

PENGEMBANGAN METODA ANALISA SUKROSA DENGAN HIDROLISIS MENGGUNAKAN INVERTASE

Rini Purnawati

Departemen Teknologi Industri Pertanian, FATETA, IPB

Email: rinipu@apps.ipb.ac.id.

Abstract

Analisa kandungan sukrosa produk pangan pada umumnya metoda yang dianjurkan menggunakan SNI 3547.2-2008. Prinsip kerjanya adalah sukrosa dihidrolisis menggunakan HCl menjadi gula pereduksi, dan gula pereduksi yang diperoleh dianalisa menggunakan metoda Luff Schoorl dengan cara titrimetri. Penggunaan HCl dapat menyebabkan karbohidrat lain yang terkandung dalam bahan akan ikut terhidrolisa sehingga menyebabkan intervensi nilai pengukuran. Pada penelitian ini dilakukan pengembangan metode analisa sukrosa dengan menggunakan enzim invertase untuk menghidrolisa sukrosa menjadi gula pereduksi, selanjutnya gula pereduksi dianalisa dengan metoda DNS secara spektrofotometri. Hasil validasi metoda analisis adalah linieritas dengan persamaan regresi $y = 0,0023x + 0,0009$ nilai $R^2 = 0,9983$, presisi dengan nilai Relatif Standar Deviasi (RSD) = 1,004, akurasi dengan persen perolehan kembali (%recovery) 96,4 – 102,3 %. Nilai LOD dan LOQ masing-masing sebesar 6,52 dan 21,74 ppm

Kata Kunci: Sukrosa, invertase, DNS, validasi metode.

Abstract

The recommended method for sucrose analysis is a method described in SNI 3547.2-2008. The principle of this analysis includes sucrose hydrolysis using HCl to form reducing sugar, which is further analyzed using the Luff Schoorl titrimetry method. However, hydrochloric acid can hydrolyze sucrose and other carbohydrate components present in the sample to produce glucose which can influence the accuracy of the method. In this study, the development of a sucrose analysis method using invertase enzim instead of HCL to hydrolysis sucrose into reducing sugars was carried out. The reducing sugars were then analyzed by the DNS method. The results of the analysis method validation showed a linearity with the regression equation $y = 0.0023x + 0.0009$, the value of $R^2 = 0.9983$, the precision with the value of relative standard deviation (% RSD) = 1.004, and the accuracy with percent recovery 96.4 - 102.3%. The LOD and LOQ values are 6.52 and 21.74 ppm.

Keyword : Sucrose, invertase, DNS, method validation.

PENDAHULUAN

Sukrosa adalah jenis gula yang banyak di alam, diperoleh dengan cara ekstraksi batang tebu, umbi, nira palem dan nira pohon maple (*Acer Saccharum*). Sukrosa banyak dijumpai pada produk makanan dan minuman. Sukrosa memiliki rumus molekul $C_{12}H_{22}O_{11}$, merupakan disakarida yang terdiri dari monomer unit glukosa dan fruktosa.

Metode analisa sukrosa dalam bahan yang mengandung komponen karbohidrat lainnya telah dikembangkan, seperti kromatografi cair maupun kromatografi gas (Low, 1994). Teknik kromatografi merupakan metode yang sangat akurat tetapi dibatasi dengan peralatan yang relatif mahal, oleh sebab itu perlu dicari metoda analisa yang teliti tetapi relatif murah.

Analisis kandungan sukrosa dari suatu bahan tidak selalu pada keadaan senyawa tunggal tetapi umumnya bercampur dengan karbohidrat yang lain, seperti pada buah-buahan, makanan dan minuman. Apabila hidrolisa sukrosa dilakukan menggunakan HCl akan menyebabkan senyawa lain selain sukrosa seperti polisakarida ikut terhidrolisis menjadi gula sederhana yang bersifat pereduksi sehingga kemudian akan ikut terukur.

Pada dasarnya analisa sukrosa dilakukan dalam dua tahap yaitu sukrosa diubah menjadi glukosa dan fruktosa oleh asam atau enzim invertase, dan selanjutnya gula reduksi yang terbentuk dapat dianalisa dengan metode Luff, Lane-Eynon atau DNS.

