian besar detektor yang dipakai pada KCKT tidak merusak komponen zat yang dianalisis, sehingga zat yang telah dielusi dapat dikumpulkan dengan mudah setelah melewati detektor.

2.3.3 Jenis-jenis Kromatografi

2.3.3.1 Kromatografi Cair-Padat (KCP)

Cara ini didasarkan pada penjerapan linarut pada penjerap polar seperti silika gel atau alumina. Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu bentuk KCP. Pada KCKT, kolom dapat dikemas dengan partikel mikro atau makro atau pelikel (berkulit tipis, 37-44 μm). Sebagian besar KCKT yang dilakukan sekarang dilaksanakan memakai partikel mikro yang lebih kecil dari 20 μm . Cara tersebut umumnya dipakai untuk linarut yang larut dalam pelarut organik dan tidak terionkan (Johnson dan Stevenson, 1991).

2.3.3.2 Kromatografi Partisi

Mulanya kromatografi partisi cair-cair menggunakan fase diam silika atau alumina yang permukaannya dilapisi lapisan cair. Pendekatan seperti ini menyebabkan terkikisnya lapisan fase diam tersebut ke dalam fase gerak. Temuan fase diam yang terikat secara kimia menyebabkan tersisihnya kromatografi partisi cair-cair dari analisis farmasi (Harmita, 2006).

Untuk memenuhi kebutuhan akan kolom yang lebih tahan lama, dikembangkan kemasan dengan fase diam yang terikat secara kimia kepada partikel yang disebut penyangga. Kromatografi partisi bentuk ini disebut kromatografi fase terikat. Berdasarkan fase terikat inilah kromatografi partisi terbagi atas fase normal dan fase terbalik. Kromatografi partisi disebut fase normal jika fase diam lebih polar daripada fase gerak, dan disebut fase terbalik jika fase gerak lebih polar daripada fase diamnya. Pada kromatografi fase terbalik, komponen yang lebih polar akan terelusi lebih cepat daripada komponen yang kurang polar. Kromatografi partisi fase terbalik adalah kromatografi yang paling populer yang digunakan saat ini (Johnson dan Stevenson, 1991).

2.3.3.3 Kromatografi Pertukaran Ion (IEC)

Kromatografi pertukaran ion dapat dipakai untuk memisahkan komponen-komponen cuplikan bermuatan ion atau dapat menjadikannya bermuatan ion. Kromatografi ion menggunakan fase diam yang dapat menukar ion dengan ion dari fase gerak (Harmita, 2006). Pertimbangan pemakaian kromatografi pertukaran ion adalah jika cuplikan mengandung komponen berupa ion dan larut dalam air. Jika cuplikan mengandung beberapa komponen bukan ion, hal ini masih dapat dipisahkan dengan kolom penukar ion karena adanya interaksi penjerapan sekunder dengan resin penukar ion (Johnson dan Stevenson, 1991).

2.3.3.4 Kromatografi Eksklusi

Kromatografi eksklusi merupakan jenis kromatografi yang paling mudah dipahami dan dilaksanakan. Cara ini unik, dalam arti pemisahan didasarkan pada ukuran molekul linarut. Kemasannya berupa gel dengan permukaan berpori. Molekul kecil dapat memasuki jaringan pori tersebut dan tertahan di dalam fase diam sehingga akan terelusi lebih lama. Molekul yang lebih besar tidak dapat memasuki pori-pori dan mereka akan melalui kolom tanpa ditahan (Johnson dan Stevenson, 1991).

2.3.4 Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya (Harmita, 2006). Detektor yang dapat digunakan dalam analisis KCKT bermacam-macam, diantaranya adalah detektor serapan optik, detektor indeks bias, detektor fluoresensi, dan detektor elektrokimia (Gandjar dan Rohman, 2007). Karakteristik macam-macam detektor pada KCKT dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Detektor yang penggunaannya cukup luas setelah detektor UV-Vis adalah detektor indeks bias. Pengukuran berdasarkan perbedaan indeks bias fase gerak murni dengan indeks bias fase gerak yang berisi komponen sampel (Ahuja dan Wong, 2005).

Tabel 2.1 Karakteristik detektor pada KCKT

Detektor	Sensitivitas (g/mL)	Karakteristik
Serapan Optik: Fotometer filter Spektrofotometer Spektrometer <i>photo-diode array</i>	5×10^{-10} 5×10^{-10} $<2 \times 10^{-10}$	Sensitivitas baik, paling sering digunakan, selektif terhadap gugus-gugus dan struktur-struktur yang tidak jenuh.
Indeks bias	5×10^{-7}	Hampir bersifat universal akan tetapi sensitivitas sedang. Sangat sensitif terhadap suhu dan tidak dapat digunakan pada elusi bergradien.
Fluoresensi	10^{-12}	Sensitivitas sangat bagus, selektif, tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.
Elektrokimia: Konduktimetri Amperometri	10^{-8} 10^{-12}	Peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak, tidak dapat digunakan pada elusi bergradien. Hanya mendeteksi solut-solut ionik. Sensitivitas sangat baik, selektif tetapi dapat timbul masalah dengan adanya kontaminasi elektroda.

[Sumber: Gandjar dan Rohman, 2007]

Detektor indeks bias memberikan respon akibat perubahan indeks bias yang disebabkan cuplikan. Sensitivitas deteksi, umumnya dalam mikrogram, sangat rendah dibandingkan dengan detektor lain. Detektor ini sangat peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir. Untuk menghasilkan kromatogram yang baik diperlukan oven dengan kepekaan $0,001^{\circ}\text{C}$ dan sistem elusi yang bebas pulsa untuk menghindari *noise* (Harmita, 2006). Detektor ini digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang aktivitas kromofornya rendah seperti senyawa

gula, asam organik, trigliserida, polimer, dan eksipien farmasi (Ahuja dan Wong, 2005).

2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Harmita, 2006). Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi. Menurut USP (United States Pharmacopeia), parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ), ketangguhan metode (ruggedness), dan kekuatan (robustness) (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.4.1 Akurasi

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang sebenarnya. Metode untuk menentukan akurasi, diantaranya adalah metode penambahan analit pada formulasi plasebo, dan metode adisi (Snyder, Kirkland, dan Glajch, 1997). Syarat akurasi yang baik adalah memenuhi persentase uji perolehan kembali (%UPK) sebesar 98% - 102% (Harmita, 2006).

Metode penambahan analit pada formulasi plasebo (matriks) dilakukan karena adanya komponen lain dalam matriks mungkin dapat mengganggu pemisahan, deteksi, dan keakuratan dari suatu metode analisis. Standar baku analit ditambahkan dalam formulasi plasebo pada konsentrasi tertentu. Dianjurkan untuk melakukan penentuan akurasi dalam lima konsentrasi berbeda, yaitu 80%, 90%, 100%, 110%, dan 120% dari konsentrasi normal analit dalam sampel, atau dapat juga dilakukan pada konsentrasi 50%, 75%, 100%, 125%, dan 150% dari konsentrasi normal analit dalam sampel. Minimum 3 kali pengulangan dilakukan dalam setiap level konsentrasi (Snyder, Kirkland, dan Glajch, 1997).

Metode adisi standar analit dilakukan dengan cara menambahkan standar analit yang diketahui jumlahnya ke dalam sampel matriks yang sudah mengandung analit sebelumnya. Secara umum, standar analit yang ditambahkan adalah pada konsentrasi 25%, 50%, dan 100% dari konsentrasi analit dalam matriks sampel. Matriks sampel yang belum di tambahkan standar analit (*unspiked sample*) dan matriks sampel yang sudah ditambahkan analit (*spiked sample*) dianalisis secara triplo dan dihitung konsentrasi analitnya. Metode ini diterapkan jika tidak mungkin mempersiapkan plasebo (matriks) yang sesuai dengan sampel yang dianalisis (Snyder, Kirkland, dan Glajch, 1997).

2.4.2 Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Harmita, 2006). Presisi biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari seri jumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Gandjar dan Rohman, 2007). Pada pengujian dengan KCKT, nilai KV antara 1%-2% biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah banyak, sedangkan untuk senyawa-senyawa aktif yang kompleks KV berkisar antara 5%-10% (Snyder, Kirkland, dan Glajch, 1997).

2.4.3 Selektivitas

Selektivitas atau spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara cepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel seperti ketidakmurnian, cemaran, produk degradasi, dan komponen matriks (Gandjar dan Rohman, 2007). Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lain, atau pembawa pada plasebo dengan hasil analisis standar baku. Penyimpangan hasil jika ada merupakan hasil selisih dari hasil uji keduanya (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.4.4 Linearitas dan Rentang

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linearitas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linearitas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (b), intersep (a), dan koefisien korelasinya (r). Dari nilai-nilai tersebut maka dapat diperoleh persamaan regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Suatu metode dapat dikatakan memenuhi syarat linearitas jika tercapai $r \geq 0,9990$ (Harmita, 2006).

Rentang atau kisaran didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi yang dimana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linearitas mencukupi. Kisaran-kisaran konsentrasi yang diuji tergantung pada jenis metode dan kegunaannya. Untuk pengujian komponen utama, maka konsentrasi baku harus diukur dekat atau sama dengan konsentrasi kandungan analit yang diharapkan. Suatu strategi yang baik adalah mengukur baku dengan kisaran 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.4.5 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat terdeteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit berada diatas atau dibawah nilai tertentu. Batas kuantitasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. LOD dan LOQ diekspresikan sebagai konsentrasi (Gandjar dan Rohman, 2007).

LOD dan LOQ dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi (Harmita, 2006).

2.4.6 Ketangguhan Metode

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal seperti laboratorium, analis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, dan hari yang berbeda. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antar laboratorium dan antar analis (Harmita, 2006).

2.4.7 Kekuatan Metode

Kekuatan metode merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek pada presisi dan akurasi. Perubahan dilakukan dengan memvariasikan parameter-parameter metode seperti persentase pelarut organik, pH, kekuatan ionik, dan suhu (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.5 Metode Analisis Inulin

Berikut adalah beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis inulin yang telah dilakukan sebelumnya:

2.5.1 Penentuan Inulin dalam Produk Daging secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan Detektor Indeks Bias (Vendrell-Pascuas, Castellote-Bargallo', dan Lo'pez-Sabater, 2000)

2.5.1.1 Preparasi Sampel

Daging sebanyak 300 g digiling dan diaduk hingga homogen. Kemudian ditambahkan 130 mL buffer asetat 0,1 M (pH 4,5) dan 5 mL larutan ramnosa (120 mg/mL). Beaker dan isinya diaduk dengan pengaduk magnetik pada suhu kamar selama 15 menit (sampai sampel terdispersi sempurna). Setelah proses

homogenisasi, beaker ditutup dengan aluminium foil dan ditempatkan pada *shaking water-bath* suhu 85°C selama 20 menit untuk mengekstraksi inulin.

Setelah proses ekstraksi, beaker diangkat dan didinginkan sampai mencapai suhu 60°C. Kemudian ditambahkan 100 µL (41,67 INU) enzim fruktozim ke dalam beaker dan inkubasi pada *shaking water-bath* pada suhu 60°C selama 30 menit untuk mencerna inulin. Beaker didinginkan pada suhu kamar dan sampel dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 200,0 mL. Sampel ditambahkan 3 mL reagen Carrez I (10,6 g kalium ferrisianida trihidrat dalam 100 mL air destilasi) dan 3 mL reagen Carrez II (23,8 g zink asetat dihidrat dan 3 g asam asetat anhidrat dalam 100 mL air destilasi) untuk mengendapkan protein, kemudian ditambahkan air ke dalam labu ukur sampai batas. Setelah dihomogenkan, labu didiamkan selama 1 atau 2 jam untuk menyempurnakan pengendapan protein. Ekstrak kemudian disaring melalui kertas saring dan dilewatkan pada *C18 Sep-pak plus cartridge* (untuk memurnikan analit), yang sebelumnya telah dikondisikan dengan 10 mL metanol dan 10 mL *Milli-Q water*. Ekstrak yang sudah disaring kemudian di transfer ke dalam *ependorf* 1,5 mL sampai akan digunakan untuk dianalisis dengan KCKT. Sampel disimpan pada ruang gelap pada suhu -20°C. Sampel disaring melalui penyaring berukuran 0,45 µm sebelum disuntikkan ke sistem KCKT.

2.5.1.2 Kondisi Analisis

- a. Pompa : sistem pompa model 1050 *Hewlett-Packard*
- b. Kolom : kromasil 100 NH₂ 5 µm (250x4,6 mm)
- c. Fase gerak : asetonitril-air (80:20, v/v)
- d. Laju alir : 1,8 mL/menit
- e. Detektor : indeks bias model LC-25

Volume sampel yang diinjeksikan sebanyak 20 µL. Semua pengukuran dilakukan pada suhu kamar. Area puncak digunakan untuk analisis secara kuantitatif. Internal standar yang digunakan adalah rhamnosa. Kurva kalibrasi disiapkan dari 6 level konsentrasi yang diambil antara 0,14 mg/mL - 3,07 mg/mL sukrosa dalam air, dan 5 level konsentrasi yang diambil antara 0,41 mg/mL - 3,25

mg/mL inulin dalam air. Setiap standar tersebut mengandung rhamnosa sebesar 3,25 mg/mL.

2.5.2 Penetapan Kadar Inulin untuk Tujuan Pelabelan pada Makanan (Azuleta dan Sambucetti, 2001)

2.5.2.1 Preparasi Sampel

Sampel yang berupa padatan dihancurkan terlebih dahulu dan diayak dengan ayakan 0,05 mm sehingga diperoleh partikel sampel yang homogen. Pada sampel berupa produk yang mengandung susu maka analisis dilakukan pada bentuk dadihnya (*whey*) yang diperoleh dengan mengendapkan protein menggunakan beberapa tetes asam asetat, kemudian atur pH $\pm 6,5$.

Sampel kemudian ditimbang secara seksama sebanyak 1 g dalam beaker 200 mL, tambahkan aquabidestilata panas. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan pengaduk magnetik pada pH 6-8 dan suhu diatur pada 85°C selama 15 menit. Sampel didinginkan pada suhu kamar dengan volume sampel ditetapkan sebanyak 100 mL. Larutan sampel kemudian disaring melalui membran filter 0,2 μm sebelum dianalisis. Jika filtrat sampel akan disimpan dalam lemari pendingin, maka sebelum dianalisis sampel harus dipanaskan kembali hingga 80°C dan didiamkan pada suhu kamar, hal ini dilakukan karena fruktan cenderung mengendap pada suhu dingin.

2.5.2.2 Kondisi Analisis

- a. Pompa : sistem pompa 6000 A (Waters)
- b. Kolom : kolom pertukaran anion *Animex HPX-87C* (Bio-rad)
- c. Fase gerak : aqua deionisasi suhu 85°C
- d. Laju alir : 0,6 mL/menit
- e. Detektor : indeks bias

Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot standar inulin pada konsentrasi antara 0,005 g/100 mL - 1 g/100 mL. untuk mengidentifikasi adanya gula lain dalam sampel uji maka dibuat pengujian larutan standar monosakarida dan disakarida 1 g/100 mL. Diperoleh limit deteksi (LOD) sebesar 0,005 g/100 mL.

