

## PENENTUAN KADAR RBB PADA SENYAWA INULIN-RBB SECARA HPLC

Minda Azhar, Budhi Oktavia, Yustini Ma'aruf, Khairani dan Devita Efri

Staf Pengajar Jurusan Kimia FMIPA UNP, email: minda@fmipa.unp.ac.id

### ABSTRACT

*Inulin-RBB is a compound that used for screening of inulinase bacteria. Formation of inulin-RBB compounds in the mass variation of inulin and the reaction temperature and the determination of the inulin-RBB RBB in HPLC has been carried out. Determination of RBB concentration in inulin-RBB on the HPLC using an ODS C18 column,  $\lambda$  592 nm, mobile phase ethanol-water (60%: 40%) and flow rate 1 mL/min. RBB concentration of inulin-RBB in the mass variation of inulin (2g, 4g and 6g) which was reacted with 0.5 g of RBB is 14.5684 ppm respectively, ppm 13.9118, and 34.0430 ppm respectively. RBB concentration of inulin-RBB RBB in the reaction with 0.5 g of inulin 4g RBB at the reaction temperature variations (40, 50 and 60 ° C) is 29.3627 ppm respectively, 13.9118 ppm, 8.3167 ppm respectively.*

**Keywords:** RBB, inulin-RBB, inulin, HPLC

### PENDAHULUAN

Inulin merupakan senyawa yang paling melimpah di alam setelah pati (Franck, 2003). Inulin merupakan senyawa yang potensial untuk dikembangkan. Potensi utama inulin adalah dapat dijadikan *high fructose syrup* (HFS) dan *fructooligo saccharides* (FOS) (Ricca *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2006). HFS dan FOS merupakan senyawa yang penting pada industri makanan, minuman, dan farmasi (Tohamy, 2006).

Inulin terdapat pada umbi tanaman dahlia, akar chicory, dan umbi Jerusalem artichoke dalam jumlah besar (Franck, 2003). Inulin juga terdapat pada pisang, bawang perai, bawang merah, bawang putih dan gandum dalam jumlah sedikit. Tumbuhan Indonesia sebagai sumber inulin selain tanaman dahlia adalah *Amaryllidaceae*, *Asteraceae*, *Iridaceae*, dan *Poaceae*. (Simanjuntak dkk, 2004).

Kadar inulin dapat ditentukan dengan beberapa cara, diantaranya secara spektrofotometri. Pada cara ini, inulin dilarutkan dalam air panas dan dihidrolisis

dengan asam pada temperatur 80°C. Fruktosa sebagai hasil hidrolisis inulin direaksikan dengan  $\text{Cu}^{2+}$  membentuk senyawa berwarna. Kekurangan cara ini adalah terbentuk difruktosa anhidrat suatu senyawa yang berwarna. Senyawa ini dapat mengganggu dalam analisis dengan spektrofotometer sehingga dapat menurunkan keakuratan pengukuran.

Penentuan kadar inulin menggunakan kromatografi merupakan salah satu cara yang cepat dan akurat. Tsuen Ih Ruo, dkk (1991), menentukan kandungan inulin dalam buah-buahan menggunakan HPLC dengan detektor pulsa amperometer, R. Dall' Amico, dkk (1995), menentukan kadar inulin dalam plasma dan urin menggunakan *reversed phase* HPLC menggunakan HCl dan asetronitril sebagai fasa gerak dan kolom C18 sebagai fasa diam. R. Marsilio, dkk (2000) juga telah melaporkan penentuan inulin dalam buah-buahan dengan HPLC menggunakan detektor *light-scattering*. Angela Zuleta, dkk (2001) menentukan kadar inulin menggunakan *anion exchange* HPLC dengan air sebagai fasa geraknya dan refraktif index sebagai

detektor. Semua penelitian di atas telah dapat menentukan kadar inulin dengan baik, namun penentuan kadar *Remazol Brilliant Blue* (RBB) pada senyawa inulin-RBB secara HPLC melalui pembentukan senyawa inulin-RBB belum pernah dilaporkan sebelumnya.

