Pengaruh Penyiapan Sampel pada Pengembangan Metode Analisis Laktosa dalam Susu Formula Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Mardiana, *Sophi Damayanti, Slamet Ibrahim

Kelompok Keilmuan Farmakokimia, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

Abstrak

Penelitian ini menggunakan tiga jenis prosedur preparasi sampel untuk penetapan kadar laktosa dari susu formula bayi menggunakan KCKT. Kondisi optimum KCKT adalah sebagai berikut: detektor indeks refraksi, kolom NH_2, fase gerak ACN-H_2O (65:35) dengan laju alir 1 mL/menit. Metode ini memberikan linieritas dengan r 0,9998; koefisien variansi regresi 1,25%; batas deteksi 0,12 mg/mL; dan batas kuantitasi 0,35 mg/mL. Prosedur preparasi III memberikan keseksamaan dan keakuratan yang lebih baik dibandingkan prosedur I dan II, mengindikasikan bahwa prosedur preparasi sampel adalah tahap krusial pada penentuan kadar laktosa dalam susu formula bayi.

Kata kunci: laktosa, susu formula bayi, preparasi sampel, kromatografi cair kinerja tinggi, detektor indeks refraksi

Abstract

This research performed three different sample preparation procedure before the determination of lactose content from infant milk formula using HPLC technique under following optimum conditions: refractive index detector, NH_2 column, mobile phase ACN-H_2O (65:35) with the flow rate 1 mL/minute. The method gave calibration curve with r = 0.9998; regression coefficient variance 1.25%; limit of detection 0.12 mg/mL; and limit of quantitation 0.35 mg/mL. Procedure preparation III gave precision and recovery better than procedure I and II, indicating that the sample preparation is crucial step in the determination of lactose in infant milk formula.

Keywords: lactose, infant milk formula, sample preparation, high performance liquid chromatography, refractive index detector

Pendahuluan

Susu formula bayi (SFB) adalah susu formula sebagai pengganti ASI untuk bayi (sampai usia 6 bulan) (BPOM 2009). Berbagai usaha untuk mendekatkan komposisi formulasi SFB dengan ASI telah dilakukan. Modifikasi penting yang dilakukan, diantaranya adalah penambahan laktosa (Goedhart dan Bindels 1994).

Preparasi sampel merupakan tahapan penting dalam analisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Penelitian ini menggunakan tiga macam prosedur preparasi sampel berdasarkan prosedur yang digunakan oleh Coppa *et al*. (1993), Chavez-Servin *et al*. (2004) dan Merck (1999), serta Ferreira *et al*. (1998).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemampuan masing-masing prosedur preparasi untuk penetapan kadar laktosa yang akurat dari susu formula. Serta bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode penentuan kadar laktosa dalam susu formula menggunakan KCKT dengan detektor indeks refraksi dan kolom kromatografi Inertsil NH_2.

* Penulis korespondensi, e-mail: sophi.damayanti@fa.itb.ac.id

Percobaan

Alat

KCKT dengan Hitachi RI detector L-2490, pompa Hitachi RI Pump L-2130, injektor Rheodyne 7725I 20 µL, kolom NH_2 Inertsil 5 µm, 250 x 4.6 mm i.d., timbangan analitik, mikropipet, kertas saring Whatman No.1, membran filter 0,2 µm, termometer. kompor listrik, sonikator, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Bahan

Laktosa monohidrat dibeli dari Brataco (DMV Fonterra *pharma grade*), akuabidestilata steril, air deionisasi, asetonitril *LC Grade* (JT Baker), etanol 95% (pa), oksalat dihidrat (pa), larutan Carrez I (3,6 g $K_4[FeCN)_6].3H_2O$/ 100 mL H_2O, pa), larutan Carrez II (7,20 g $ZnSO_4.7H_2O$/100 mL H_2O, pa), sampel SFB (usia 0-6 bulan).

Penyiapan Fasa Gerak

Dilakukan pemilihan fase gerak dengan komposisi perbandingan ACN-H_2O adalah 85:15 (1:0,18), 80:20

(1:0,25), 75:25 (1:0,33), 70:30 (1:0,43), dan 65:35 (1:0,54).