2.5.3 Studi Perbandingan Penetapan Kadar Inulin dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Metode Kolorimetri (Wang, Zhang, Liang, Wen, Liu, dan Xu, 2010)

2.5.3.1 Preparasi Sampel

100 g sampel dari pasaran digiling homogen, kemudian ditimbang 1 g - 5 g sampel. Sampel dimasukkan ke dalam beaker dan diekstraksi dengan 90 mL air panas menggunakan *shaking water-bath* pada suhu 85°C selama 25 menit. Sampel didinginkan sampai suhu 60°C, ditambahkan 100 µL inulinase, dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit dengan menggunakan *shaking water-bath*. Sampel didiamkan pada suhu kamar, kemudian larutan sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL dan dicukupkan volumenya dengan air sampai batas labu. Setelah homogenasi dan sentrifugasi selama 20 menit, larutan sampel kemudian disaring melalui penyaring nilon 0,45 µm sebelum disuntikkan.

2.5.3.2 Kondisi Analisis

- a. Pompa : sistem pompa model LC-20AT (Shimadzu)
- b. Kolom : Shim-pack SCR 101C (Shimadzu)
- c. Fase gerak : air dengan kemurnian tinggi
- d. Laju alir : 1,0 mL/menit
- e. Detektor : indeks bias RID-10A (Shimadzu)

Suhu kolom diatur pada 80°C. Pelarut difiltrasi terlebih dahulu melalui membran filter 0,45 µm. Analisis kuantitatif dengan menggunakan area puncak. Untuk kurva kalibrasi disiapkan 6 level konsentrasi dari 0,10 mg/mL - 5,00 mg/mL fruktosa, atau sukrosa, atau glukosa dalam air.

2.5.4 Penentuan Kandungan Gula Total dan Kandungan Panjang Rantai Rata-rata Inulin dalam Akar *Chicory* (*Cichorium intybus* L) (Van Waes, Baert, Carlier, dan Van Bockstaele, 1998)

2.5.4.1 Preparasi Sampel

Sampel berupa tanaman *chicory* (*Cichorium intybus* L) yang dipotong secara longitudinal dan dicuci bersih tiap potongannya. Sampel diiris dengan parutan keju sehingga diperoleh ukuran yang kecil dengan ketebalan maksimum

2 mm. Sari dari sampel tersebut diambil dan dianalisis segera dengan refraktometer. Sebagian sari sampel disimpan dalam pendingin pada suhu -20°C untuk analisis gula berikutnya.

Total gula merupakan total dari jumlah glukosa dan fruktosa setelah hidrolisis sampel. Irisan sampel dikondisikan dalam asam klorida (0,2 M) pada suhu 85°C selama 1 jam, kemudian ditambahkan natrium klorida untuk menetralkan pH. Setelah disentrifugasi selama 10 menit pada 1400 g, supernatan dibekukan dan disimpan pada suhu -20°C . Untuk analisis, sampel dicairkan kembali dan diencerkan sehingga total gula sekitar 40 mg/L. Sebelum disuntikkan, sampel disaring melalui $0,45\ \mu\text{m}$ membran filter.

2.5.4.2 Kondisi Analisis

Karbohidrat dipisahkan sebagai anion dengan menggunakan natrium hidroksida, atau kombinasi dengan natrium asetat sebagai pelarut (Lee, 1990). Karbohidrat tersebut dideteksi dengan oksidasi pada elektroda emas menggunakan pengulangan rangkaian dari tiga potensial (*Pulse Amperometric Detector/PAD*) untuk menghindari kecurangan akibat elektroda. Peralatan kromatografi menggunakan "Dionex DX-300 IC". Sampel disuntikkan ke sistem KCKT sebanyak 25 μL .

- a. Kolom : CarboPac PA1 (4x250 mm)
- b. Fase gerak : 100 mM NaOH + 10 mM CH_3COONa
- c. Laju alir : 1 mL/menit
- d. Detektor : PAD dengan elektroda emas (Au).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Pelayanan pada Masyarakat dan laboratorium-laboratorium penunjang lainnya di Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan mulai dari Februari 2011 sampai dengan Mei 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat kromatografi cair kinerja tinggi dapat dilihat pada Gambar 3.1 terdiri dari sistem pompa LC-20AD (Shimadzu), injektor manual, kolom *Carbohydrate analysis* 300 x 3,9 mm 10 μ m (Waters), oven kolom CTO-6AS (Shimadzu), detektor indeks bias RID-10A (Shimadzu), degasser DGU-20A5 (Shimadzu); *syringe* 100 μ L ujung tumpul; timbangan analitik (Shimadzu); indikator universal (Merck); *water bath* (Lab-line); kompor listrik; dan alat-alat gelas.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan Baku

Inulin (Beneo Orafiti); glukosa (Roquette); fruktosa (Blossom Industrial); sukrosa (Jawamanis Rafinasi); sampel sirup inulin (Becombion B-Grow, Merck) yang mengandung inulin 500 mg, tiamin HCl 5 mg, riboflavin 2 mg, nikotinamid 20 mg, piridoksin HCl 2,5 mg, D-(+)-pantotenil alkohol 3 mg, kalsium 100 mg, sianokobalamin 3 μ g dalam setiap 5 mL sirup; sirup multivitamin (Becombion B-Komplex, Merck); aquabidestilata (Ikapharmindo, Widatra); asetonitril (*gradien grade for HPLC*, Merck); metanol (*gradien grade for HPLC*, Merck); asam sulfat (*for synthesis*, Merck); dan trietilamin (*for synthesis*, Merck).

3.2.2.2 Larutan Induk

a. Larutan Induk Inulin

Senyawa baku inulin ditimbang dengan seksama sebanyak 1,0 g (kadar 97,7%) kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Serbuk dilarutkan

dengan 10 mL - 15 mL aquabidestilata suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ lalu ditambahkan dengan aquabidestilata sampai batas labu ukur sehingga diperoleh larutan induk standar inulin dengan konsentrasi 39080 $\mu\text{g/mL}$.

b. Larutan Induk Fruktosa

Senyawa baku fruktosa ditimbang dengan seksama sebanyak 1,0 g kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Serbuk dilarutkan dan dicukupkan volumenya dengan aquabidestilata sampai batas labu ukur sehingga diperoleh larutan induk standar fruktosa dengan konsentrasi 40000 $\mu\text{g/mL}$.

c. Larutan Induk Glukosa

Senyawa baku glukosa ditimbang dengan seksama sebanyak 0,5 g kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Serbuk dilarutkan dan dicukupkan volumenya dengan aquabidestilata sampai batas labu ukur sehingga diperoleh larutan induk standar glukosa dengan konsentrasi 20000 $\mu\text{g/mL}$.

d. Larutan Induk Sukrosa

Senyawa baku sukrosa ditimbang dengan seksama sebanyak 1,5 g kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Serbuk dilarutkan dan dicukupkan volumenya dengan aquabidestilata sampai batas labu ukur sehingga diperoleh larutan induk standar sukrosa dengan konsentrasi 60000 $\mu\text{g/mL}$.

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Optimasi Kondisi Analisis Inulin

3.3.1.1 Pemilihan Metode Analisis Inulin

Larutan standar fruktosa 30000 $\mu\text{g/mL}$ dan glukosa 7500 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL dengan menggunakan fase gerak asetone-nitril-air (87:13) dengan laju alir 1,0 mL/menit sebagai kondisi awal. Waktu retensi, nilai N, HETP, faktor ikutan, dan resolusi yang diperoleh dicatat.

Larutan diatas disuntikkan kembali sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan menggunakan fase gerak asetone-nitril-air (85:15) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Waktu retensi, nilai N, HETP, faktor ikutan, dan resolusi yang

diperoleh dicatat kemudian dilakukan perbandingan hasil analisis yang diperoleh dari metode yang pertama dan kedua.

Percobaan juga dilakukan pada hasil hidrolisis standar inulin. Larutan standar inulin yang sudah dihidrolisis disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan menggunakan metode analisis pertama dan metode analisis kedua. Waktu retensi, nilai N, HETP, faktor ikutan, dan resolusi yang diperoleh dicatat, kemudian dilakukan perbandingan hasil analisis yang diperoleh dari metode yang pertama dan kedua.

3.3.1.2 Optimasi Kondisi Hidrolisis Inulin

Tabung reaksi sebanyak lima buah disiapkan dan dibersihkan, kemudian ke dalam masing-masing tabung dipipet larutan standar inulin 39080 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan berturut-turut H_2SO_4 1N ($\text{pH} \pm 2$) sebanyak 1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 mL, 5,0 mL, 6,0 mL, dan 7,0 mL. Secara bersamaan pada ketujuh tabung reaksi tersebut dilakukan hidrolisis dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, tabung-tabung tersebut didinginkan dan dipindahkan masing-masing isinya ke dalam labu ukur 10,0 mL. Masing-masing labu ukur ditambahkan larutan pekat trietilamin sampai pH netral kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi akhir setara dengan inulin 1954 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μL pada kondisi analisis terpilih. Area fruktosa yang diperoleh dicatat. Kondisi hidrolisis inulin yang menghasilkan area fruktosa terbesar adalah kondisi hidrolisis terpilih.

3.3.2 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan standar fruktosa 5000 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil dari kromatogram berupa area fruktosa dan waktu retensi dicatat dan dihitung koefisien variasi pada 5 kali penyuntikan.

3.3.3 Penentuan Faktor Konversi Inulin Menjadi Fruktosa

Untuk penentuan faktor konversi inulin menjadi fruktosa, dibuat empat level konsentrasi larutan standar inulin didalam tabung reaksi. Masing-masing larutan tersebut ditambahkan 5,0 mL H₂SO₄ 1N (pH ±2) dan dihidrolisis dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, tabung-tabung tersebut didinginkan dan larutannya dipindahkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Larutan pekat trietilamin ditambahkan sampai pH netral kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi akhir setara dengan konsentrasi inulin 2931 µg/mL, 3908 µg/mL, 4885 µg/mL, dan 5862 µg/mL. Larutan-larutan tersebut disuntikkan masing-masing sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram berupa area fruktosa dicatat dan dihitung konsentrasi fruktosa yang diperoleh.

3.3.4 Penentuan Faktor Konversi Sukrosa Menjadi Fruktosa

Untuk penentuan faktor konversi sukrosa menjadi fruktosa, dibuat tiga level konsentrasi larutan standar sukrosa didalam tabung reaksi. Masing-masing larutan tersebut ditambahkan 5,0 mL H₂SO₄ 1N (pH ±2) dan dihidrolisis dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, tabung-tabung tersebut didinginkan dan larutannya dipindahkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Larutan pekat trietilamin ditambahkan sampai pH netral kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi akhir setara dengan konsentrasi sukrosa 6000 µg/mL, 9000 µg/mL, dan 12000 µg/mL. Larutan-larutan tersebut disuntikkan masing-masing sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram berupa area fruktosa dicatat dan dihitung konsentrasi fruktosa yang diperoleh.

3.3.5 Validasi Metode Analisis Inulin dalam Sirup

3.3.5.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar Fruktosa, Penentuan Koefisien Korelasi (r), Limit Deteksi (LOD), dan Limit Kuantitasi (LOQ)

Larutan standar fruktosa dibuat dengan konsentrasi 2000 µg/mL, 3000 µg/mL, 4000 µg/mL, 5000 µg/mL, 6000 µg/mL, dan 8000 µg/mL. Masing-masing

larutan dengan seri konsentrasi tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram berupa area fruktosa dicatat dan dibuat persamaan kurva kalibrasi dari data tersebut.

Kurva kalibrasi dibuat antara konsentrasi larutan standar inulin dengan luas puncak kromatogram. Dari data yang diperoleh dilakukan perhitungan untuk mendapatkan persamaan garis regresi, koefisien korelasi (r), serta limit deteksi (LOD), dan limit kuantitasi (LOQ).

3.3.5.2 Uji Selektivitas

Larutan blanko yaitu 5,0 mL H_2SO_4 1N ($\text{pH} \pm 2$) dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, kemudian ditambahkan larutan pekat trietilamin sampai pH netral, dan ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur. Larutan tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram larutan blanko tidak boleh ada gangguan yang bermakna di sekitar waktu retensi fruktosa.

Larutan plasebo sirup sebanyak 3,1500 g (berat jenis sirup plasebo; BJ = 1,26 g/mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan tersebut ditambahkan 5,0 mL H_2SO_4 1N ($\text{pH} \pm 2$) dan dihidrolisis dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, tabung reaksi didinginkan dan larutannya dipindahkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Larutan pekat trietilamin ditambahkan sampai pH netral kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram larutan plasebo tidak boleh ada gangguan yang bermakna di sekitar waktu retensi fruktosa.

3.3.5.3 Uji Presisi

Pertama-tama, uji presisi dilakukan pada larutan standar inulin yang dihidrolisis. Larutan standar inulin dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 5,0 mL H_2SO_4 1N ($\text{pH} \pm 2$) dan dihidrolisis dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, tabung reaksi didinginkan dan larutannya dipindahkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Larutan pekat trietilamin ditambahkan sampai pH netral kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai

batas labu ukur sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi akhir setara dengan konsentrasi inulin 4885 $\mu\text{g/mL}$. Percobaan dilakukan sebanyak enam kali pengulangan. Masing-masing larutan tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram berupa area fruktosa dicatat dan dihitung nilai koefisien variasinya.

Kedua, uji presisi dilakukan pada sediaan plasebo sirup yang ditambahkan standar inulin pada kadar 100% dari yang tertera pada label sediaan jadi. Serbuk standar inulin yang telah ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dilarutkan dengan aquabidestilata suhu $\pm 60^\circ\text{C}$ dan ditambahkan sirup plasebo sebanyak 3,1500 g (berat jenis sirup plasebo; BJ = 1,26 g/mL) kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur. Larutan dipipet sebanyak 2,0 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5,0 mL H_2SO_4 1N (pH ± 2) dan dihidrolisis dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, tabung reaksi didinginkan dan larutannya dipindahkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Larutan pekat trietilamin ditambahkan sampai pH netral kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur. Percobaan dilakukan sebanyak enam kali pengulangan. Cara kerja yang sama juga dilakukan pada sirup plasebo tanpa ditambahkan serbuk standar inulin. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram berupa area fruktosa dicatat, dan dihitung persentase perolehan kembali, serta nilai koefisien variasinya.

3.3.5.4 Uji Akurasi

Uji akurasi dengan metode *spiked placebo recovery* dengan cara menambahkan sejumlah tertentu zat aktif ke dalam formulasi plasebo. Sirup plasebo ditambahkan serbuk standar inulin sebesar 80%, 100%, dan 120% dari yang tertera pada label sediaan jadi. Serbuk standar inulin yang telah ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL kemudian dilarutkan dengan aquabidestilata suhu $\pm 60^\circ\text{C}$ dan ditambahkan sirup plasebo sebanyak 3,1500 g (berat jenis sirup plasebo; BJ = 1,26 g/mL) kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur. Larutan dipipet sebanyak 2,0 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 5,0 mL H_2SO_4 1N (pH ± 2) dan dihidrolisis

dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, tabung reaksi didinginkan dan larutannya dipindahkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Larutan pekat trietilamin ditambahkan ke dalam labu ukur sampai pH netral kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan hidrolisis dalam setiap level konsentrasi. Cara kerja yang sama juga dilakukan pada sirup plasebo tanpa ditambahkan serbuk standar inulin. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram berupa area fruktosa dicatat, dan dihitung persentase perolehan kembali, serta nilai koefisien variasinya.