RBB merupakan zat berwarna biru dengan massa molekul relatif ( $M_r$ ) 626,54, rumus molekul  $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$ . Zat ini dapat direaksikan dengan polimer karbohidrat seperti xylan, inulin membentuk senyawa yang berwarna biru. Reaksi antara inulin dan RBB adalah pembentukan senyawa kompleks. Kompleks inulin-RBB terjadi melalui interaksi antara gugus atom O pada posisi kedua dari monomer fruktosa dalam inulin dengan atom C pada RBB.

Senyawa inulin-RBB merupakan senyawa kompleks berwarna biru yang praktis digunakan untuk skrining bakteri inulinase. Hidrolisis senyawa inulin-RBB dapat digunakan sebagai indikasi adanya aktivitas inulinase yang diekspresikan bakteri tersebut. Indikasi ditandai adanya warna biru yang semakin berkurang di sekitar koloni bakteri inulinase. Dengan adanya aktivitas inulinase menyebabkan senyawa inulin-RBB terhidrolisis menjadi monomernya atau polimer yang semakin pendek. Pada penelitian ini, ditentukan kadar RBB pada inulin-RBB secara HPLC melalui pembentukan senyawa inulin-RBB pada variasi massa inulin dan suhu reaksi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang dilakukan di Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia FMIPA UNP selama 6 (enam) bulan.

### 1. Objek Penelitian

Objek penelitian adalah inulin yang direaksikan dengan RBB membentuk senyawa kompleks inulin-RBB.

### 2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah HPLC, peralatan gelas, oven, pH meter, kertas saring, neraca analitik, botol reagen,

labu ukur, Erlenmeyer, botol semprot, batang pengaduk, pipet tetes, kaca arloji. Bahan yang digunakan adalah umbi dahlia, etanol, karbon aktif, aquades, inulin komersial yang diekstrak dari *chicory*, RBB,  $Na_2SO_4$ ,  $Na_3PO_4$ .

### 3. Prosedur Penelitian

Langkah-langkah utama penelitian adalah sebagai berikut: a. Ekstraksi inulin dari umbi dahlia, b. Reaksi pembentukan inulin-RBB, dan c. Penentuan kadar RBB pada inulin-RBB secara HPLC.

#### a. Ekstraksi inulin dari umbi dahlia

Ekstraksi inulin dari umbi dahlia dilakukan sesuai prosedur Andyani (2001) sebagai berikut: Umbi dahlia yang sudah bersih, dipotong dan diblender dengan air 1:2 (b:v). Kemudian campuran ini dipanaskan pada penangas air ( $80-90^{\circ}C$ , sekitar 30 menit). Selagi hangat, disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya ditambahkan etanol 30% pada filtrat sebanyak 40% dari volume filtrat. Larutan ini disimpan di dalam *freezer* selama 18 jam.

Larutan dibiarkan pada suhu ruang selama 2 jam lalu disentrifugasi (1500 rpm, 15 menit). Endapan (inulin basah I) ditambahkan air (1:2) kemudian dipanaskan di penangas air ( $70^{\circ}C$ , 30 menit). Ke dalam larutan ini ditambahkan karbon aktif 1-2% (b/v). Larutan disaring, filtrat diukur volumenya dan didinginkan pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan etanol 30% sebanyak 40% dari volume larutan. Lalu didinginkan di dalam *freezer* selama 18 jam. Setelah pendinginan tahap II ini, larutan dikeluarkan dari *freezer* dan dicairkan pada suhu ruang, kemudian disentrifugasi (1500 rpm, 15 menit) sampai diperoleh endapan putih (inulin basah II). Endapan dikeringkan ( $50-60^{\circ}C$ , 6-7 jam) dan dihaluskan.