Penyiapan Larutan Baku Induk

Ditimbang seksama 1000 mg laktosa monohidrat, dimasukkan ke dalam labu volumetri 100 mL, dan ditambahkan *aquabidest* sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan baku induk dengan konsentrasi 10 mg/mL.

Penyiapan Seri Larutan Baku Kerja untuk Kurva Kalibrasi

Seri larutan baku disiapkan dengan cara melakukan pengenceran larutan baku induk sehingga diperoleh 8 konsentrasi yang berbeda, yaitu: 0,5; 1; 2,5; 4; 5,5; 7; 8,5; dan 10 mg/mL laktosa monohidrat.

Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan penyuntikan berulang (enam kali pengulangan) larutan baku kerja konsentrasi 7 mg/mL ke dalam sistem KCKT, selanjutnya ditentukan nilai waktu retensi, AUC, dan tinggi kromatogram. Kemudian dihitung nilai simpangan baku relatif (SBR) atau koefisien Variansi (KV). Uji kesesuaian sistem diukur berdasarkan parameter keberulangan penyuntikan, faktor selektivitas, faktor ikutan, dan resolusi.

Uji Linieritas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi

Linieritas metode dievaluasi dengan cara membuat kurva kalibrasi dengan menggunakan delapan konsentrasi larutan baku pada rentang konsentrasi 0,5-10 mg/mL, dimana masing-masing konsentrasi diukur dengan tiga kali replikasi. Kurva kalibrasi didapat dari plot antara konsentrasi laktosa terhadap luas area di bawah puncak kromatogram laktosa. Pengujian linieritas dilakukan dengan cara menentukan koefisien korelasi (r) serta koefisien fungsi regresi (V_{X0}) dari kurva kalibrasi.

Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Parameter kepekaan diperoleh melalui penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi yang dihitung dari kurva kalibrasi

Penentuan Presisi

Penentuan presisi larutan baku laktosa dilakukan dengan melakukan penyuntikan larutan laktosa secara berulang pada tiga hari yang berbeda. Penentuan presisi tiga prosedur preparasi ditentukan dengan cara penentuan konsentrasi laktosa pada sampel SFB dengan enam kali replikasi untuk setiap prosedur. Presisi ditentukan dari nilai % KV. Penentuan presisi larutan sampel SFB dilakukan dengan melakukan penyuntikan larutan sampel SFB secara berulang pada tiga hari yang berbeda.

Penentuan Akurasi

Penentuan akurasi ditentukan dengan menghitung persen perolehan kembali melalui metode standar adisi. Sampel SFB yang mengandung laktosa ditambah standar laktosa dengan konsentrasi masing-masing 110, 120, dan 130%. Masing-masing konsentrasi dianalisis dengan tiga kali replikasi dan dihitung perolehan kembalinya.

Preparasi Sampel

Prosedur Preparasi Sampel I (Coppa et al. 1993)

Setiap sampel ditambahkan asetonitril (1:1, v/v), diikuti dengan sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan dikumpulkan dan disaring melalui membran 0,22 µm. Filtrat sebanyak 20 µL diinjeksikan ke dalam sistem KCKT. Prosedur preparasi sampel Coppa *et al*. (1993) mengalami perubahan kondisi proses didasarkan pada percobaan yang telah dilakukan peneliti. Dari hasil percobaan, penggunaan proses pendinginan terlebih dahulu dalam *freezer* selama 1 jam sebelum proses sentrifugasi didapat hasil proses preparasi yang lebih baik dibanding sentrifugasi tanpa pendinginan sebelumnya. Setelah disentrifugasi, proses pengendapan lebih baik dan warna supernatan lebih jernih.

Sampel yang digunakan Coppa *et al*. (1993) adalah ASI sedangkan sampel yang digunakan peneliti adalah sampel susu bubuk. Pelarutan sampel sesuai petunjuk pada kemasan SFB.

Prosedur Preparasi Sampel II (Merck 1999 dan Chavez-Servin 2004)

Prosedur preparasi sampel II dilakukan berdasarkan modifikasi pada prosedur dari Merck (1999) dan Chavez-Servin (2004). Prosedur hasil modifikasi adalah sebagai berikut: 600 mg sampel SFB ditimbang, kemudian sampel dilarutkan dengan air deionisasi sekitar 10 mL. Larutan sampel dipanaskan pada suhu ± 70^{o}C dan diaduk selama 15 menit. Setelah pendinginan pada suhu ruang, larutan disimpan dalam pendingin (*freezer*) selama 20 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, kemudian difiltrasi.