3.3.6 Pengukuran Kadar Inulin dalam Sampel Sirup

Pengukuran kadar inulin dalam sampel dilakukan secara duplo dengan membuat tiga macam larutan, yaitu larutan sampel sirup yang dihidrolisis, larutan baku sukrosa yang tidak dihidrolisis, dan larutan sampel sirup yang tidak dihidrolisis.

3.3.6.1 Pembuatan Larutan Sampel Sirup yang Dihidrolisis

Sampel sirup sebanyak 3,0250 g (berat jenis sampel sirup; BJ = 1,21 g/mL) dimasukkan dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambahkan aquabidestilata hingga batas labu ukur. Larutan tersebut dipipet sebanyak 2,0 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5,0 mL H₂SO₄ 1N (pH ±2) dan dihidrolisis dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, tabung reaksi didinginkan dan larutannya dipindahkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Larutan pekat trietilamin ditambahkan sampai pH netral kemudian ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram berupa area fruktosa dicatat dan dihitung konsentrasi fruktosa yang diperoleh.

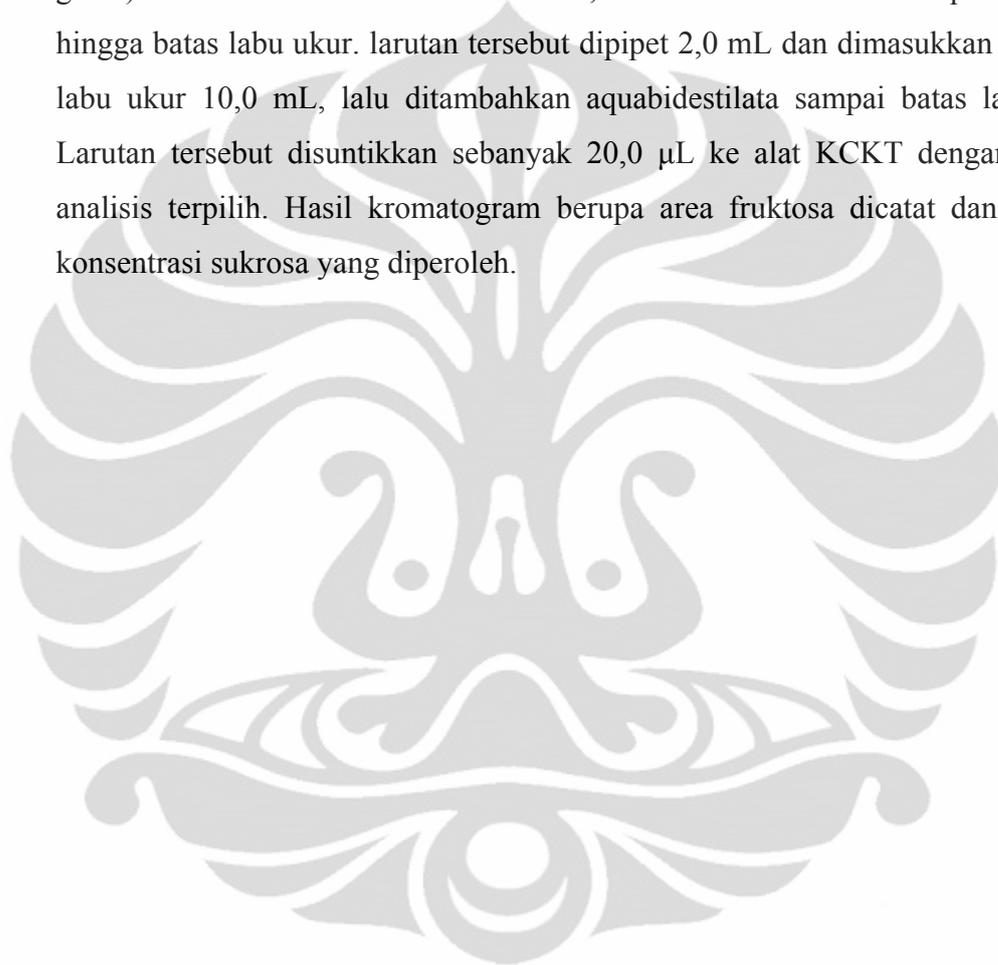
3.3.6.2 Pembuatan Larutan Standar Sukrosa yang Tidak Dihidrolisis

Larutan standar sukrosa 12000 µg/mL yang tidak dihidrolisis disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil

kromatogram berupa area fruktosa dicatat dan dihitung konsentrasi sukrosa yang diperoleh.

3.3.6.3 Pembuatan Larutan Sampel Sirup yang Tidak Dihidrolisis

Sampel sirup sebanyak 3,0250 g (berat jenis sampel sirup; BJ = 1,21 g/mL) dimasukkan dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambahkan aquabidestilata hingga batas labu ukur. larutan tersebut dipipet 2,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, lalu ditambahkan aquabidestilata sampai batas labu ukur. Larutan tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram berupa area fruktosa dicatat dan dihitung konsentrasi sukrosa yang diperoleh.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, kolom untuk analisis yang digunakan adalah kolom silika dengan ikatan propilamin (*Carbohydrate Analysis – Waters*). Kolom ini digunakan untuk pemisahan monosakarida, disakarida, dan beberapa trisakarida (Shaw, 1988). Inulin merupakan suatu polisakarida sehingga tidak dapat dianalisis secara langsung menggunakan kolom ini. Proses hidrolisis terhadap inulin dilakukan terlebih dahulu untuk memperoleh monosakarida fruktosa yang dapat dianalisis dengan menggunakan kolom tersebut.

Inulin adalah suatu polimer dari fruktosa dengan adanya glukosa pada ujung rantainya (Franck dan De Leenheer, 2002). Proses hidrolisis tidak hanya menghasilkan monosakarida fruktosa tetapi juga glukosa sehingga kondisi analisis yang digunakan harus dapat memisahkan kedua komponen tersebut. Pada analisis menggunakan kolom propilamin digunakan fase gerak berupa campuran asetonitril dan air (Nollet, 2000). Komposisi fase gerak mempengaruhi resolusi dan waktu retensi analit. Jika asetonitril ditingkatkan maka dapat meningkatkan resolusi, namun akan menyebabkan waktu retensi menjadi semakin panjang. Penurunan konsentrasi asetonitril akan memberikan waktu retensi yang lebih singkat, karena sampel yang berupa karbohidrat akan lebih mudah larut dalam fase gerak yang digunakan, namun akibatnya puncak-puncak dari kromatogram akan menjadi semakin dekat (Shaw, 1988). Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi terhadap komposisi fase gerak sehingga dapat diperoleh kondisi optimum untuk pemisahan fruktosa dan glukosa.

4.1 Optimasi Kondisi Analisis Inulin

4.1.1 Pemilihan Metode Analisis Inulin

Pemilihan metode analisis inulin dilakukan terhadap dua komposisi fase gerak yaitu fase gerak dengan komposisi asetonitril-air (83:17) dan fase gerak dengan komposisi asetonitril-air (85:15). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit. Larutan standar yang digunakan adalah campuran larutan standar fruktosa dan glukosa. Berdasarkan pengamatan, fruktosa memiliki waktu retensi yang lebih singkat daripada glukosa.

Metode yang dipilih adalah metode analisis kedua dengan komposisi fase gerak asetonitril-air (85:15). Nilai statistik N, HETP, Tf, dan R yang dihasilkan terutama terhadap standar fruktosa lebih baik dari pada metode analisis pertama. Cara menghitung nilai N, HETP, Tf dan R dapat dilihat pada Rumus 4.1 sampai Rumus 4.4 pada Lampiran 1 dan 2.

Selain itu, metode pertama tidak dipilih karena metode ini memberikan resolusi yang kurang baik pada analisis hasil hidrolisis inulin sehingga metode kedua adalah metode terpilih. Hasil statistik metode-metode tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Tabel 4.2, serta kromatogram setiap metode dapat dilihat pada Gambar 4.1, Gambar 4.2, Gambar 4.3 dan Gambar 4.4.

4.1.2 Optimasi Kondisi Hidrolisis Inulin

Inulin dalam bentuk larutan relatif stabil terhadap hidrolisis pada suasana pH netral dan suhu kamar. Namun pada kondisi pH dan suhu ekstrim dapat mempercepat laju reaksi hidrolisisnya (Barclay, Ginic-Markovic, Cooper, dan Petrovsky, 2010). Inulin dapat terhidrolisis sempurna pada pH 2,0 dengan penambahan asam sulfat selama 1 jam pada suhu 100°C. Pada kondisi tersebut persentase inulin yang terhidrolisis mencapai 96%, sedangkan lama waktu hidrolisis yang ditingkatkan menjadi 2 jam tidak memberikan perubahan hasil yang bermakna (Szambelan dan Nowak, 2006). Kondisi hidrolisis tersebut diaplikasikan pada percobaan kali ini dengan mengoptimasi jumlah asam sulfat yang diperlukan untuk menghidrolisis inulin sebanyak 1954 µg/mL.

Dari hasil percobaan, kondisi hidrolisis inulin terpilih adalah hidrolisis dengan menggunakan 5,0 mL H₂SO₄ 1N (pH ±2) yang dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 1 jam dan dinetralkan dengan menggunakan larutan pekat trietilamin. Penambahan jumlah asam sulfat kurang dari 5,0 mL belum memberikan hasil yang optimum, sedangkan jumlah asam sulfat lebih dari 5,0 mL menyebabkan penurunan area kromatogram. Hasil statistik optimasi kondisi hidrolisis inulin menjadi fruktosa dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.2 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk menjamin bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama analisis berlangsung. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan melakukan penyuntikan secara berulang pada suatu kondisi analisis dan dilakukan pada hari yang sama. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam persentase koefisien variasi (KV) yang menunjukkan batas variasi yang diperbolehkan dalam suatu analisis. Semakin kecil nilai KV menunjukkan semakin baik suatu sistem yang digunakan. Nilai KV yang direkomendasikan untuk uji kesesuaian sistem pada minimum lima kali penyuntikan adalah $\leq 1\%$ (FDA, 1994).

Larutan standar fruktosa 5000 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak lima kali pengulangan ke alat KCKT dengan menggunakan metode analisis terpilih. Dari hasil penyuntikan diperoleh area dan waktu retensi larutan standar fruktosa yang kemudian dihitung nilai rata-rata dan koefisien variasinya. Kromatogram hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Rata-rata area larutan standar fruktosa adalah 550501 mV/s dengan nilai KV sebesar 0,99%. Sedangkan rata-rata waktu retensi larutan standar fruktosa adalah 7,89 menit dengan nilai KV sebesar 0,66%. Hasil statistik uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.4.

4.3 Penentuan Faktor Konversi Inulin Menjadi Fruktosa

Inulin adalah produk yang berasal dari alam sehingga rasio fruktosa dan glukosa yang dihasilkan dapat berfluktuasi bergantung pada jenis tanaman dimana inulin diperoleh (Vendrell-Pascuas, Castellote-Bargallo', dan Lo'pez-Sabater, 2000). Oleh karena itu, penentuan faktor konversi inulin menjadi fruktosa perlu dilakukan dengan melakukan hidrolisis terhadap standar inulin pada konsentrasi tertentu dan dihitung konsentrasi fruktosa dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi fruktosa ($y = 141,57x - 145727$) terhadap area fruktosa yang diperoleh dari kromatogram.

Dari hasil percobaan terhadap empat konsentrasi inulin diperoleh faktor konversi inulin menjadi fruktosa sebesar 1,01. Nilai tersebut mendekati 1 yang menunjukkan tingginya tingkat kemurnian dari inulin. Hasil percobaan juga

menunjukkan hubungan yang linier antara konsentrasi inulin dengan konsentrasi fruktosa yang dihasilkan dari hidrolisis dalam suasana asam dimana nilai koefisien relasinya adalah $r = 0,9996$. Hasil statistik penentuan faktor konversi inulin menjadi fruktosa dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.4 Penentuan Faktor Konversi Sukrosa Menjadi Fruktosa

Penentuan faktor konversi sukrosa menjadi fruktosa perlu dilakukan karena dalam sampel sirup terdapat sukrosa yang dapat terhidrolisis dalam kondisi asam menjadi fruktosa dan glukosa. Penentuan faktor konversi sukrosa dilakukan dengan melakukan hidrolisis terhadap standar sukrosa pada konsentrasi tertentu dan dihitung konsentrasi fruktosa yang diperoleh dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi fruktosa ($y = 141,57x - 145727$) terhadap area fruktosa yang diperoleh dari kromatogram.

Dari hasil percobaan terhadap tiga konsentrasi sukrosa diperoleh faktor konversi sukrosa menjadi fruktosa sebesar 2,06. Nilai faktor konversi yang dihasilkan mendekati angka 2 yang menunjukkan bahwa komposisi sukrosa adalah terdiri dari 50% fruktosa dan 50% glukosa. Kromatogram larutan standar sukrosa yang dihidrolisis dapat dilihat pada Gambar 4.6. Hasil statistik penentuan faktor konversi inulin menjadi fruktosa dapat dilihat pada Tabel 4.6.

4.5 Validasi Metode Analisis Inulin dalam Sirup

4.5.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar Fruktosa, Penentuan Koefisien Korelasi (r), Limit Deteksi (LOD), dan Limit Kuantitasi (LOQ)

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Pembuatan kurva kalibrasi diawali dengan membuat seri pengenceran larutan standar fruktosa. Pengenceran dilakukan dari larutan induk dan dibuat 6 level konsentrasi larutan, yaitu konsentrasi 2000 $\mu\text{g/mL}$, 3000 $\mu\text{g/mL}$, 4000 $\mu\text{g/mL}$, 5000 $\mu\text{g/mL}$, 6000 $\mu\text{g/mL}$, dan 8000 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan dengan hati-hati dan teliti agar memberikan hasil yang kuantitatif. Pada percobaan, diperoleh persamaan kurva kalibrasi fruktosa yaitu $y = 141,57x - 145727$. Kurva kalibrasi fruktosa dapat dilihat pada Gambar 4.12.

Cara mendapatkan persamaan kurva kalibrasi dapat dilihat pada Lampiran 3, Rumus 4.5.

Koefisien relasi (r) fruktosa yang diperoleh adalah $r = 0,9998$. Nilai r yang diperoleh memenuhi standar linearitas yang ditetapkan yaitu $\geq 0,999$ (Snyder, Kirkland, dan Glajch, 1997). Limit deteksi dan limit kuantitasi fruktosa yang diperoleh adalah $LOD = 108,69 \mu\text{g/mL}$ dan $LOQ = 362,33 \mu\text{g/mL}$. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa batas deteksi dan batas kuantitasi fruktosa lebih rendah dari konsentrasi terendah yang digunakan untuk kurva kalibrasi, yaitu $2000 \mu\text{g/mL}$. Nilai LOD dan LOQ dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari persamaan kurva kalibrasi dengan menggunakan Rumus 4.10 dan Rumus 4.11 yang tertera pada Lampiran 5. Hasil statistik untuk kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.7.