#### b. Pembentukan inulin-RBB

Pembentukan senyawa inulin-RBB sesuai prosedur Rinderknecht *et al.*, (1976) yang dimodifikasi Castro *et al.*, (1995). Inulin sebanyak 40g dan 5g RBB masing-masing dilarutkan pada 500 mL aquades, kemudian dicampur homogen. Campuran

dipanaskan pada suhu 50°C selama 1 jam, kemudian ditambahkan 100g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sambil diaduk dan 100g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Campuran selanjutnya dipanaskan 1 jam lagi. Campuran didinginkan dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 25 menit pada suhu 5°C, supernatan dibuang. Endapan diresuspensikan dalam 100 mL aquades dan ditambah 3 volume etanol pada dingin, kemudian suspensi disentrifugasi kembali. Perlakuan ini diulang 5 kali sampai diperoleh supernatan yang tidak berwarna. Endapan diresuspensikan dalam etanol, dikeringkan pada suhu ruang.

c. Penentuan konsentrasi RBB pada inulin-RBB secara HPLC

Penentuan konsentrasi RBB pada inulin-RBB dilakukan pada kondisi optimum HPLC. Kondisi optimum yang ditentukan adalah  $\lambda$  maksimum inulin, RBB dan inulin-RBB menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kondisi optimum selanjutnya adalah komposisi eluen etanol-air yang menghasilkan puncak tajam untuk RBB dan inulin-RBB. Kondisi ini digunakan untuk menentukan kadar RBB pada inulin-RBB secara HPLC menggunakan kolom C18 dengan kecepatan alir fase gerak 1 mL/menit.

**4. Teknik Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah data kualitatif dan data kuantitatif pada kromatogram. Data kualitatif dengan melihat waktu retensi setiap puncak pada kromatogram HPLC. Data kuantitatif dengan melihat luas puncak pada kromatogram HPLC. Sebagai standar digunakan larutan RBB pada berbagai konsentrasi. Pengukuran kadar RBB pada inulin-RBB dilakukan pada kondisi optimum pengukuran dengan HPLC

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**1. Ekstraksi Inulin Dari Umbi Dahlia**

Inulin adalah senyawa kelompok polisakarida dengan monomer fruktosa. Ekstraksi inulin dari umbi dahlia pada penelitian ini dilakukan sesuai prosedur

Andyani (2001). Ekstraksi inulin dari umbi dahlia prosedur Andyani tersebut berdasarkan prinsip kelarutan inulin dalam pelarut air dan etanol. Kelarutan inulin dalam air lebih besar dibandingkan dalam etanol. Kelarutan inulin dalam kedua pelarut ini makin tinggi jika suhu dinaikkan.

Pada metoda ini umbi dahlia yang telah dipotong ditambah aquades, kemudian diblender membentuk jus umbi dahlia. Jus umbi dahlia dipanaskan pada suhu 70-80°C selama 30 menit untuk mempertinggi kelarutan inulin dalam air. Selagi panas jus umbi dahlia disaring. Filtrat yang diperoleh didinginkan sampai suhu ruang, kemudian ditambahkan etanol untuk mengendapkan inulin yang terlarut dalam air. Agar inulin lebih banyak mengendap campuran tersebut didiamkan dalam freezer semalam. Endapan inulin dipisahkan dari supernatan dengan cara sentrifugasi. Pada penelitian ini diperoleh inulin 93,6 g dari 2320 g umbi dahlia yang telah dikupas. Inulin yang diperoleh berbentuk serbuk berwarna putih.

**2. Pembuatan inulin-RBB**

Pembuatan inulin-RBB dilakukan pada variasi massa inulin dan variasi suhu reaksi. Massa inulin-RBB yang terbentuk dimuat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Massa inulin-RBB yang terbentuk pada variasi massa inulin

No	Massa inulin (g)	Massa RBB (g)	Suhu reaksi (°C)	Massa inulin-RBB (g)
1	2	0,5	50	1,6293
2	4	0,5	50	8,3165
3	6	0,5	50	5,6596

Tabel 2. Massa inulin-RBB yang terbentuk pada variasi suhu

No	Massa inulin (g)	Massa RBB (g)	Suhu reaksi (°C)	Massa inulin-RBB (g)
1	4	0,5	40	3,2119
2	4	0,5	50	8,3165
3	4	0,5	60	5,6490