Masalah utama yang dijumpai pada analisa kadar sukrosa menggunakan hidrolisis asam adalah asam akan menghidrolisis semua rantai polisakarida menjadi gula pereduksi. Analisis dengan metoda titrimetri akan menggunakan bahan kimia yang cukup banyak, waktu analisa yang relatif lama dan tingkat ketelitian yang relatif lebih rendah dibanding metoda spektrofotometri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metoda analisa sukrosa secara titrimetri menjadi spektrofotometri. Pada pengembangan metoda ini diharapkan diperoleh metoda analisa sukrosa yang cukup teliti, waktu pengerjaan yang lebih pendek dan penggunaan bahan kimia yang lebih sedikit sehingga biaya lebih murah dan mengurangi pencemaran.

METODE PENELITIAN

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri enzim invertase, asam khlorida dan sukrosa. Serta bahan kimia untuk analisis adalah N N-dinitrosalisilic acid, phenol, Sodium metabisulfit, potasium sodium tartarat, natrium hidroksida, glukosa, asam sulfat, kalium iodida, indikator pati, tembaga sulfat, asam sitrat, natrium karbonat, phenolphthalein dan akuades. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik, vortex, magnetic stirrer, spektrofotometer UV-Vis, mikropipet, dan alat-alat gelas lain seperti tabung reaksi, erlenmeyer, pendingin balik, gelas piala, gelas ukur, labu ukur, pipet tetes, batang pegaduk, dan buret.

Penelitian ini dilakukan beberapa tahap yaitu: Uji aktivitas enzim invertase. Penetapan kondisi hidrolisis enzim yang digunakan. Analisa sukrosa menggunakan hidrolisis enzim, analisa gula pereduksi dengan metoda DNS. Uji Validasi metoda dalam penelitian ini yang diuji adalah linieritas, sensitivitas, presisi, dan batas deteksi.

1. Uji Aktivitas Enzim

Sebanyak 1ml larutan enzim ditambah dengan sukrosa 1% sebanyak 1 mL, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya dianalisa dengan menggunakan DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) (Prabawa *et al.* 2012). Tetapkan blanko dengan cara yang sama hanya pada larutan sukrosa diganti dengan akuades.

Kurva standard dibuat dengan larutan yang mengandung glukosa standard pada konsentrasi 50 – 250 ppm. Sebanyak 2 mL larutan standard glukosa ditambah 2 mL pereaksi DNS, Selanjutnya campuran dididihkan selama 5 menit. Pengukuran absorbansi sampel dibaca menggunakan *spektrofotometer* dengan panjang gelombang 540 nm. Kurva standar dibuat dengan memplot data absorbansi terhadap konsentrasi glukosa.

2. Penentuan Kondisi Hidrolisis dengan Enzim

Penentuan kondisi hidrolisis menggunakan enzim invertase untuk uji kandungan sukrosa menggunakan beberapa variasi suhu hidrolisis, yaitu 30, 40, dan 50 °C. Waktu hidrolisis yang digunakan 5, 10, 15 dan 20 menit, dengan 2 kali ulangan. Pada pengujian untuk mencari suhu dan waktu hidrolisis terbaik, pengujian dilakukan terhadap sukrosa standard.

3. Penetapan Kadar Sukrosa dengan Hidrolisis Enzim

Sebanyak 1 mL larutan enzim ditambahkan ke dalam 1 mL larutan sukrosa pada kondisi pH 5,5. Campuran diaduk rata dan diinkubasi agar terjadi proses hidrolisis sukrosa menjadi monosakarida yang merupakan gula pereduksi (gula invert). Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2 mL pereaksi asam dinitrosalisilat (DNS). Selanjutnya campuran dididihkan selama 5 menit. Pengukuran absorbansi dibaca menggunakan *spectrofotometer* dengan panjang gelombang 540 nm. Penetapan contoh sebelum hidrolisis/inversi dilakukan seperti contoh, tetapi begitu dicampurkan enzim dengan contoh/sukrosa reaksi langsung dihentikan dengan pereaksi DNS dan segera dididihkan selama 5 menit

Penetapan blanko dilakukan seperti contoh, tetapi sebagai pengganti enzim dan sukrosa digunakan akuades.