4.5.2 Uji Selektivitas

Uji selektivitas digunakan untuk melihat kemungkinan terdapatnya gangguan dari komponen-komponen lain dalam sampel yang dapat mempengaruhi hasil pengukuran analit (Gandjar dan Rohman, 2007). Komponen-komponen lain yang dapat mengganggu hasil pengukuran fruktosa dapat berasal dari komponen yang digunakan untuk hidrolisis inulin maupun dari komponen yang terkandung dalam matriks sirup.

Larutan blanko adalah larutan asam sulfat dan trietilamin dalam aquabidestilata. Larutan blanko dibuat untuk melihat kemungkinan terdapatnya gangguan dari komponen-komponen yang digunakan untuk hidrolisis inulin terhadap analisis fruktosa. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa tidak ada gangguan di sekitar waktu retensi fruktosa. Kromatogram larutan blanko dapat dilihat pada Gambar 4.7.

Larutan plasebo sirup dibuat untuk melihat kemungkinan terdapatnya gangguan dari komponen-komponen yang terkandung dalam matriks sirup. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa fruktosa yang berasal dari hasil hidrolisis sukrosa yang terkandung dalam sirup tidak mengalami pergeseran waktu retensi yang bermakna, serta tidak ada puncak lain yang mengganggu di sekitar waktu

retensi. Kromatogram hasil hidrolisis larutan plasebo sirup dapat dilihat pada Gambar 4.8.

4.5.3 Uji Presisi

Presisi atau keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Suatu metode memenuhi kriteria uji presisi jika memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) $\leq 2,0 \%$ (Snyder, Kirkland, dan Glajch, 1997).

Uji presisi pertama-tama dilakukan terhadap larutan standar inulin yang dihidrolisis. Uji ini dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk melihat bahwa metode hidrolisis yang digunakan dapat memberikan hasil yang berdekatan. Larutan standar inulin dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang kemudian dihidrolisis dalam suasana asam. Percobaan dilakukan sebanyak enam kali pengulangan. Larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Metode hidrolisis yang digunakan memenuhi kriteria presisi dengan nilai KV sebesar 1,85%.

Kedua, uji presisi dilakukan pada sediaan plasebo sirup yang ditambahkan standar inulin pada kadar 100% dari yang tertera pada label sediaan jadi. Kadar inulin yang tertera pada label sebesar 500 mg setiap 5 mL sirup. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Percobaan dilakukan sebanyak enam kali pengulangan. Hasil kromatogram menunjukkan area total fruktosa dari hidrolisis sukrosa dalam sirup plasebo dan inulin yang ditambahkan (Ft).

Sediaan plasebo sirup tanpa ditambahkan standar inulin dibuat dan dilakukan hidrolisis dalam suasana asam dengan menggunakan metode hidrolisis terpilih. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram menunjukkan area fruktosa yang berasal dari hidrolisis sukrosa yang terkandung dalam sirup plasebo (Fs).

Selisih (Ft) dan (Fs) adalah area fruktosa yang berasal dari hidrolisis inulin (Fi). Konsentrasi fruktosa yang berasal dari hidrolisis inulin (KFi) dapat diperoleh dengan memasukkan nilai (Fi) ke dalam persamaan kurva kalibrasi fruktosa ($y = 141,57x - 145727$). Konsentrasi inulin (KI) dapat diperoleh dengan

mengalikan nilai (KFi) dengan faktor konversi inulin menjadi fruktosa (1,01). Persentase perolehan kembali (%UPK) diperoleh dengan membandingkan nilai (KI) dengan konsentrasi inulin yang sebenarnya dikalikan dengan 100%.

Metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria presisi dengan nilai KV sebesar 0,96%. Cara perhitungan koefisien variasi dapat dilihat pada Lampiran 7 Rumus 4.14. Hasil statistik uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.8 dan Tabel 4.9.

4.5.4 Uji Akurasi

Kecermatan (akurasi) merupakan parameter yang menunjukkan kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Uji akurasi dinyatakan dengan uji perolehan kembali. Uji akurasi yang digunakan adalah metode *spiked placebo recovery*, yaitu dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah tertentu zat aktif ke dalam formulasi plasebo (Snyder, Kirkland, dan Glajch, 1997). Uji akurasi dilakukan pada kadar inulin sebesar 80%, 100%, dan 120% dari yang tertera pada label sediaan jadi (FDA, 1994). Kadar inulin yang tertera pada label sebesar 500 mg setiap 5 mL sirup. Sirup plasebo yang digunakan adalah sirup multivitamin yang memiliki komposisi paling mirip dengan sirup sampel.

Serbuk standar inulin yang telah ditimbang, ditambahkan sirup plasebo dan dilakukan hidrolisis dalam suasana asam pada kondisi hidrolisis terpilih. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan hidrolisis dalam setiap level konsentrasi (80%, 100%, dan 120%). Hasil kromatogram menunjukkan area total fruktosa dari hidrolisis sukrosa yang berasal dari sirup plasebo dan inulin yang ditambahkan (Ft).

Sediaan sirup plasebo tanpa ditambahkan standar inulin dibuat dan dilakukan hidrolisis dalam suasana asam dengan menggunakan metode hidrolisis terpilih. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil kromatogram menunjukkan area fruktosa yang berasal dari hidrolisis sukrosa yang terkandung dalam sirup plasebo (Fs).

Selisih (Ft) dan (Fs) adalah area fruktosa yang berasal dari hidrolisis inulin (Fi). Konsentrasi fruktosa yang berasal dari hidrolisis inulin (KFi) dapat diperoleh

dengan memasukkan nilai (F_i) ke dalam persamaan kurva kalibrasi fruktosa ($y = 141,57x - 145727$). Konsentrasi inulin (KI) dapat diperoleh dengan mengalikan nilai (KF_i) dengan faktor konversi inulin menjadi fruktosa (1,01). Persentase perolehan kembali (%UPK) diperoleh dengan membandingkan nilai (KI) dengan konsentrasi inulin yang sebenarnya dikalikan dengan 100%.

Metode yang digunakan memenuhi kriteria akurasi yaitu nilai persentase perolehan kembali antara 98% – 102% dan menunjukkan presisi yang baik dengan nilai koefisien variasi (KV) tidak lebih dari 2%. Cara perhitungan untuk akurasi dan nilai KV dapat dilihat pada Rumus 4.12, Lampiran 6 dan Rumus 4.14, Lampiran 7. Data statistik uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.10.

4.6 Pengukuran Kadar Inulin dalam Sampel Sirup

Sampel sirup yang akan diukur kadar zat aktifnya diperoleh dari sediaan sirup yang beredar di pasaran. Pada label sediaan sirup tertera bahwa kandungan inulin dalam sirup adalah 500 mg setiap 5 mL sirup sehingga kadar inulin dalam sirup tersebut adalah 10%. Kadar inulin dalam sampel sirup dinyatakan sebagai kadar yang diperoleh dibandingkan dengan kadar yang tertera pada label sediaan jadi. Untuk dapat melakukan pengukuran kadar inulin dalam sirup diperlukan tiga macam larutan untuk dianalisis.

Pertama, pembuatan larutan sampel sirup yang dihidrolisis. Dari hasil analisis larutan pertama diperoleh area fruktosa total (F_t) yaitu area fruktosa yang berasal dari hasil hidrolisis inulin dan sukrosa yang terkandung dalam sampel. Kromatogram hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.9. Konsentrasi fruktosa total (KF_t) dapat diperoleh dengan memasukkan nilai (F_t) ke dalam persamaan kurva kalibrasi fruktosa ($y = 141,57x - 145727$).

Kedua, pembuatan larutan standar sukrosa yang tidak dihidrolisis. Dari hasil analisis larutan kedua diperoleh area standar sukrosa (S_s) pada waktu retensi tertentu. Konsentrasi larutan standar sukrosa (KS_s) diketahui sebesar 12000 $\mu\text{g/mL}$. Kromatogram hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.10.

Ketiga, pembuatan larutan sampel sirup yang tidak dihidrolisis. Pada larutan ini inulin dan sukrosa yang terkandung dalam sampel sirup masih dalam bentuk utuh tanpa terhidrolisis, sehingga kromatogram akan menunjukkan puncak

sukrosa pada waktu retensi yang sama dengan waktu retensi yang ditunjukkan oleh kromatogram larutan standar sukrosa. Sedangkan puncak inulin tidak akan terlihat pada kromatogram karena inulin merupakan suatu polimer yang tidak dapat dianalisis pada kondisi analisis yang digunakan. Dari hasil analisis larutan ini diperoleh area sukrosa total (St) yang terkandung dalam sampel. Kromatogram hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.11.

Konsentrasi sukrosa dalam sampel sirup (KSt) dapat diperoleh dengan membandingkan hasil analisis larutan ketiga (St) dan hasil analisis larutan kedua (Ss) dikalikan nilai (KSs). Nilai (KSt) dibagi dengan faktor konversi sukrosa menjadi fruktosa (2,06) maka akan diperoleh konsentrasi fruktosa yang berasal dari hidrolisis sukrosa (KFs). Konsentrasi fruktosa yang berasal dari hidrolisis inulin (KFi) dapat diperoleh dari selisih antara nilai (KFi) dengan nilai (KFs). Konsentrasi inulin (KI) dapat diperoleh dengan mengalikan nilai (KFi) dengan faktor konversi inulin menjadi fruktosa (1,01).

Pengukuran kadar inulin dalam sampel dilakukan secara duplo. Untuk menghitung kadar inulin, konsentrasi inulin yang diperoleh dari hasil percobaan dibagi dengan konsentrasi inulin yang sebenarnya lalu dikali 100%. Kadar inulin terhadap kadar yang tertera pada label sediaan jadi yang diperoleh masing-masing sebesar 100,91% dan 101,35%, dengan koefisien variasi (KV) sebesar 0,31%. Hasil yang diperoleh menyatakan bahwa metode yang digunakan dalam penelitian ini dapat dinyatakan baik karena dalam prosesnya tidak ada zat yang hilang sehingga hasil pengukuran akhir dapat memberikan hasil yang dekat dengan hasil yang sebenarnya. Hasil statistik pengukuran kadar inulin dalam sampel sirup dapat dilihat pada Tabel 4.11.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum untuk analisis inulin dalam sirup multivitamin secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor indeks bias diperoleh pada penggunaan kolom *Carbohydrate analysis* (Waters) dengan fase gerak berupa campuran asetonitril-air (85:15) dan laju alir 1,0 mL/menit. Kondisi optimum hidrolisis inulin dicapai dengan menggunakan 5,0 mL asam sulfat 1N (pH ± 2) yang dipanaskan dalam *water bath* dengan suhu 100°C selama 1 jam.
2. Metode analisis inulin dalam sirup multivitamin secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan menggunakan detektor indeks bias dapat dinyatakan valid karena memenuhi kriteria linearitas, selektivitas, presisi, dan akurasi sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk dapat mengembangkan metode pemeriksaan inulin dalam sediaan yang memiliki matriks berbeda dari matriks sirup sehingga diharapkan metode analisis inulin dapat digunakan pada sediaan inulin yang lebih luas.

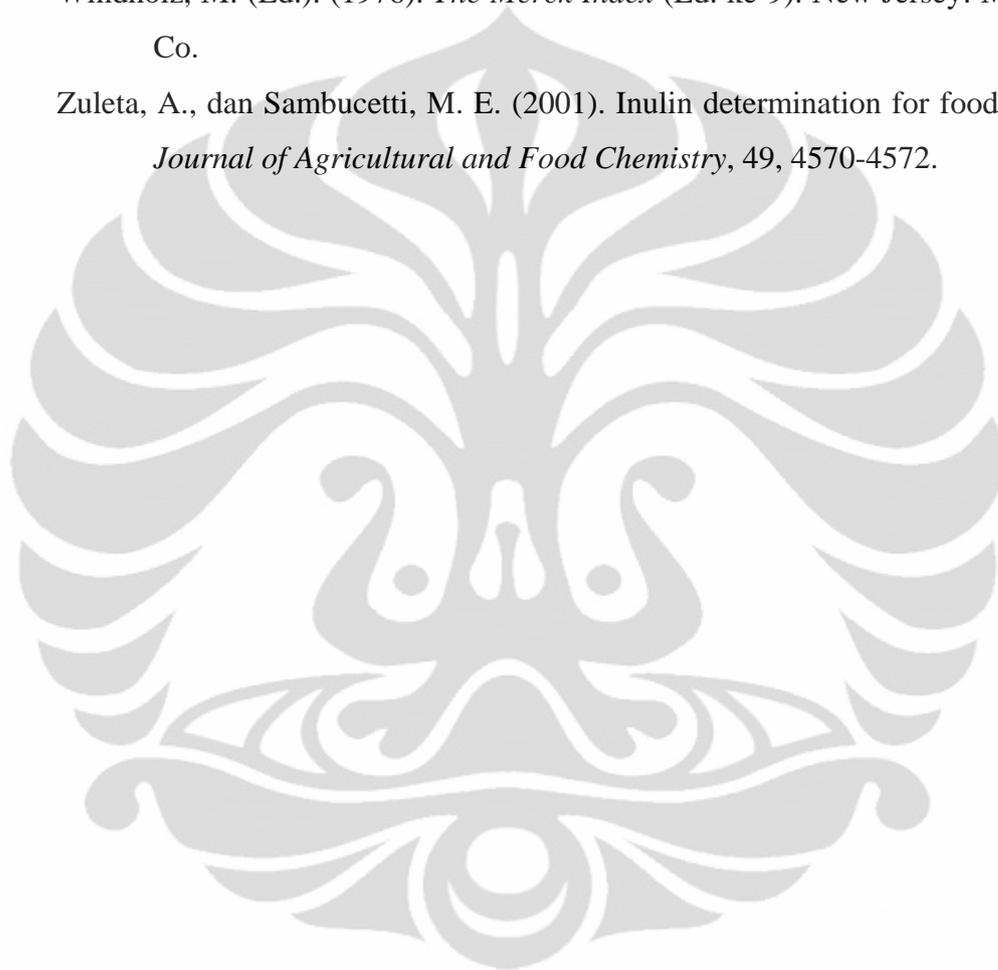
Selain itu, disarankan untuk menggunakan agen penghidrolisis lain seperti asam trifloroasetat, natrium hidroksida, dan enzim inulinase pada proses hidrolisis inulin, mengingat waktu analisis yang cukup lama yaitu 25 menit dan banyaknya fase gerak asetonitril yang digunakan karena waktu retensi asam sulfat yang cukup lama dan cukup jauh dari waktu retensi fruktosa maupun glukosa sehingga waktu analisis dapat lebih efisien dan menghemat biaya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrian, J., Legrand, G., dan Frangne, R. (1998). *Dictionary of Food and Nutrition*. UK: Elish Horwood.
- Ahuja, S., dan Dong, M. W. (Ed.). (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Vol. 6. UK: Elsevier.
- Ansel, H. C. (1989). *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi* (Farida Ibrahim, Penerjemah). Jakarta: UI-Press.
- Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P., dan Petrovsky, N. (2010). Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Excipients and Food Chemical*, 1(3), 27-50.
- De Morais, M. B., dan Jacob, C. M. A. (2006). The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de Pediatria*, 82(5), 189-197.
- Food and Drug Administration. (1994, November). *Validation of chromatographic methods. Reviewer guidance*. 5 Mei 2011. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>.
- Franck, A., dan De Leenheer, L. (2002). Inulin. Dalam A. Steinbüchel, E. J. Vandamme, M. Hofrichter, S. De Baets (Ed.). *Biopolymers: Polysaccharides II* (Vol. 6, 439-480). Weinheim: Wiley-VCH.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gropper, S. S., Smith, J. L., dan Groff, J. L. (2009). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. (Ed. ke-5). Kanada: Cengage Learning.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Harmita. (2006). *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Johnson, E. L., dan Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

- Kaur, N., dan Gupta, A. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27, 703-714.
- Linder, M. C. (1985). *Nutritional Biochemistry and Metabolism*. New York: Elsevier Science Publishing Company.
- Mindell, E. (1981). *Earl Mindell's Vitamin Bible for Your Kids*. Virginia: Donnelley & Sons.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry* (Ed. ke-26). USA: McGraw-Hill Companies.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: What are they. *Journal of Nutrition*, 129, 1402S–1406S.
- Nollet, L. M. L. (2000). *Food Analysis by HPLC*. New York: Marcel Dekker.
- Parrott, E. L. (1970). *Pharmaceutical Technology – Fundamental Pharmaceutics*. Minneapolis: Burgess.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., dan Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development* (Ed. ke-2). USA: John Wiley & Son.
- Shaw, P. E. (1988). *Handbook of Sugar Separations in Foods by HPLC*. Boca Raton: CRC.
- Szambelan K., dan Nowak J. (2006). Acidic and enzymatic hydrolysis of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers for further ethanol production. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 9(4), 38. 25 Maret 2011. <http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue4/art-38.html>
- The United State Pharmacopeial Convention. (2006). *United States of Pharmacopeia 30 – National Formulary 25*. USA: The United State Pharmacopeial Convention.
- Van Waes, C., Baert, J., Carlier, L., dan Van Bockstaele, E. (1998). A Rapid determination of the total sugar content and the average inulin chain length in root of chicory (*Cichorium intybus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 107-110.
- Vendrell-Pascuas, S., Castellote-Bargallo, A. I., dan Lopez-Sabater, M. C. (2000). Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, 881, 591-597.