Senyawa inulin-RBB paling banyak terbentuk pada massa inulin 4 gram dengan suhu reaksi 50°C. Pada pembuatan senyawa inulin-RBB ditambahkan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Kedua senyawa ini diperkirakan berfungsi agar RBB mempunyai kecenderungan untuk membentuk ion dengan melepaskan Na<sup>+</sup> dalam larutan berair. Keadaan ini akan mempercepat reaksi antara inulin dengan RBB. Senyawa inulin-RBB yang terbentuk dibilas dengan 1 volume aquades dan 3 volume etanol pa, kemudian disentrifugasi. Cara ini diulang berkali-kali sampai warna biru supernatan hilang. Tujuan pembilasan inulin-RBB adalah agar inulin-RBB bebas dari RBB.

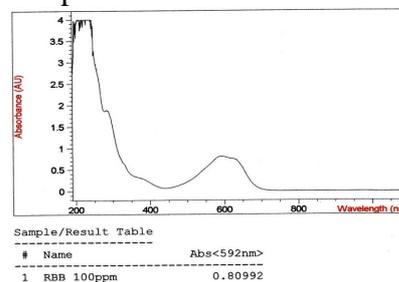
Pembilasan inulin-RBB yang terbentuk dengan 1 bagian volume aquades dan 3 volume etanol dingin tidak melarutkan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dengan sempurna. Pada proses pembentukan inulin-RBB diperkirakan masih terdapat Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Pengujian adanya Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes larutan BaCl<sub>2</sub> pada larutan inulin-RBB yang ditandai terbentuknya endapan putih BaSO<sub>4</sub>. Pengujian adanya Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes larutan AgNO<sub>3</sub> pada larutan inulin-RBB yang ditandai terbentuknya endapan Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Konstanta kelarutan (K<sub>sp</sub>) BaSO<sub>4</sub> adalah 1,5x10<sup>-9</sup>, sedangkan konstanta kelarutan Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> adalah 2,8 x 10<sup>-18</sup> (Brady, JE, 1990).

### 3. Penentuan kondisi optimum pengukuran RBB pada inulin-RBB dengan HPLC

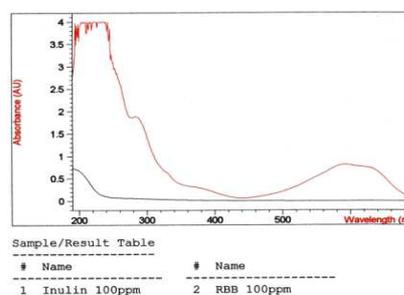
#### a. Penentuan λ maksimum

Panjang gelombang (λ) maksimum ditentukan terhadap inulin, RBB dan inulin-RBB menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum RBB adalah 592 nm (Gambar 2 dan 4). Pengukuran dilakukan pada konsentrasi RBB 100 ppm. Pada λ 300 sampai dengan 800 nm, inulin tidak memberikan penyerapan. (Gambar 3). Pada λ ini RBB juga memberikan serapan,

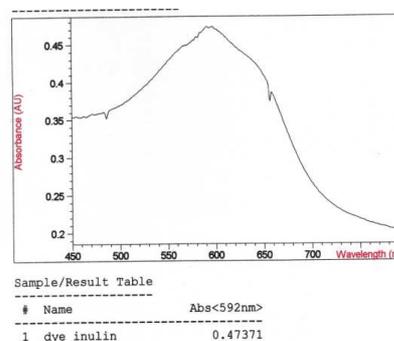
sedangkan λ maksimum inulin-RBB adalah 592 nm. Pada λ ini inulin tidak memberikan serapan. Oleh sebab itu, pengukuran konsentrasi RBB pada inulin-RBB dilakukan pada λ 592 nm.