Kadar Sukrosa : $(A - B) \times 0,95$

A : Kadar gula pereduksi setelah hidrolisis

B : Kadar gula pereduksi sebelum hidrolisis

4. Validasi Metoda

Data yang diperoleh pada penelitian akan dikoreksi menggunakan parameter statistik, yaitu linieritas, presisi, sensitivitas, dan batas deteksi (Harmita 2004).

Linieritas

Linieritas menunjukkan kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004).

Dalam penelitian ini, penentuan linieritas dilakukan dengan mengukur larutan sukrosa standard. Pengujian larutan standar dilakukan pengulangan pengukuran sebanyak 3 kali, pada konsentrasi 0 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm dan 150 ppm. Kurva kalibrasi diperoleh dengan mengukur kandungan gula invert hasil hidrolisis oleh enzim dialurkan terhadap nilai absorbansi (y) dan konsentrasi (x). Kurva yang terbentuk memenuhi persamaan regresi linier. Hubungan yang linier dinyatakan dengan koefisien korelasi (r) yang mengikuti Persamaan :

$$y = bx + a.$$

Sensitivitas

Sensitivitas dapat diketahui dari nilai *slope* kurva kalibrasi linier yang didapatkan dari uji linieritas (Miller and Miller, 1991).

Presisi

Penentuan presisi dilakukan dengan menentukan nilai konsentrasi dari sukrosa yang didapat (menggunakan kurva kalibrasi linier). Kemudian ditentukan rata-rata (*mean*), simpangan baku (SD) dan persen simpangan baku relatif (% RSD) dari hasil pengukuran (Riyanto, 2014). Presisi dapat ditentukan dengan Persamaan ini

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(y - \bar{y})^2}{n-2}}$$

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan menggunakan metode akurasi baku dan diekspresikan dengan menghitung persentase *recovery*. Pengujian dilakukan dengan membuat larutan standar sukrosa pada konsentrasi 100 ppm, 300ppm dan 500 ppm. Pengujian akurasi dilakukan dengan 3 kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi. *Recovery* dihitung dengan rumus:

$$Recovery = \frac{kadar\ terukur}{kadar\ sebenarnya} \times 100\%$$

Hasil analisis dinyatakan memenuhi syarat jika persentase *recovery* berada pada selang 80 – 110 %

Batas Deteksi dan Batas kuantifikasi (LOD dan LOQ)

Batas Deteksi atau limit deteksi (*Limit of Detection*) adalah konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima. Batas deteksi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$LD = \frac{3 \times SD}{b}$$

Batas kuantifikasi dihitung dengan persamaan:

$$LQ = \frac{10 \times SD}{b}$$

Dimana, SD adalah standar deviasi dan b adalah slope dari kurva kalibrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Aktivitas Enzim

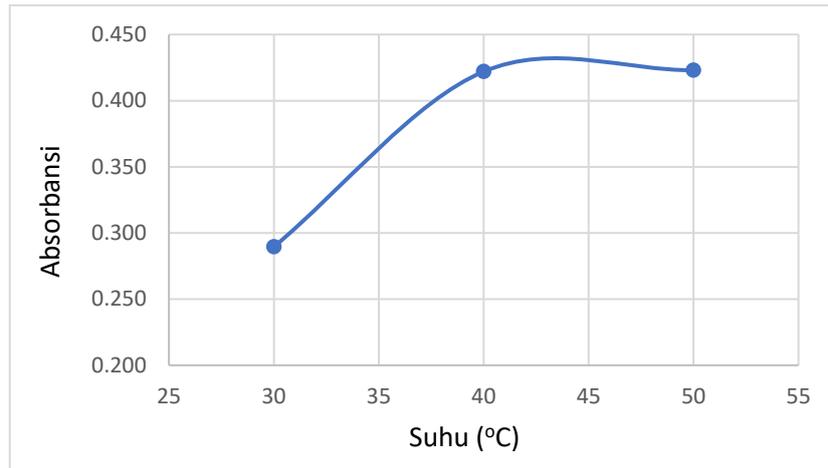
Enzim invertase yang digunakan diperoleh dari ragi roti (*Saccharomyces cereviceae*). Pengujian aktivitas invertase, sebanyak 5 gram dilarutkan dalam buffer pH 5,5 menjadi 100 mL. Pengadukan dilakukan selama 10 menit kemudian disaring menggunakan kertas saring. Hasil pengamatan aktivitas enzim invertase yang dipergunakan adalah 62,21 unit.