- Wade, A., dan Weller, P. J. (Ed.). (1994). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Ed. ke-2). UK: The Pharmaceutical Press.
- Wang, H., Zhang, Z., Liang, L., Wen, S., Liu, C., dan Xu, X. (2010). A comparative study of high-performance liquid chromatography. *European Food Research and Technology*, 230,701–706.
- Windholz, M. (Ed.). (1976). *The Merck Index* (Ed. ke-9). New Jersey: Merck and Co.
- Zuleta, A., dan Sambucetti, M. E. (2001). Inulin determination for food labeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4570-4572.





Tabel 4.1 Data hasil pemilihan metode analisis standar fruktosa dan glukosa

Fase gerak	Asetonitril-air (83:17)		Asetonitril-air (85:15)	
	Fruktosa	Glukosa	Fruktosa	Glukosa
Plat teoritis (N)	1313,81	1259,91	1373,81	1110,98
<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> (HETP)	114,17	119,06	109,185	135,016
Faktor ikutan (Tf)	1,36	1,14	1,38	1,09
Resolusi (R)	1,84		2,14	

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Konsentrasi : Fruktosa 30000 μ g/mL
Glukosa 7500 μ g/mL

Tabel 4.2 Data hasil pemilihan metode analisis standar inulin yang dihidrolisis

Fase gerak	Asetonitril-air (83:17)		Asetonitril-air (85:15)	
	Fruktosa	Glukosa	Fruktosa	Glukosa
Plat teoritis (N)	1131,60	1062,64	1402,94	935,59
<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> (HETP)	132,56	141,16	106,92	160,33
Faktor ikutan (Tf)	1,38	1,66	1,517	1,11
Resolusi (R)	1,29		1,66	

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Konsentrasi : Inulin 2931 μ g/mL

Tabel 4.3 Data hasil optimasi kondisi hidrolisis

Volume H ₂ SO ₄ (mL)	Area (mV/s)
1	163324
2	227636
3	238288
4	225974
5	255428
6	181248
7	182764

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (83:17)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Konsentrasi : Inulin 1954 μ g/mL

Tabel 4.4 Data hasil uji kesesuaian sistem

No.	Nama sampel	Area (mV/s)	Waktu retensi (menit)
1	Fruktosa 1	559302	7,80
2	Fruktosa 2	547749	7,90
3	Fruktosa 3	550196	7,91
4	Fruktosa 4	550582	7,92
5	Fruktosa 5	544676	7,91
	Rata-rata	550501	7,89
	Simpangan baku	5455,76	0,05
	Koefisien variasi (%)	0,99	0,66

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Konsentrasi : Fruktosa 5000 μ g/mL

Tabel 4.5 Data hasil penentuan faktor konversi inulin menjadi fruktosa

No.	Konsentrasi inulin ($\mu\text{g/mL}$)	Area fruktosa (mV/s)	Konsentrasi fruktosa diperoleh ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor konversi
1	2936,57	266339	2910,69	1,01
2	3915,43	402004	3868,98	1,01
3	4894,28	533564	4798,27	1,02
4	5873,14	676861	5810,47	1,01
			Rata-rata	1,01

Keterangan:

Persamaan kurva kalibrasi fruktosa : $y = 141,57x - 145727$

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μm , 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.6 Data hasil penentuan faktor konversi sukrosa menjadi fruktosa

No.	Konsentrasi sukrosa ($\mu\text{g/mL}$)	Area fruktosa (mV/s)	Konsentrasi fruktosa diperoleh ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor konversi
1	6000	270156	2937,65	2,04
2	9000	472892	4369,70	2,06
3	12000	671160	5770,20	2,08
			Rata-rata	2,06

Keterangan:

Persamaan kurva kalibrasi fruktosa : $y = 141,57x - 145727$

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μm , 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.7 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi standar fruktosa

Konsentrasi fruktosa ($\mu\text{g/mL}$)	Area fruktosa (mV/s)
2017,4	141093
3026,1	283933
4034,8	428841
5043,5	559302
6052,2	710968
8069,6	999888

Keterangan: $a = -145727$

$b = 141,57$

$r = 0,9998$

Persamaan kurva kalibrasi = $y = 141,57x - 145727$

Batas deteksi (LOD) = $108,69 \mu\text{g/mL}$

Batas kuantitasi (LOQ) = $362,33 \mu\text{g/mL}$

Koefisien fungsi regresi (V_{x0}) = $0,77\%$

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* $10\mu\text{m}$, $300 \times 3,9 \text{ mm}$

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : $1,0 \text{ mL/menit}$

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : $20,0 \mu\text{L}$

Tabel 4.8 Data hasil uji presisi hidrolisis standar inulin menjadi fruktosa

No.	Nama	Konsentrasi inulin ($\mu\text{g/mL}$)	Area fruktosa (mV/s)	Koefisien variasi (%)
1	Presisi 1	4890,86	523662	1,85
2	Presisi 2	4890,86	532596	
3	Presisi 3	4890,86	536279	
4	Presisi 4	4890,86	549282	
5	Presisi 5	4890,86	549288	
6	Presisi 6	4890,86	539840	

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μm , 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.9 Data hasil uji presisi inulin dalam sirup plasebo

Konsentrasi Inulin	Jumlah sirup plasebo (g)	Area fruktosa total (mV/s)	Area fruktosa dari plasebo sirup (mV/s)	Area fruktosa dari hidrolisis inulin (mV/s)	Jumlah inulin yang ditambahkan		Perolehan kembali (%)	Koefisien variasi (%)
					Konsentrasi sebenarnya (µg/mL)	Konsentrasi yang diperoleh (µg/mL)		
100%	3,1623	2009389	1459685,49	549703,51	4885,00	4961,39	101,56	0,96
		2012925		553239,51	4986,62	102,08		
		2001706		542020,51	4906,58	100,44		
	3,1812	2021250	552840,46	4983,78	101,86			
		2022646	554236,46	4993,74	102,06			
		2006666	538256,46	4879,73	99,73			

Keterangan: Plasebo sirup dibandingkan sejumlah 3,1535 g memiliki area fruktosa rata-rata = 1455623,5 mV/s

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10µm, 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.10 Data hasil uji akurasi inulin dalam sirup plasebo

Konsentrasi Inulin	Jumlah sirup plasebo (g)	Area fruktosa total (mV/s)	Area fruktosa dari plasebo sirup (mV/s)	Area fruktosa dari hidrolisis inulin (mV/s)	Jumlah inulin yang ditambahkan		Perolehan kembali (%)	Koefisien variasi (%)
					Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi yang diperoleh ($\mu\text{g/mL}$)		
80%	3,1597	1865988	1458485,36	407502,64	3927,54	3946,90	100,49	1,90
		1874887		416401,64		4010,38	102,11	
		1854031		395545,64		3861,59	98,32	
100%	3,1623	2009389	1459685,49	549703,51	4885,00	4961,39	101,56	0,83
		2012925		553239,51		4986,623	102,08	
		2001706		542020,51		4906,58	100,44	
120%	3,1754	2155691	1465732,32	689958,68	5869,82	5962,02	101,57	0,32
		2159605		693872,68		5989,94	102,05	
		2160874		695141,68		5998,99	102,20	

Keterangan: Plasebo sirup perbandingan sejumlah 3,1535 g memiliki area fruktosa rata-rata = 1455623,5 mV/s

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μm , 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.11 Data hasil pengukuran kadar inulin dalam sampel sirup

Jumlah sampel sirup (g)	Area sukrosa tanpa hidrolisis (mV/s)	Konsentrasi sukrosa (µg/mL)	Konsentrasi fruktosa dari hidrolisis sukrosa (µg/mL)	Area fruktosa total (mV/s)	Konsentrasi fruktosa total (µg/mL)	Konsentrasi fruktosa dari hidrolisis inulin (µg/mL)	Konsentrasi inulin terukur (µg/mL)	Konsentrasi inulin sebenarnya (µg/mL)	Kadar inulin (%)
3,0526	1664408	9941,76	4826,10	1250286	9860,94	5034,84	5085,19	5045,60	100,91
3,0658	1683867	10057,99	4882,52	1258329	9917,75	5035,23	5085,58	5067,44	101,35
							Rata-rata (%)		101,13
							Simpangan baku (%)		0,31
							Koefisien variasi (%)		0,31

Keterangan: Standar sukrosa konsentrasi 12000 µg/mL memiliki area sukrosa rata-rata = 2008989,5 mV/s

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10µm, 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 µL



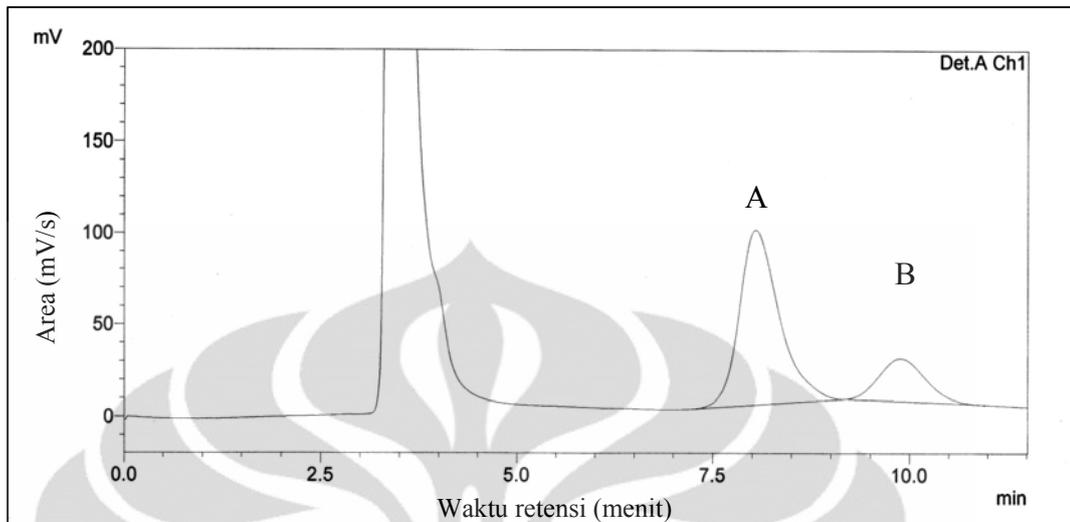
GAMBAR



Keterangan:

1. Wadah penampung fase gerak
2. Detektor indeks bias (Shimadzu RID-10A)
3. Degasser (Shimadzu DGU-20A5)
4. Pompa (Shimadzu LC-20AD)
5. Injektor
6. Oven kolom (Shimadzu CTO-6AS)
7. Komputer untuk memproses data
8. Printer

Gambar 3.1 Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)



Keterangan:

Waktu retensi fruktosa : 8,04 menit

Waktu retensi glukosa : 9,88 menit

Kondisi analisis:

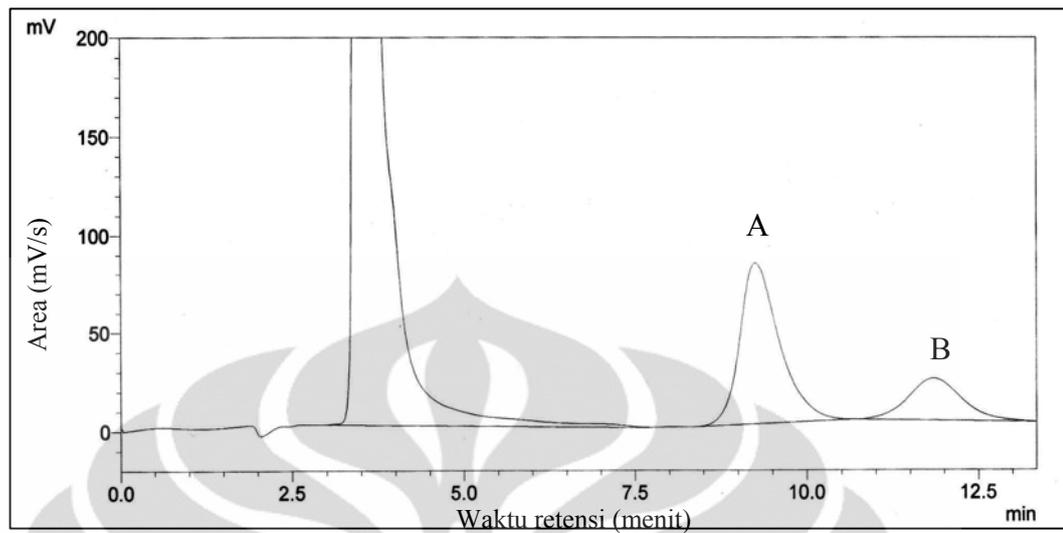
Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.1 Kromatogram larutan standar fruktosa 30000 μ g/mL (A) dan glukosa 7500 μ g/mL (B) dengan fase gerak asetonitril-air (83:17)



Keterangan:

Waktu retensi fruktosa : 9,25 menit

Waktu retensi glukosa : 11,84 menit

Kondisi analisis:

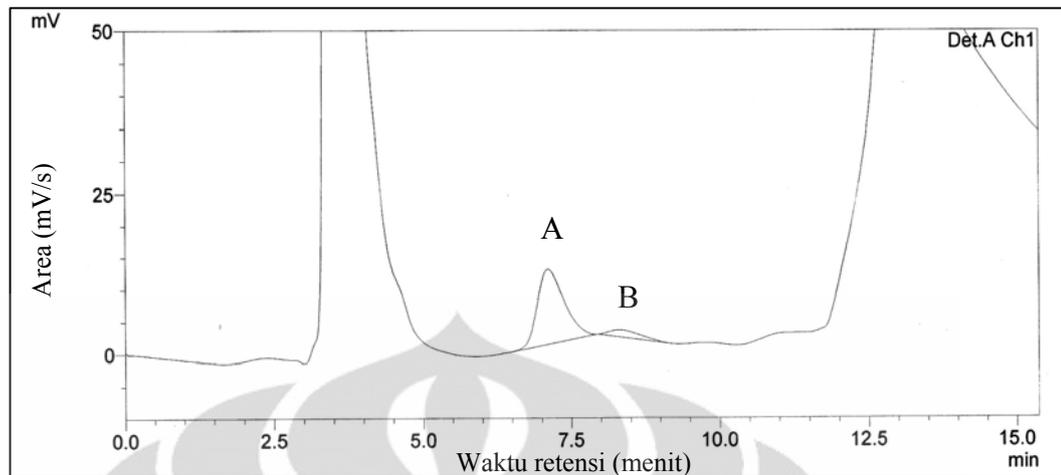
kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.2 Kromatogram larutan standar fruktosa 30000 μ g/mL (A) dan glukosa 7500 μ g/mL (B) dengan fase gerak asetonitril-air (85:15)



Keterangan:

Waktu retensi fruktosa : 7,10 menit

Waktu retensi glukosa : 8,31 menit

Kondisi analisis:

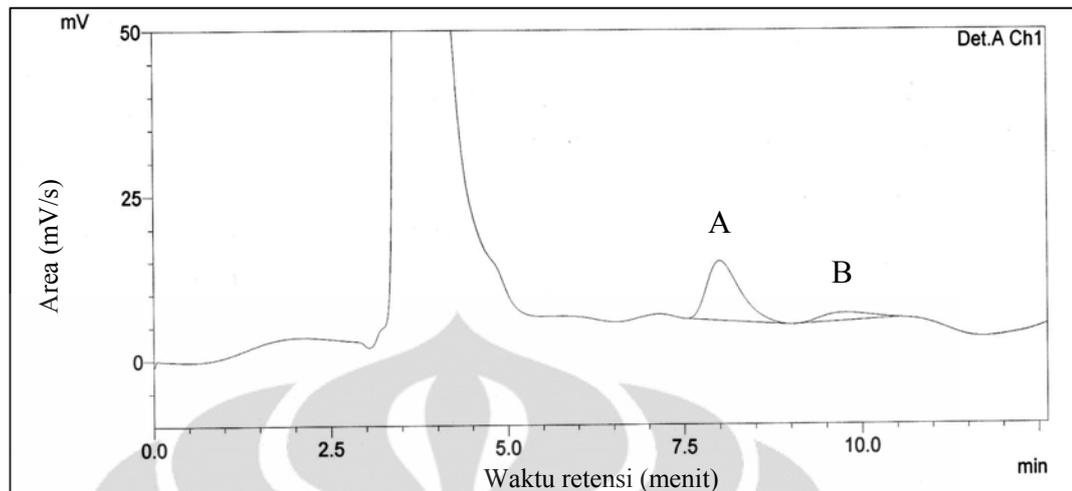
Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.3 Kromatogram hasil hidrolisis larutan standar inulin 2931 μ g/mL menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B) dengan fase gerak asetonitril-air (83:17)



Keterangan:

Waktu retensi fruktosa : 7,99 menit

Waktu retensi glukosa : 9,77 menit

Kondisi analisis:

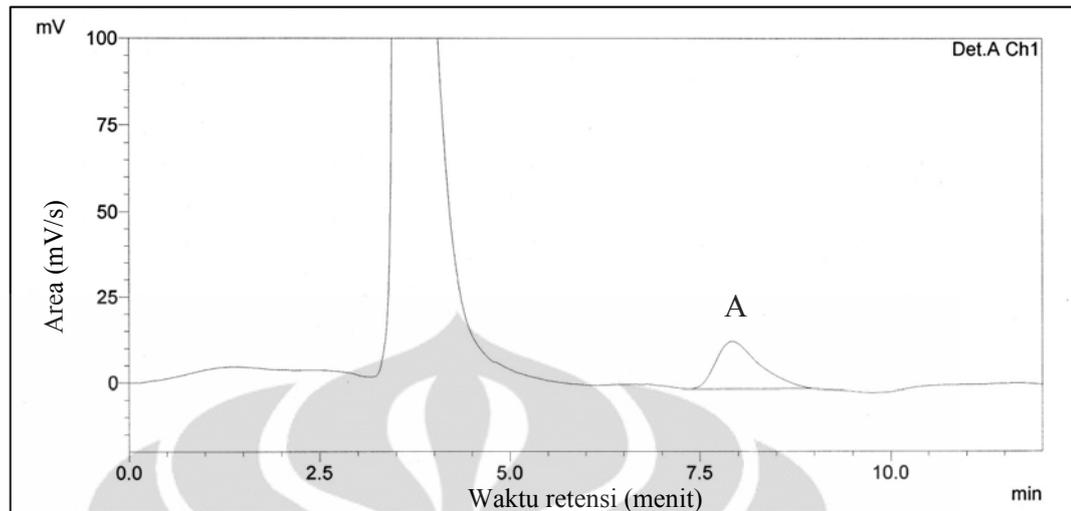
Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.4 Kromatogram hasil hidrolisis larutan standar inulin 2931 μ g/mL menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B) dengan fase gerak asetonitril-air (85:15)



Keterangan:

Waktu retensi fruktosa : 7,90 menit

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

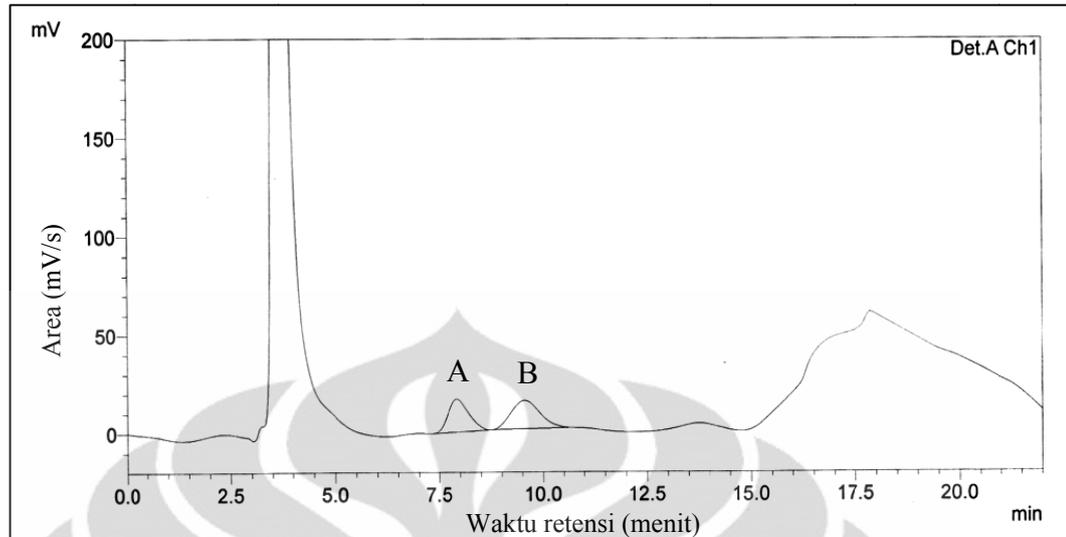
Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.5 Kromatogram larutan standar fruktosa 5000 μ g/mL (A)



Keterangan:

Waktu retensi fruktosa : 7,92 menit

Waktu retensi glukosa : 9,55 menit

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

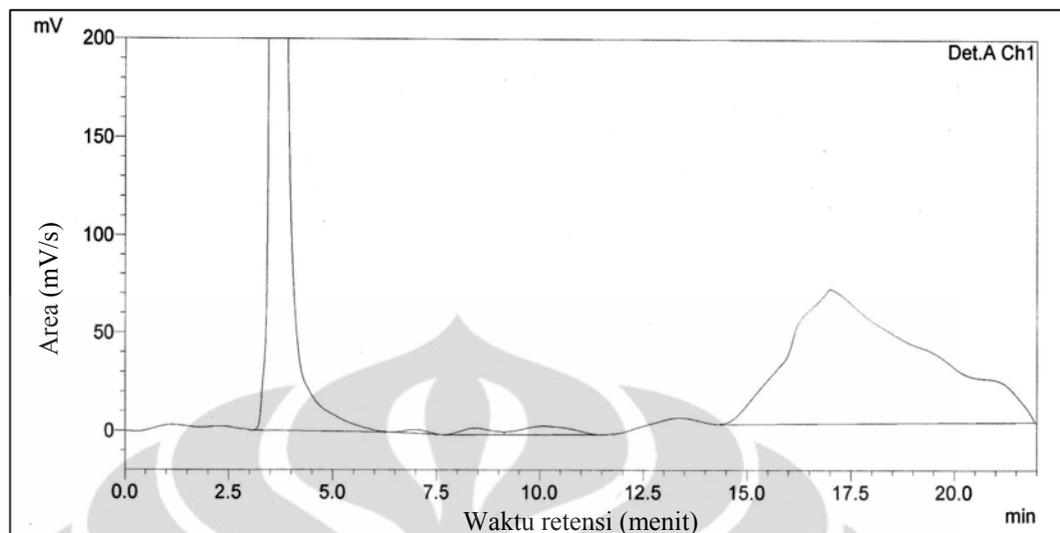
Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.6 Kromatogram hasil hidrolisis larutan standar sukrosa 9000 μ g/mL menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B)



Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

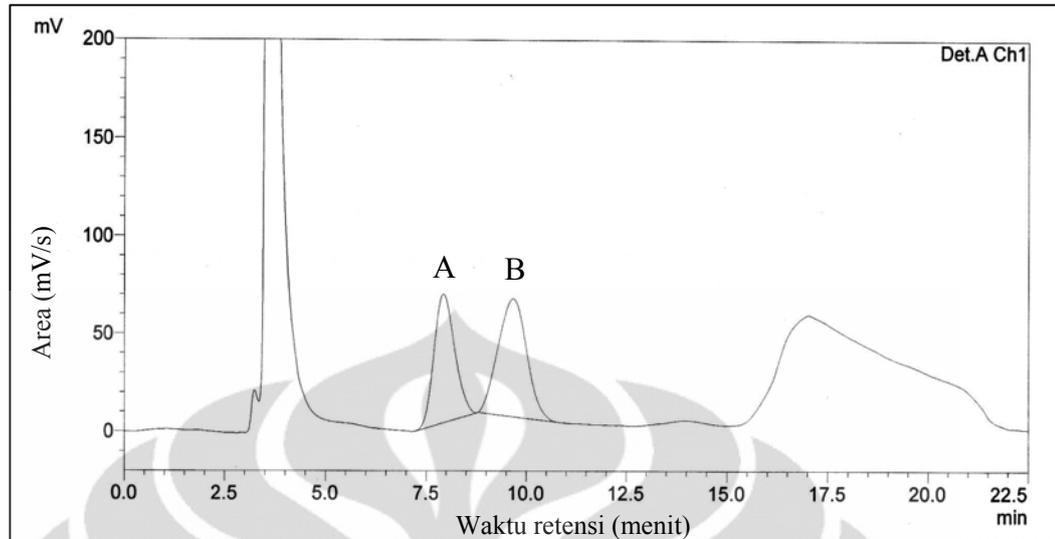
Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.7 Kromatogram larutan blanko



Keterangan:

Waktu retensi fruktosa : 7,93 menit

Waktu retensi glukosa : 9,66 menit

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

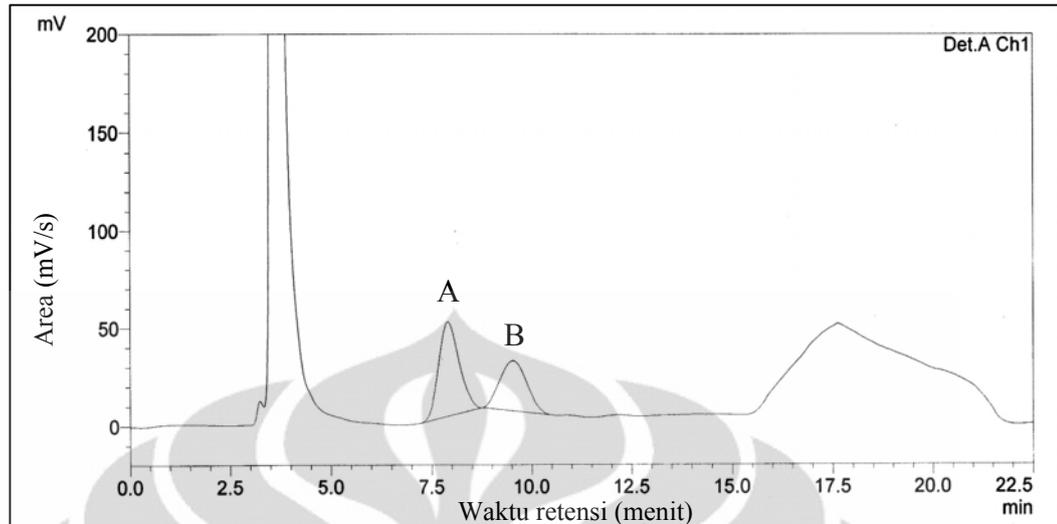
Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.8 Kromatogram hasil hidrolisis larutan placebo sirup multivitamin menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B)



Keterangan:

Waktu retensi fruktosa : 7,90 menit

Waktu retensi glukosa : 9,53 menit

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

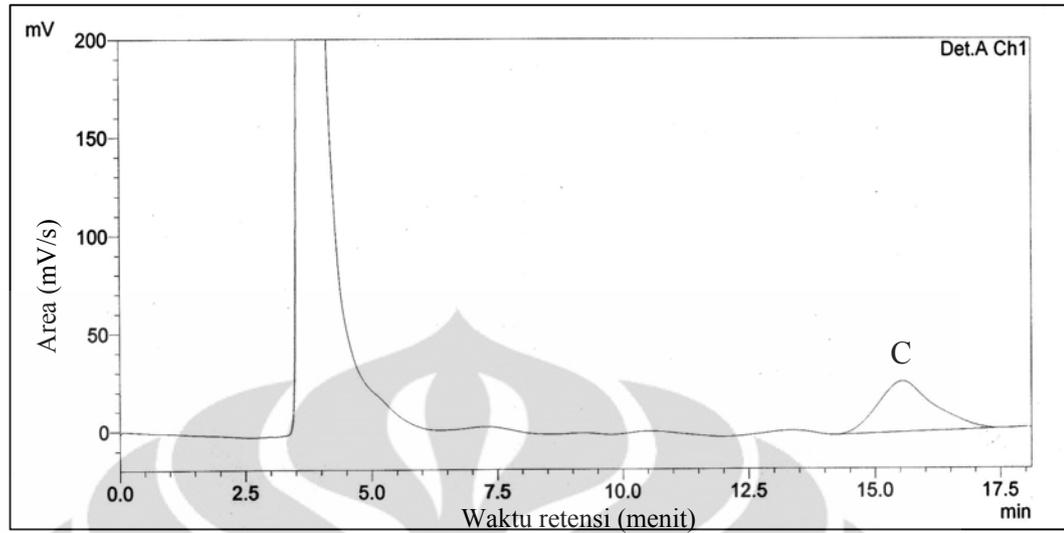
Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.9 Kromatogram hasil hidrolisis larutan sampel sirup menjadi fruktosa (A) dan glukosa (B)