Gambar 2. Kurva absorbansi RBB pada variasi λ



Gambar 3. Kurva absorbansi RBB (merah) dan inulin (biru) pada variasi λ



Gambar 4. Kurva absorbansi inulin-RBB pada variasi λ

#### b. Penentuan eluen yang cocok

RBB memberikan λ maksimum pada 592 nm. Pengukuran menggunakan HPLC dilakukan pada λ 592 nm. Penentuan eluen yang cocok untuk RBB dilakukan dengan memvariasikan komposisi etanol dan air. Kromatogram RBB menggunakan air sebagai fasa gerak dengan kecepatan alir 1 mL/menit tidak terlihat adanya puncak

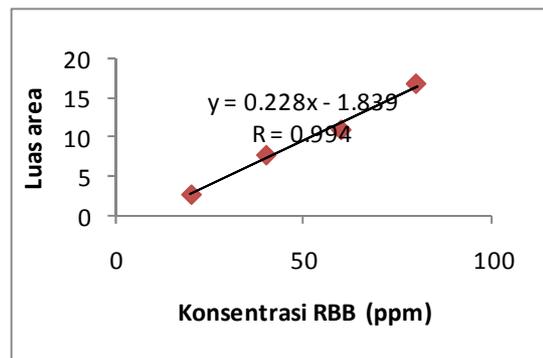
RBB (data tidak diperlihatkan). Hal ini disebabkan air bersifat polar, sedangkan RBB bersifat semipolar sehingga RBB tidak dapat dielusi oleh air meninggalkan kolom ODS C18.

Kromatogram RBB menggunakan etanol sebagai fasa gerak dilihat puncak dari RBB pada menit ke 5 (data tidak diperlihatkan). Hal ini menunjukkan bahwa RBB dapat dielusi oleh etanol keluar dari kolom karena etanol juga bersifat semipolar. Namun demikian waktu retensi yang diberikan sangat singkat dan puncak yang diperoleh tidak cukup tajam. Oleh sebab itu diperlukan variasi konsentrasi eluen antara air dan etanol untuk memperoleh kromatogram RBB yang menghasilkan puncak tajam. Eluen yang baik untuk RBB adalah etanol-air dengan perbandingan 70% dan 30%. Eluen yang menghasilkan puncak tajam inulin-RBB adalah etanol-air dengan perbandingan 60% dan 40%.

c. Penentuan kadar RBB pada inulin-RBB dengan HPLC

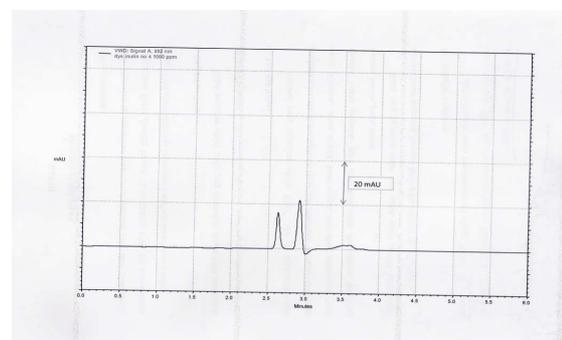
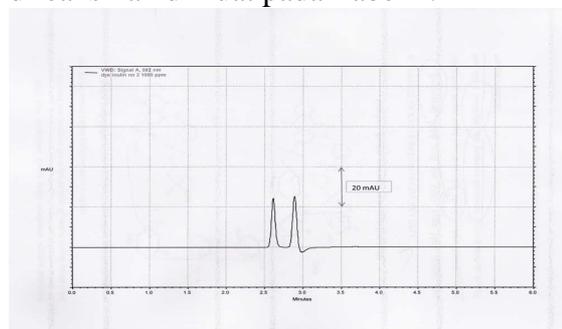
Analisis inulin-RBB dengan HPLC menggunakan kolom ODS C18 dengan fasa gerak etanol-air (60%:40%). Pada analisis ini digunakan aquades sebagai blanko. Laju alir yang digunakan adalah 1 mL/menit. Kadar RBB pada inulin-RBB diukur pada  $\lambda$  592 nm. Aquades (blanko) muncul pada waktu retensi 2,89 menit.