2. Penentuan Kondisi Hidrolisis dengan Enzim

Penetapan Suhu

Enzim dapat berfungsi untuk mempercepat terjadinya reaksi kimia. Pada batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell,1988). Oleh sebab itu, penentuan aktivitas enzim pada suhu optimum sangat perlu, karena apabila suhu terlalu rendah maka kestabilan enzim tinggi tetapi aktivitasnya rendah (Muchtadi, 1992). Namun, kecepatannya akan menurun drastis pada suhu yang lebih tinggi. Hilangnya aktivitas pada suhu tinggi karena terjadinya perubahan konformasi panas (denaturasi) enzim. Berdasarkan hasil penelitian pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim invertase dapat dilihat pada Gambar 1.

Setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu. Hasil pengamatan pada Gambar 1. menunjukkan kemampuan enzim invertase yang digunakan cukup optimal bekerja pada suhu 40 °C. Ketika suhu dinaikkan setelah suhu optimum, kompleks enzim-substrat yang melampau energi aktivasi terlalu besar, sehingga memecah ikatan sekunder

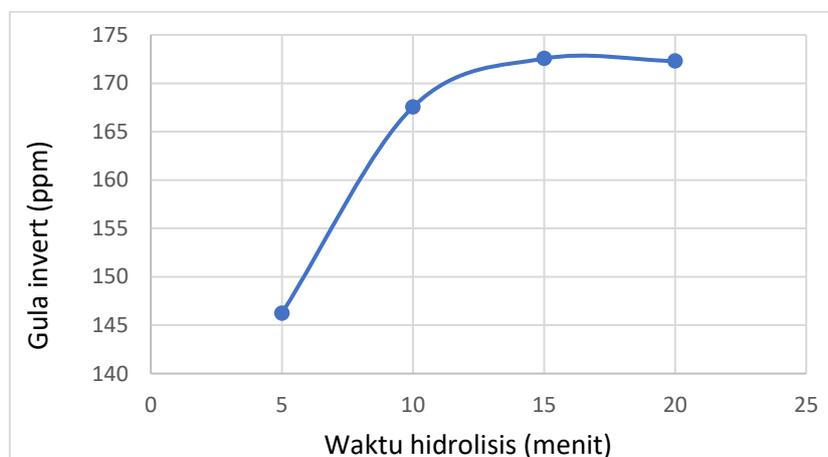


Gambar 1. Pengaruh suhu terhadap nilai absorbansi larutan pada hidrolisis sukrosa dengan invertase

pada konformasi enzim dan sisi aktifnya. Hal ini mengakibatkan enzim terdenaturasi dan kehilangan sifat katalitiknya (Novita, 2006). Pada penelitian ini proses hidrolisis sukrosa menjadi gula invert selanjutnya digunakan suhu 40°C

Penetapan Waktu Hidrolisis

Pengaruh waktu inkubasi terhadap sukrosa dapat dilihat pada Gambar 2. Semakin lama waktu hidrolisis, semakin tinggi gula invert yang diperoleh sampai pada menit ke 15. Peningkatan waktu selanjutnya tidak meningkatkan jumlah gula invert yang terbentuk lagi. Hal ini menunjukkan bahwa waktu hidrolisis 15 menit telah cukup untuk menghidrolisa seluruh sukrosa menjadi gula invert. Itulah sebabnya pada penelitian ini, waktu yang digunakan untuk hidrolisis adalah 15 menit.



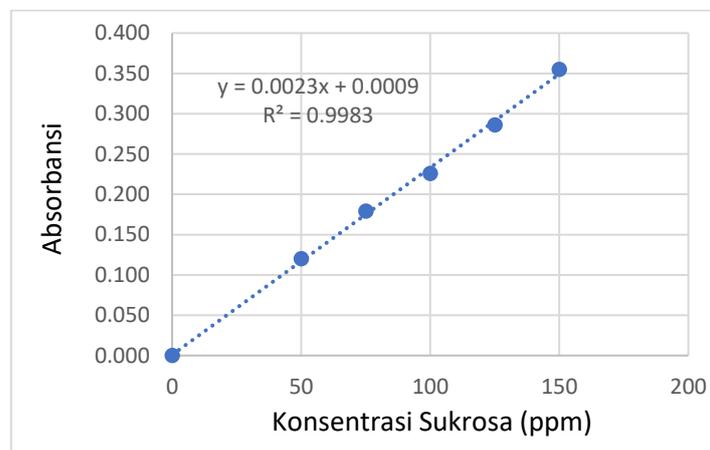
Gambar 2. Pengaruh waktu hidrolisis terhadap terbentuknya gula invert