Keterangan:

Waktu retensi sukrosa : 15,54 menit

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

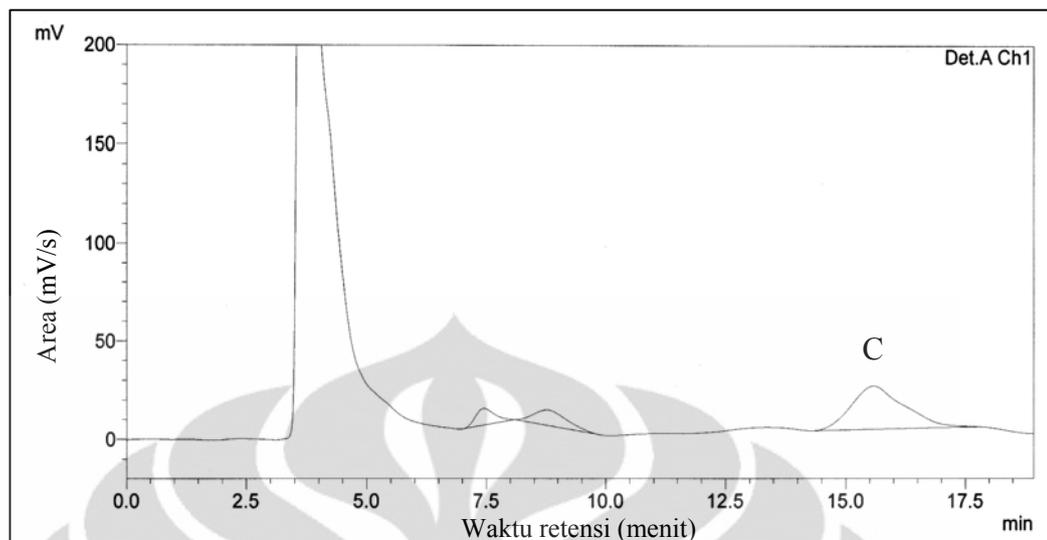
Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.10 Kromatogram larutan standar sukrosa 12000 μ g/mL © yang tidak dihidrolisis



Keterangan:

Waktu retensi sukrosa : 15,57 menit

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10 μ m, 300 x 3,9 mm

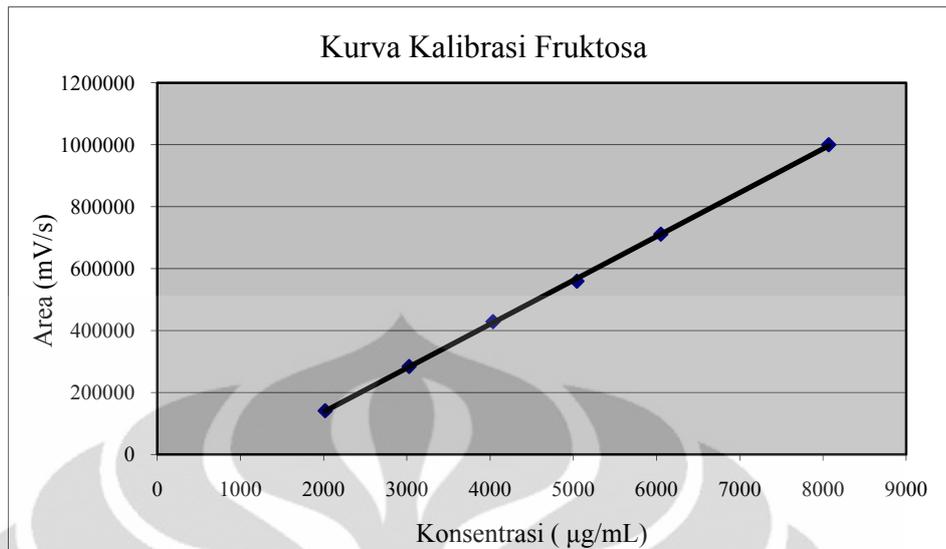
Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.11 Kromatogram larutan sampel sirup yang tidak dihidrolisis menjadi sukrosa (C)



Keterangan:

Persamaan garis kurva kalibrasi: $y = 141,57x - 145727$

Koefisien korelasi: $r = 0,9998$

Kondisi analisis:

Kolom : Waters *carbohydrate analysis* 10µm, 300 x 3,9 mm

Fase gerak : Asetonitril-air (85:15)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor : Indeks bias

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Gambar 4.12 Kurva kalibrasi fruktosa



Lampiran 1
Cara memperoleh efisiensi kolom

Jumlah plat teoritis (N):

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (4.1)$$

Height Equivalent to A Theoretical Plate (HETP):

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (4.2)$$

Faktor ikutan (Tf):

$$Tf = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4.3)$$

Dimana :

N = Jumlah pelat teoritis

HETP = *Height Equivalent to A Theoretical Plate*

Panjang lempeng teoritik

tR = Waktu retensi

W = *Width*

Lebar alas puncak

L = *Length*

Panjang kolom

W_{0,05} = Perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

f = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

Lampiran 2
Cara memperoleh resolusi

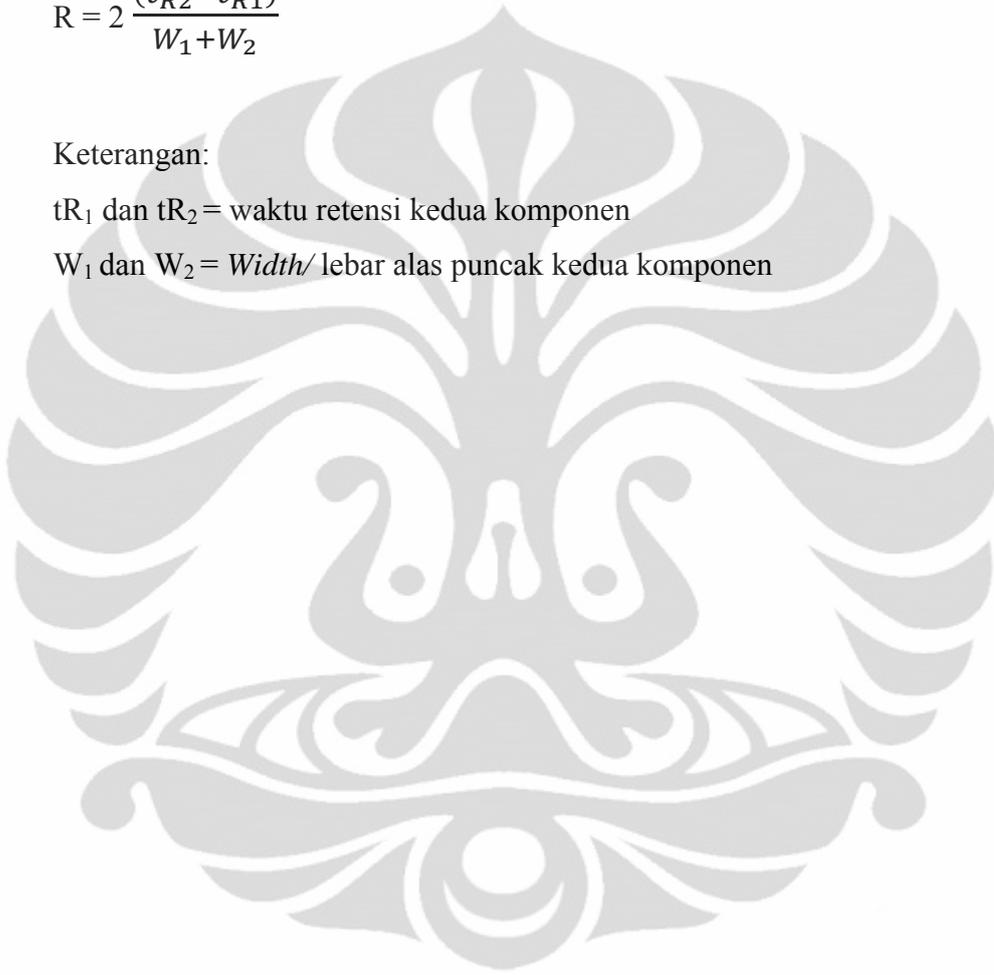
Resolusi/ daya pisah (R):

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (4.4)$$

Keterangan:

t_{R1} dan t_{R2} = waktu retensi kedua komponen

W_1 dan W_2 = *Width*/ lebar alas puncak kedua komponen



Lampiran 3
Cara memperoleh regresi linear

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum xi.yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}} \quad (4.5)$$

Lampiran 4
Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi

Koefisien fungsi regresi (V_{x_0}):

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{X}} \quad (4.6)$$

Simpangan baku residual ($S_{y/x}$):

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\Sigma(y-y_i)^2)}{n-2}} \quad (4.7)$$

Standar deviasi fungsi (S_{x_0}):

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (4.8)$$

Keterangan:

$S_{y/x}$ = simpangan baku residual

S_{x_0} = standar deviasi fungsi

b = arah garis linear dari kurva kalibrasi

Lampiran 5

Cara perhitungan limit deteksi dan limit kuantitasi

Simpangan baku residual ($S_{y/x}$):

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n-2}} \quad (4.9)$$

Limit of detection (LOD):

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{y/x}}{b} \quad (4.10)$$

Limit of quantitation (LOQ):

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (4.11)$$

Keterangan:

y = luas puncak

y_i = luas puncak berdasarkan hasil perhitungan dari persamaan regresi linier

n = jumlah data

b = kemiringan (*slope*) pada persamaan garis linier

Lampiran 6
Cara perhitungan uji akurasi

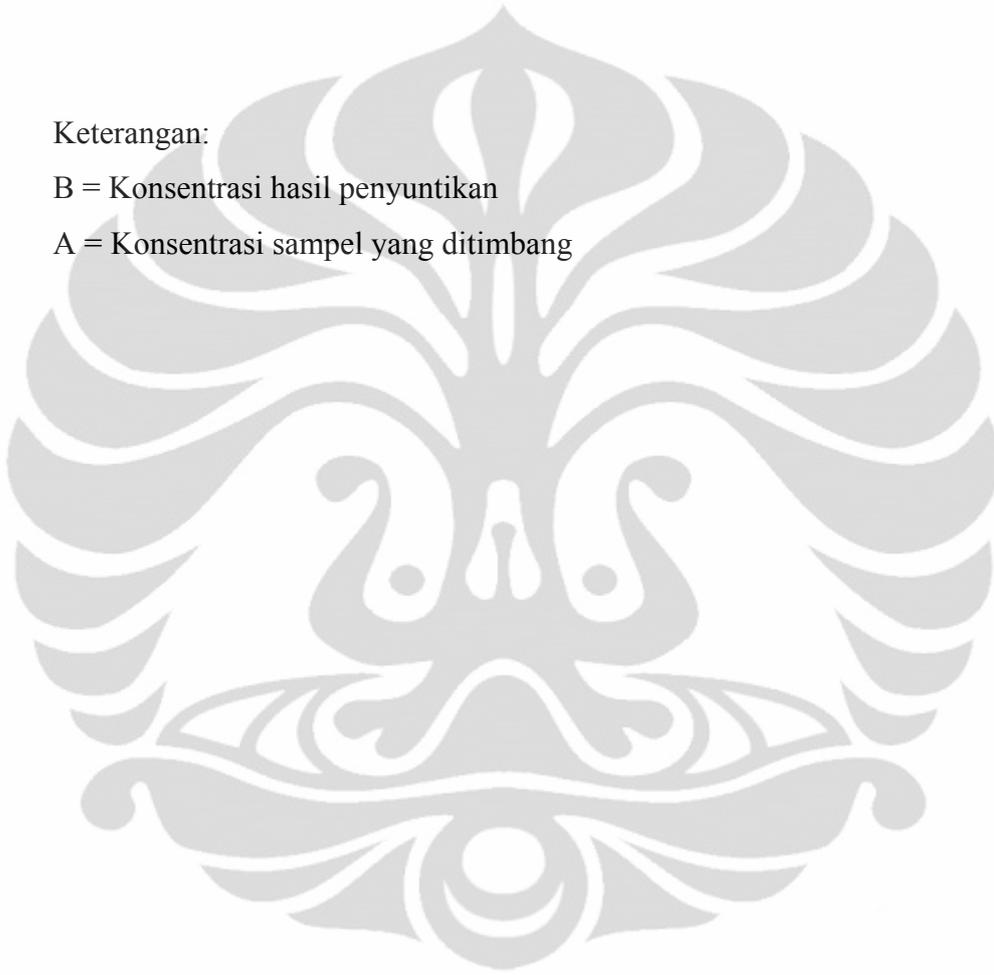
Persentase perolehan kembali:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{B}{A} \times 100\% \quad (4.12)$$

Keterangan:

B = Konsentrasi hasil penyuntikan

A = Konsentrasi sampel yang ditimbang



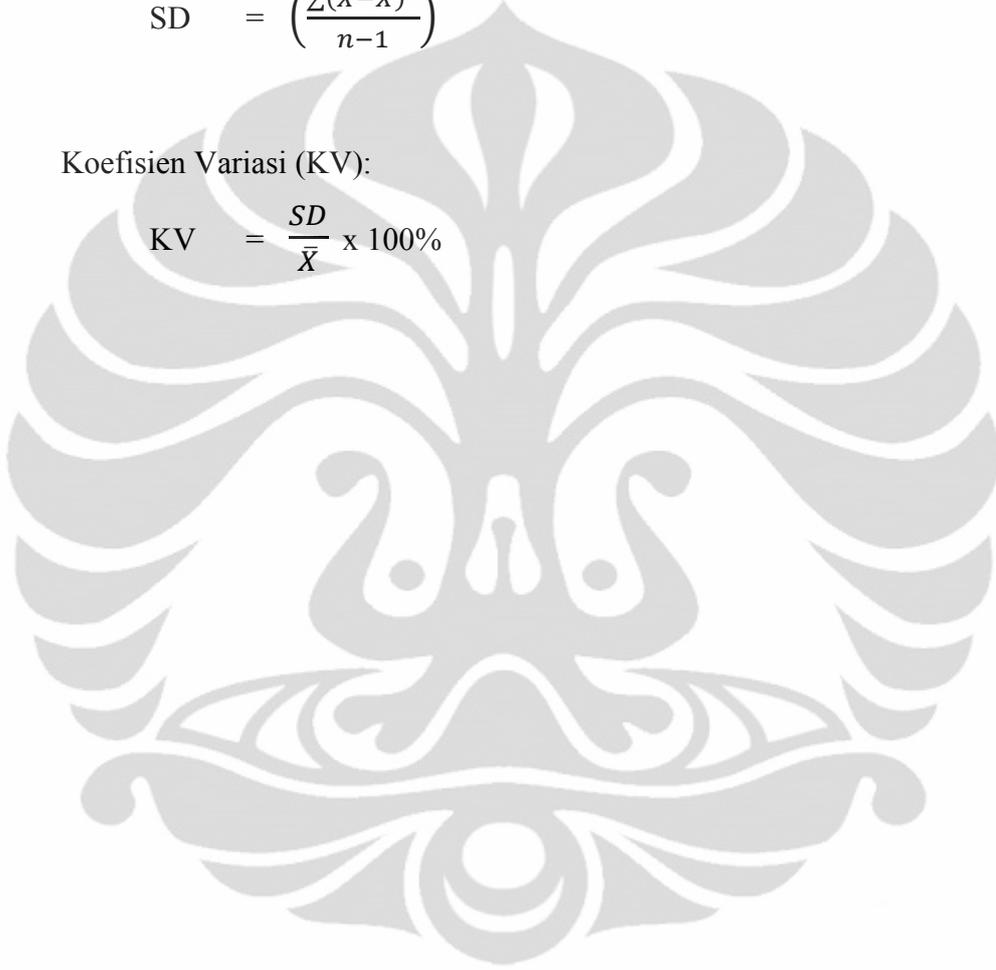
Lampiran 7
Cara perhitungan koefisien variasi