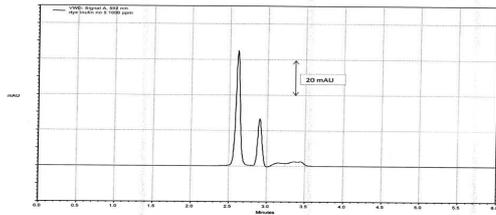
Larutan standar yang digunakan untuk pengukuran RBB pada inulin-RBB secara HPLC adalah larutan standar RBB dengan konsentrasi 20, 40, 60 dan 80 ppm. Larutan standar masing-masing konsentrasi diinjeksikan ke sistem HPLC sehingga diperoleh kromatogram dengan luas area untuk masing-masing konsentrasi larutan standar. Data luas area untuk masing-masing konsentrasi RBB disajikan dalam bentuk kurva (Gambar 5). Larutan standar RBB disuntikkan pada sistem HPLC menggunakan eluen air etanol dengan perbandingan 30%:70%.



Gambar 5. Kurva standar larutan RBB

Kurva larutan standar RBB digunakan untuk menentukan kadar RBB pada inulin-RBB. Larutan inulin-RBB 1000 ppm digunakan untuk analisis HPLC menggunakan eluen etanol air 60%, 40%. Puncak inulin-RBB muncul pada waktu retensi 2,61297 menit, sedangkan puncak aquades muncul pada waktu retensi 2,89 menit (Gambar 6 Gambar 7). Luas area puncak senyawa dye-inulin pada variasi massa inulin yang direaksikan dimuat pada Tabel 3. Luas area puncak senyawa inulin-RBB pada variasi massa inulin yang direaksikan dimuat pada Tabel 4.

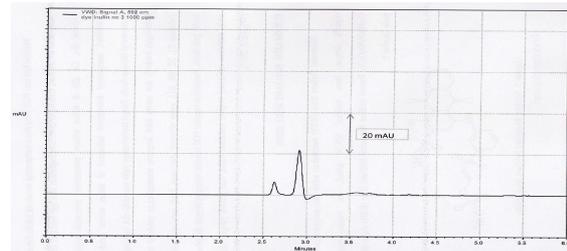




Gambar 6. Kromatogram HPLC larutan inulin-RBB 1000 ppm pada variasi massa inulin: a. 2g inulin; b.4g inulin; c. 6g inulin. Kolom ODS C18,  $\lambda$  592 nm, fasa gerak etanol-air (60%:40%) kecepatan alir 1 mL/menit.

Tabel 3. Luas area kromatogram larutan inulin-RBB 1000 ppm pada variasi massa inulin

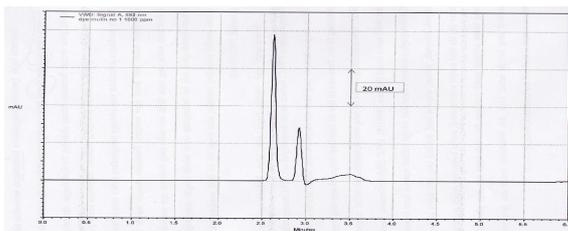
Massa inulin (g)	Luas area	Rata-rata luas area
2	1,0816	1,4826
	1,6682	
	1,6980	
4	1,7092	1,3329
	1,1979	
	1,0916	
6	6,6498	5,9228
	5,5981	
	5,5206	



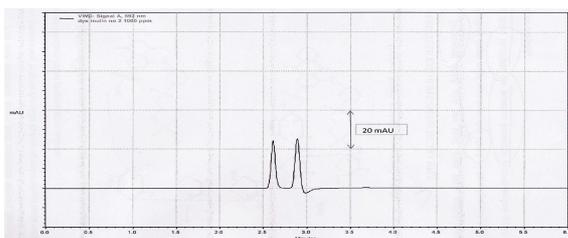
Gambar 7. Kromatogram HPLC larutan inulin-RBB 1000 ppm pada variasi suhu reaksi: a.40°C; b.50°C dan c.60°C. Kolom ODS C18,  $\lambda$  592 nm, fasa gerak etanol-air (60%:40%) kecepatan alir 1 mL/menit.