3. Validasi Metoda

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan penelitian laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan dapat dipergunakan. Validasi adalah suatu proses evaluasi ketepatan dan ketelitian yang dihasilkan oleh suatu prosedur dengan nilai yang dapat diterima. Ini dilakukan untuk memastikan bahwa metoda pengujian tersebut sesuai dan mampu menghasilkan data yang valid.

Linieritas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linieritas suatu metoda analisis dinilai dengan cara menentukan grafik respon terhadap konsentrasi bahan, koefisien korelasi (r) dari persamaan garis lurus (Ermer *et al.*, 2005). Kenkel (2000) merekomendasikan untuk pengujian linieritas kurva baku suatu metode analisis minimal menggunakan 5 konsentrasi larutan baku. Hasil pengukuran kurva larutan sukrosa dapat dilihat pada Gambar 3. Konsentrasi larutan sukrosa yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm.



Gambar 3. Kurva hubungan konsentrasi sukrosa dengan kepekatan warna (Absorbansi)

Persamaan regresi yang diperoleh dari pengatan adalah $y = 0,0023x + 0,0009$. Koefisien korelasi dari persamaan regresi linier (R^2) adalah 0,9983, linieritas metode analisis menurut AOAC (2012) mempunyai persyaratan $R^2 > 0,990$. Metoda ini

menunjukkan memiliki linieritas yang baik. Pengukuran kadar sampel yang mengandung sukrosa dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva baku tersebut dijamin validitasnya ketika kadar sampel masuk dalam selang kurva baku.

Sensitivitas

Sensitivitas merupakan rasio antara perubahan respon alat ukur terhadap perubahan konsentrasi analit yang diukur. Sensitivitas suatu teknik ditentukan dari kemiringan (slope) grafik kalibrasi. Sensitivitas dikatakan baik apabila grafik atau persamaan regresi yang dihasilkan mempunyai nilai kuadrat koefisien korelasi (r^2) yang lebih besar atau sama dengan 0,99. Hasil pengamatan menunjukkan sensitivitas metoda adalah 0,0023. Nilai kuadrat koefisien korelasi (r^2) adalah 0,9983

Presisi (Ketelitian)

Pengujian presisi yang dilakukan adalah kategori keterulangan (*repeatability*) sebagai variasi dalam sehari. Penentuan presisi metode dilakukan dengan melakukan analisis larutan sukrosa. Larutan uji dibuat sebanyak 10 (sepuluh) ulangan. Hasil analisis nilai presisi (%RSD) diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji presisi metode analisa sukrosa dengan hidrolisis enzim

Pengulangan	Konsentrasi Sukrosa (ppm)
1	197
2	198
3	195
4	200
5	197
6	198
7	195
8	195
9	199
10	200
Rata-rata	197
SD	1,98
RSD (%)	1,004

Berdasarkan hasil uji, dapat diketahui bahwa metode analisa sukrosa menggunakan hidrolisis enzim memiliki presisi yang baik, dengan nilai simpangan baku 1,98 dan % RSD 1,004. Ketelitian untuk analisis dikatakan cukup baik jika simpangan baku (SD) $\leq 2\%$ (Ermer dan Miller, 2005).

Akurasi (Ketepatan)

Uji akurasi digunakan untuk menunjukkan kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Hasil persamaan regresi kurva baku adalah $y = 0,0023x + 0,0009$ dengan nilai $r^2 = 0,9983$. Data pengamatan uji akurasi diperlihatkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji akurasi metode analisa sukrosa dengan hidrolisis enzim

Sampel Uji (ppm)	Absorbansi	Kadar Sukrosa (ppm)	Recovery (%)
50	0,113	48,7	97,5
	0,116	50,0	100,1
	0,115	49,6	99,2
150	0,340	147,4	98,3
	0,349	151,3	100,9
	0,354	153,5	102,3
250	0,583	253,1	101,2
	0,562	244,0	97,6
	0,555	240,9	96,4

Akurasi dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali (% *recovery*). Hasil pengujian menunjukkan hasil yang baik dan memenuhi persyaratan untuk uji akurasi. Hasil %*recovery* dikatakan memenuhi apabila nilai persentase berada pada selang 85 – 110 % (AOAC, 2012).