Simpangan baku (SD):

$$SD = \left(\frac{\sum(X-\bar{X})^2}{n-1} \right)^{1/2} \quad (4.13)$$

Koefisien Variasi (KV):

$$KV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \quad (4.14)$$



Lampiran 8
Sertifikat analisis inulin

		BENE-ORAFTI SA Rue L. MARECHAL 1 B-4360 OREYE - BELGIUM		Attention of : PT. FOODTECH INDONESIA, WISMA Customer : RMK 3R PT. FOODTECH INDONESIA WISMA RMK 3RD FLOOR JL. PURI KENCANA BLOK M4 NO.1 11610 KEMBANGAN SELATAN - JAKARTA																																													
CERTIFICATE OF ANALYSIS																																																	
Date of shipping		: 12.08.2010																																															
Sold to		: 121426 PT. FOODTECH, INDONESIA																																															
Ship to		: 121426 PT. FOODTECH INDONESIA																																															
Orafti order nr		: 2200220543 / 20511897																																															
Your order nr		: 2200220543 FI/10/OAT/19																																															
Product		: 42002019 ORAFTI GR BAG 25KG (1T)																																															
Batch nr		: RRNJROBJR0(pal. from: 1 to 25)																																															
Best before date		: 27.07.2013																																															
Quantity		: 21.000,00 KG		Date of production : 27.07.2010.																																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Analysis :</th> <th>Values</th> <th>Norms</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="4">Specifications:</td> </tr> <tr> <td>ORAFTI physichem parameters packaged</td> <td>Dry matter</td> <td>97.7 %</td> <td>95.5 - 98.5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>pH</td> <td>6.5</td> <td>5.0 - 7.0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Conductivity (uS/cm)</td> <td>32</td> <td>0 - 249</td> </tr> <tr> <td>ORAFTI Spectrometry packaged</td> <td>Sucrose (% DM)</td> <td>4.8 %</td> <td>0.0 - 8.0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Inulin (% DM)</td> <td>93.6 %</td> <td>90.1 - 100.0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Glucose + fructose (% DM)</td> <td>1.6 %</td> <td>0.0 - 4.0</td> </tr> <tr> <td>ORAFTI Microbiology</td> <td>Total count/(g d.m.)</td> <td>0</td> <td>0 - 1000</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Yeasts/(g d.m.)</td> <td>0</td> <td>0 - 20</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Moulds/(g d.m.)</td> <td>0</td> <td>0 - 20</td> </tr> </tbody> </table>						Analysis :		Values	Norms	Specifications:				ORAFTI physichem parameters packaged	Dry matter	97.7 %	95.5 - 98.5		pH	6.5	5.0 - 7.0		Conductivity (uS/cm)	32	0 - 249	ORAFTI Spectrometry packaged	Sucrose (% DM)	4.8 %	0.0 - 8.0		Inulin (% DM)	93.6 %	90.1 - 100.0		Glucose + fructose (% DM)	1.6 %	0.0 - 4.0	ORAFTI Microbiology	Total count/(g d.m.)	0	0 - 1000		Yeasts/(g d.m.)	0	0 - 20		Moulds/(g d.m.)	0	0 - 20
Analysis :		Values	Norms																																														
Specifications:																																																	
ORAFTI physichem parameters packaged	Dry matter	97.7 %	95.5 - 98.5																																														
	pH	6.5	5.0 - 7.0																																														
	Conductivity (uS/cm)	32	0 - 249																																														
ORAFTI Spectrometry packaged	Sucrose (% DM)	4.8 %	0.0 - 8.0																																														
	Inulin (% DM)	93.6 %	90.1 - 100.0																																														
	Glucose + fructose (% DM)	1.6 %	0.0 - 4.0																																														
ORAFTI Microbiology	Total count/(g d.m.)	0	0 - 1000																																														
	Yeasts/(g d.m.)	0	0 - 20																																														
	Moulds/(g d.m.)	0	0 - 20																																														
Customer note:																																																	
Customer note for material:																																																	
Quality Department																																																	
Page : 1 / 1																																																	

Lampiran 9
Sertifikat analisis fruktosa

		Blossom Industrial Co., Ltd --For Your Better Life!	
CRYSTALLINE FRUCTOSE CERTIFICATE OF ANALYSIS-Q/XWS 007-2009			
HS Code	: 17025000	Expiry date	: 007-2011
Physical Specifications			
Item	Limits	Results	
Appearance	White crystals, free flowing, no foreign matters	Pass	
Taste and Odor	Natural sweet, no objectionable taste or odor	Pass	
Fructose Assay, %	≥99.5	100.2	
Dextrose Content, %	≤0.5	0.3	
GMO Status	Negative	Negative	
Chemical Specifications			
Item	Limits	Results	
Acidity, ml	≤0.50	0.2	
Loss on Drying, %	≤0.5	0.1	
Residue on Ignition, %	≤0.05	0.02	
Chloride, %	≤0.018	0.015	
Sulphate, %	≤0.025	0.004	
Calcium & Magnesium (as Ca) , %	≤0.005	0.003	
Hydroxymethylfurfural (on dry basis) , %	≤0.1	0.004	
Heavy Metals (as Pb) , mg/kg	≤0.5	0.20	
Arsenic (as As) , mg/kg	≤1.0	Not exist	
Microbiological Specifications			
Item	Limits	Results	
Total Plate Count, cfu/g	≤100	<10	
1902, Unit 2, 34th building, No.135 Fuzhou North Road, 266071, Qingdao City, P.R.China			

Lampiran 10
Sertifikat analisis glukosa


ROQUETTE

LC 1 EEJ5 CERTIFICATE OF ANALYSIS / COMPLIANCE PAGE 1

PT SIGNA HUSADA
JALAN DAAN MOGOT KM 17
JAKARTA 11840
INDONESIA

6/1/2000

DEXTROSE MONOHYDRATE STANDARD	CUSTOMER.... SIGNA HUSADA/INDONES
361103 B	INVOICE..... IHV20K1 TONNAGE..... 5.000 KG CONTRACT.... E95679N ORDER..... 19571 BATCH..... E491R ✓ MANUF&TESTED 08 NOVEMBER 2009
EXPIRY DATE.	01 DEC 2014
	E.P. ----
DESCRIPTION	WHITE POWDER,ODOURLESS,SOLUBLE IN WATER,SPARINGLY SOLUBLE IN ETHANOL

APPEARANCE		CONFORM
IDENTIFICATION TEST-A		CONFORM
IDENTIFICATION TEST-B		CONFORM
IDENTIFICATION TEST-C		CONFORM
APPEARANCE IN SOLUTION		CONFORM
ACIDITY ML NAOH 0.020N/5G	ML	< 0,30
SPECIFIC OPTICAL ROTATION	DEG	+ 52,8
FOREIGN SUGARS, DEXTRINS	LIMP.	CONFORM
SULPHITE	PPM	< 15
CHLORIDE	PPM	6,0
SULPHATE	PPM	9,0

ABBOTT INDONESIA
CHECKED
for Ag 18/1/10
QUALITY CONTROL

code = 15660 Ag 18/1/10
lot NO = 85900 XR 18/1/10

Doc. Received by Q.A : *[Signature]* *18/1/10*

ROQUETTE GROUP 10124 15000PM FRANCE TEL 02 21 42 24 00 TELEX 810869 E TELECOM 02 21 42 28 50

(lanjutan)

																			
ROQUETTE																			
LC 1 EEJ5 CERTIFICATE OF ANALYSIS / COMPLIANCE	PAGE 2																		
<p>PT SIGNA HUSADA JALAN DAAN MOGOT KM 17 JAKARTA 11840 INDONESIA</p>																			
DEXTROSE MONOHYDRATE STANDARD ----- 361103 B EXPIRY DATE.	CUSTOMER.... SIGNA HUSADA/INDONES INVOICE..... IHV20K1 TONNAGE..... 5.000 KG CONTRACT.... E95679N ORDER..... 19571 BATCH..... E491R MANUF&TESTED 08 NOVEMBER 2009 01 DEC 2014																		
E.P. -----																			
DESCRIPTION	WHITE POWDER,ODOURLESS,SOLUBLE IN WATER,SPARINGLY SOLUBLE IN ETHANOL																		
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>ARSENIC</td> <td>PPM</td> <td>< 1,00</td> </tr> <tr> <td>BARIUM</td> <td></td> <td>CONFORM</td> </tr> <tr> <td>CALCIUM</td> <td>PPM</td> <td>< 200</td> </tr> <tr> <td>LEAD</td> <td>PPM</td> <td>< 0,50</td> </tr> <tr> <td>RESIDUE ON IGNITION</td> <td>%</td> <td>< 0,10</td> </tr> <tr> <td>WATER CONTENT</td> <td>%</td> <td>8,8</td> </tr> </table>	ARSENIC	PPM	< 1,00	BARIUM		CONFORM	CALCIUM	PPM	< 200	LEAD	PPM	< 0,50	RESIDUE ON IGNITION	%	< 0,10	WATER CONTENT	%	8,8	
ARSENIC	PPM	< 1,00																	
BARIUM		CONFORM																	
CALCIUM	PPM	< 200																	
LEAD	PPM	< 0,50																	
RESIDUE ON IGNITION	%	< 0,10																	
WATER CONTENT	%	8,8																	
GRAIN-SIZE : RESIDUE ON 315 MICRONS % < 0,1 RESIDUE ON 40 MICRONS/400 MESH % 99																			
THIS LOT MEETS THE REQUIREMENTS OF EP OFFICIAL MONOGRAPH FOR GLUCOSE LESTREM, FRANCE/CLEMENT LISE, 18 NOVEMBER 2009																			
Rec. Received by O.A : 	 QUALITY ASSURANCE MANAGER																		
Certificate has an electronic signature.																			
ROQUETTE FRERES. 62136 LESTREM FRANCE. TEL 03 21 63 36 00 FAX 03 21 63 38 50																			

Lampiran 11
Sertifikat analisis sukrosa

PT. Jawamanis Rafinasi Jl. Raya Anyer KM 11 Ciwandan - Cilegon Division : QC & Lab		Certificate of Analysis		No : 767/COA-R1/QAJMR09/10
				Issued Date : October 11, 2010
				Page : 1 of 1
				Rev : 0
Article Name	:	Refined Crystal Sugar		
Type	:	R1		
Batch Number	:	09OCT10-I		
Best Before Used	:	09OCT12		
Chemical name	:	Saccharosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)		
NO.	Parameter	Result	Standard	Remark
1	Pol (°S ; 20° C)	99.95	99.8 min	ICUMSA 2005 Method GS 2/3 - 1 (1994)
2	Moisture Content (%)	0.02	0.05 max	ICUMSA 2005 Method GS 2/1/3 - 15 (2005)
3	Ash Content (%)	0.003	0.015 max	ICUMSA 2005 Method GS 2/3 - 17 (2002)
4	Colour (ICUMSA Unit)	31	35 max	ICUMSA 2005 Method GS 2/3 - 9 (2005)
5	Invert Sugar (%)	0.004	0.04 max	ICUMSA 2005 Method GS 2/3 - 5 (1994)
6	Ca (ppm)	16		Method FFI - 1632
7	Particle Size Distribution of Grain size :			ICUMSA 2005 Method GS 2-37 (1994)
	not pass through 0,850 mm	7.90		
	not pass through 0,710 mm	13.10		
	not pass through 0,600 mm	15.95		
	not pass through 0,500 mm	18.40		
	not pass through 0,425 mm	15.15		
	not pass through 0,300 mm	10.85		
	not pass through 0,250 mm	11.60		
	pass through (Base Pan)	7.15		
	Mean Aperture (MA) (mm)	0.54		
	Coefficient of Variant (CV) (%)	34.23		
8	Appearance	White Crystal With No Foreign Materials	White Crystal With No Foreign Materials	SM-PR-420
9	Taste	Typically Sweet With No Foreign Tastes	Typically Sweet With No Foreign Tastes	SM-PR-420
10	Odour	No Foreign Odours	No Foreign Odours	SM-PR-420
11	Odour after acidification	No Foreign Odours	No Foreign Odours	SM-PR-310
12	Total Mesophilic Bacterial (CFU / 10 g) ^a	Nil	200 max	ICUMSA
13	Yeast (CFU / 10 g) ^a	Nil	10 max	ICUMSA
14	Mold (CFU / 10 g) ^a	Nil	10 max	ICUMSA
15	Lead (ppm) ^a	Below 0.1	2.0 max	AAS
16	Cooper (ppm) ^a	Below 0.03	2.0 max	AAS
17	Arsenic (ppm) ^a	Below 0.002	1.0 max	AAS

* Angka I; II; III pada batch number menunjukkan jam produksi sebagai berikut : I = jam 06.00 s.d 14.00 ; II = jam 14.00 s.d 22.00 ; III = jam 22.00 s.d 06.00

^a Quarterly Analysis of Independent Laboratory

Prepared by :

Kokom Komalawati
Analyst Superintendent

Approved by :

Herman Faturohman
QA Manager

P.T. WAKIS SAKAT

DAFTAR SINGKATAN

Fi	: Area fruktosa yang berasal dari hidrolisis inulin.
Fs	: Area fruktosa yang berasal dari hidrolisis sukrosa yang terkandung dalam sirup plasebo.
Ft	: Area total fruktosa dari hidrolisis sukrosa dalam sirup plasebo dan inulin yang ditambahkan.
HETP	: <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> Ukuran efisiensi kolom; panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom.
KCKT	: Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.
KFi	: Konsentrasi fruktosa yang berasal dari hidrolisis inulin.
KFs	: Konsentrasi fruktosa yang berasal dari hidrolisis sukrosa.
KFt	: Konsentrasi fruktosa total.
KI	: Konsentrasi inulin.
KSs	: Konsentrasi larutan standar sukrosa.
KSt	: Konsentrasi sukrosa dalam sampel sirup.
KV	: Koefisien variasi; simpangan baku relatif.
LOD	: <i>Limit of Detection</i> Batas deteksi; jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko.
LOQ	: <i>Limit of Quantitation</i> Batas kuantitasi; kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.
N	: Jumlah plat teoritis.
R	: Resolusi; daya pisah kolom.
r	: Koefisien korelasi, linearitas dari garis regresi.
RID	: <i>Refractive Index Detector</i> .
SD	: Simpangan baku.
Ss	: Area standar sukrosa.
St	: Area sukrosa total.
Tf	: <i>Tailing factor</i> Faktor ikutan; perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak dibagi dua kali jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak-jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.
%UPK	: Persentase uji perolehan kembali.