Tabel 4. Luas area kromatogram larutan inulin-RBB 1000 ppm pada variasi massa suhu reaksi

Suhu reaksi (°C)	Luas area	Rata-rata luas area
40	4,6059	4,8557
	5,7941	
	4,1672	
50	1,7092	1,3329
	1,1979	
	1,0916	
60	0,0608	0,0572
	0,0736	
	0,0373	



Kurva standar RBB digunakan untuk menghitung konsentrasi RBB pada larutan inulin-RBB. Konsentrasi RBB dalam 10 mL larutan inulin-RBB 1000 ppm pada variasi massa inulin dimuat pada Tabel 5. Konsentrasi RBB dalam 10 mL larutan inulin-RBB 1000 ppm pada variasi suhu reaksi dimuat pada Tabel 6.



Tabel 5. Konsentrasi RBB dalam 1000 ppm larutan inulin-RBB dan massa RBB dalam inulin-RBB pada variasi massa inulin

Massa inulin (g)	Konsentrasi RBB dalam 1000 ppm larutan sampel inulin-RBB (ppm)	Massa RBB dalam total sampel inulin-RBB yang terbentuk (g)
2	14,5684	0,0237
4	13,9118	0,1157
6	34,0430	0,1927

Tabel 6. Konsentrasi RBB dalam 1000 ppm larutan inulin-RBB dan massa RBB dalam inulin-RBB pada variasi suhu reaksi

Suhu reaksi (°C)	Konsentrasi RBB dalam 1000 ppm larutan sampel inulin-RBB (ppm)	Massa RBB dalam total sampel inulin-RBB yang terbentuk (g)
40	29,3627	0,0943
50	13,9118	0,1157
60	08,3167	0,0470

Molekul inulin merupakan polimer yang terdiri dari monomer fruktosa dengan derajat polimerasi (DP) yang bervariasi. Reaksi pembentukan inulin-RBB antara inulin dan RBB adalah pembentukan senyawa kompleks. Kompleks inulin-RBB terjadi melalui interaksi antara gugus atom O pada posisi kedua dari monomer fruktosa dalam inulin dengan atom C pada RBB. Dengan demikian diperkirakan setiap molekul RBB dapat terikat pada monomer fruktosa molekul inulin, tetapi tidak setiap monomer fruktosa pada molekul inulin mengikat RBB.

Proses pengikatan RBB pada monomer fruktosa molekul inulin dipengaruhi oleh suhu dan jumlah inulin yang direaksikan. Pada suhu 40°C menghasilkan inulin-RBB yang mengandung RBB lebih tinggi dibandingkan pada suhu 50 dan 60°C. Hal menarik disini adalah jumlah inulin-RBB yang dihasilkan paling tinggi pada suhu reaksi 50°C yaitu 8,3165 g. Jumlah ini lebih tinggi dibandingkan jumlah inulin dan RBB yang direaksikan yaitu 4,5 g (4g inulin + 0,5g RBB).

Pengujian pada larutan inulin-RBB dengan larutan BaCl<sub>2</sub> dan Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ternyata terdapat endapan putih. Endapan putih tersebut adalah BaSO<sub>4</sub> dan Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Pembentukan BaSO<sub>4</sub> dan Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> terjadi karena pada inulin-RBB masih terdapat

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> yaitu garam yang ikut ditambahkan pada proses pembuatan inulin-RBB. Kedua senyawa ini tidak terdeteksi pada kondisi pengukuran RBB pada inulin-RBB secara HPLC.

Jumlah massa inulin yang direaksikan dengan sejumlah massa RBB mempengaruhi jumlah inulin-RBB yang terbentuk. Semakin besar massa inulin yang direaksikan dengan RBB, konsentrasi RBB dalam inulin-RBB juga makin besar. Semakin besar konsentrasi RBB yang terikat pada inulin-RBB, semakin berwarna biru inulin-RBB tersebut. Berdasarkan kenyataan dari data ini semakin kuat dugaan bahwa setiap molekul RBB dapat terikat pada monomer fruktosa molekul inulin, tetapi tidak setiap monomer fruktosa pada molekul inulin mengikat RBB. Proses pengikatan RBB pada polimer molekul inulin dipengaruhi oleh jumlah inulin yang direaksikan dan suhu reaksi.