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi (LOD dan LOQ)

Batas deteksi merupakan jumlah atau konsentrasi terkecil analit yang dapat dideteksi dalam sampel, namun tidak perlu diukur sesuai dengan nilai sebenarnya. Batas kuantitas adalah jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif pada tingkat ketelitian dan ketepatan yang baik. Hasil perhitungan berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh memiliki nilai LOD: 6,52 ppm dan LOQ: 21,74 ppm.

KESIMPULAN

Metoda analisa sukrosa menggunakan hidrolisis enzimatis dan spektrofotometri memberikan hasil yang memenuhi syarat linearitas, presisi, akurasi, LOD dan LOQ yang cukup baik. Parameter linearitas memberikan nilai koefisien korelasi dari persamaan regresi linier (R^2) 0,9983. Hasil koefisien variasi memberikan hasil yang baik dengan nilai 1,98 % menunjukkan ketelitian metode analisis yang baik. Parameter ketepatan juga memberikan hasil yang baik dan memenuhi persyaratan dengan rentang % *recovery* 96,4 – 102,3 %. Sehingga enzim invertase dapat menggantikan fungsi HCl, dimana penggunaan enzim lebih sedikit, lebih murah dan lebih ramah lingkungan karna enzim adalah protein.

Secara keseluruhan dapat dinyatakan bahwa metode analisis spektrofotometri yang diujikan merupakan metode yang akurat, tepat, simple, ekonomis dan ramah lingkungan untuk penetapan kadar sukrosa.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Sumber Daya Manusia Institut Pertanian Bogor, yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Kompetitif Penelitian Pranata Laboratorium Pendidikan IPB.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2012. Official Methods Of Analysis, Appendix K : Guidelines For Single Laboratory Validation Of Chemical Methods For Dietary Supplements And Botanical.
- Burgess C. 2000. *Valid Analytical Methods and Procedures*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- Chan CC, Lee YC, Lam H, and Zhang XM. 2004. *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. Canada: John Wiley and Sons. PP: 37-39, 43.
- Ermer, J. and Miller, J. 2005, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis A Guide to Best Practice*, Wiley-VCH GmbH & Co. KgaA, Weinheim (3): 248-249.
- Gandjar I G, dan Rohman A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. I (3) : 117-135.
- Indriani DO, Syamsudin LNI, Sriherfyna FH, dan Wardani AK. 2015. Invertase dari *Aspergillus niger* dengan Metode Solid State Fermentation dan Aplikasi di Industri: Kajian Pustaka. *J. Pangan dan Agroindustri* 3(4) : 1405-1411
- Kulshrestha S, Tyagi P, Sindhi V, Sharma K, dan Yadavilli. 2016. Invertase and Its Applications, *J. of Pharmacy Research*. 07(9): 792-797.
- Kenkel, J. 2000, A Primer on Quality in the Analytical Laboratory, Lewis Publishers, Boca Raton Florida
- Low NH. 1994. *Carbohydrate Analysis*. Dalam: Nielsen, S S. (Editor). Introduction to the Chemical Analysis of Foods. Jones and Bartlett Publisher. Boston. 137-167.
- Lee. 1992. Biochemical Engineering. New Jersey: Prentice J.M. Hall
- Miller JC, dan Miller JN. 1991. *Statistika untuk Kimia Analitik*. Diterjemahkan Suroso. ITB Bandung.
- Muchtadi D, Palupi NS, dan Astwan M. 1992. Teknologi Pemasakan Hal.596. Ekstrusi. PAU Pangan dan Gizi IPB Bogor.
- Prabawa AA, Utomo EH, Abdullah. 2012. Produksi Enzim Invertase oleh *Saccharomyces cerevisiae* Menggunakan Substrat Gula dengan Sistem Fermentasi Cair. *J. Teknologi Kimia dan Industri* 1(1): 139-149.
- PubChem. *U.S. National Library of Medicine*. National Center for Biotechnology Information.
- Riyanto. 2014. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji*. Deepublish. Yogyakarta