Pada proses reaksi inulin dengan RBB pada variasi massa inulin dan suhu reaksi, tidak semua RBB terikat pada inulin. Hal ini ditandai dengan pencucian inulin-RBB sampai sekitar 5 kali menghasilkan supernatan yang berwarna biru. Pencucian inulin-RBB dihentikan jika supernatan tidak berwarna lagi. Jumlah RBB paling banyak terikat pada setiap gram inulin-RBB adalah pada reaksi 6 g

inulin dengan 0,5 g RBB pada suhu reaksi 40°C (Tabel 7).

### KESIMPULAN

Penentuan kadar RBB pada inulin-RBB secara HPLC menggunakan kolom ODS C18,  $\lambda$  592 nm, fasa gerak etanol-air (60%:40%) kecepatan alir 1 mL/menit disimpulkan bahwa: (1). Kadar RBB dalam inulin-RBB pada variasi massa inulin 2g, 4g dan 6g yang masing-masing direaksikan dengan 0,5g RBB berturut-turut adalah 14,5684 ppm, 13,9118 ppm, dan 34,0430 ppm. (2). Kadar RBB dalam inulin-RBB pada reaksi 4g inulin dengan 0,5g RBB pada variasi suhu reaksi 40, 50 dan 60°C berturut turut adalah 29,3627 ppm, 13,9118 ppm, dan 8,3167 ppm.

### DAFTAR PUSTAKA

- Amico, R.D.; Montini, G.; Pisanello, L.; Pivolesan, G.; Bottaro, S., Cracco, A.T.; Zacchello, G., Zacchello, F. (1995). **Determination of inulin in plasma and urine by reversed phase high-performance liquid chromatography**, Journal of Chromatography B, 672 (1) 155-159.
- Andyani, N.F (2001). **Produksi Sirup Fruktosa dari Inulin Dahlia Pinata Cav secara Hidrolisis Asam**. Skripsi. Fakultas Teknologi Pangan IPB. Bogor.
- Brady, J.E. (1990). **General Chemistry principles and Structure**. New York: John Wiley and Sons.
- Castro, GR; Baigori, MD; Sineriz, F (1995). **A plate technique for screening of inulin degrading microorganism**. Journal of Microbiological Methods 22:51-56.
- Franck, Anne; Leenheer, Leen De. (2003). **"Inulin"**. Email: ann.franck@oraf ti.com. Diakses 25 Maret 2004
- Marsilio, R.; Naturale, M.; Manghi, P.; Montini, G.; Murer, L.; Ros, M.; Bisogno, G., Andretta, B.; Dussini, N.; Giordano, G.; Zacchello, G.; Amico, R.D. (2000). **Rapid and simple determination of inulin in biological fluids by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection**, Journal of Chromatography B, 744 (2) 241-247.
- Ricca, E; Calabro, V; Curcio, S; Iorio, G (2007). **The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis**. Critical Reviews in Biotechnology. Jul-sep 2007:129-145.
- Ruo, T.I.; Wang, Z.; Dordal, M.S.; Atkinson, A.J. (1991). **Assay of inulin in biological fluids by high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection**. Clinica Chimica Acta, 204(1-3) 217-222.
- Simanjuntak, P.; Rachmat, J.; Rosalinda, N. (2004). **Tumbuhan Indonesia Sebagai Sumber Inulin**. Alchemy, 3(1) 8-14.
- Tohamy, EY. (2006). **Purification and characterization of exoinulinase enzyme from *Sterptomyces griseus***. Pakistan Journal of Biological Sciences 9(5):911-916.
- Yuan, XL; Goosen, C; Kools, H; Maarel, MJEC; Hondel, CAMJJ; Dijkhuizen, L; Ram, AFJ. (2006). **Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger***. Microbiology. 152:3061-3073.
- Zuleta, A., Sambucetti, M.E. (2001). **Inulin Determination for Food Labeling**. J. Agric. Food Chem., 49 (10) 4570-4572.