Filtrat ditambahkan 250 µL larutan Carrez I (diaduk 1 menit), 250 µL larutan Carrez II (diaduk 1 menit), dan ditambahkan 5 mL asetonitril (HPLC *grade*). Larutan digenapkan sampai tanda batas labu volumetri 25 mL dengan air deionisasi, kemudian dibiarkan selama 1 atau 2 jam sampai pembentukan dan presipitasi protein sepenuhnya. Larutan yang dihasilkan disaring dengan kertas saring dan kasar dan

kertas saring Whatman No.1. Kemudian larutan disaring dengan membran filter 0.22 µm dan filtrat diinjeksikan ke dalam sistem KCKT.

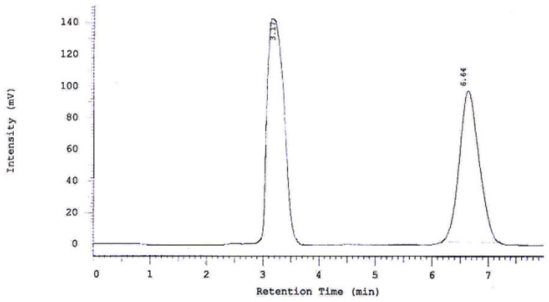
Prosedur Preparasi Sampel III (Ferreira dkk., 1997)
Prosedur preparasi sampel didasarkan pada prosedur preparasi sampel oleh Ferreira *et al*. (1997) untuk analisis laktosa di dalam susu formula, susu sapi, dan ASI. Sekitar 1,5 g sampel dilarutkan dalam air deionisasi hangat. Secara berurutan, ditambahkan 0,5 mL asam oksalat 5% (w/v) dan 5 mL etanol 95%, campuran dihomogenisasi selama 5 menit. Kemudian, volume digenapkan sampai 20 mL dengan air deionisasi dan didiamkan selama 10 menit. Larutan disaring, secara berurutan menggunakan kertas saring kasar, kertas saring Whatman No 1, dan membran filter 0,22 µm, dan filtrat diinjeksikan ke dalam KCKT sebanyak 20 µL.

Penetapan Kadar Laktosa dalam Sampel dengan KCKT

Penetapan kadar laktosa dalam sampel dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku. Dibuat tiga larutan sampel SFB dengan penambahan masing-masing tiga tingkat konsentrasi laktosa monohidrat saat penimbangan. Larutan sampel SFB yang telah dipreparasi (dengan prosedur preparasi sampel terpilih) kemudian diinjeksikan ke dalam sistem KCKT.

Hasil dan Pembahasan

Pemilihan campuran asetonitril dan air sebagai fase gerak didasarkan pada penelitian Chávez-Servin dkk (2004) pada analisis kadar laktosa menggunakan KCKT dengan detektor indeks refraksi, dan fase gerak ACN-H_2O (75:25, v/v). Maka, pengujian pertama kali dilakukan dengan komposisi fase gerak ACN-H_2O (75:25, v/v). Untuk mengetahui respon sistem KCKT terhadap perubahan komposisi fase gerak, maka dilakukan pengujian dengan menaikkan dan menurunkan perbandingan komposisi asetonitril terhadap air, yaitu dengan melakukan pengujian terhadap penggunaan fase gerak ACN-H_2O 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, dan 85:15. Dari hasil percobaan diketahui semakin banyak asetonitril yang digunakan semakin lama waktu retensi laktosa. Pengurangan asetonitril dibatasi sampai perbandingan komposisi ACN-H_2O (65:35, v/v), karena waktu retensi yang semakin singkat dikhawatirkan akan mengganggu keterpisahan antar komponen (resolusi). Kromatogram larutan baku laktosa pada komposisi fase gerak ACN-H_2O (65:35) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram larutan baku laktosa pada komposisi fase gerak ACN-H_2O (65:35).

Nilai KV yang dipersyaratkan dari keberulangan penyuntikan adalah ≤ 2%. KV keberulangan penyuntikan (Tabel 1) untuk waktu retensi, AUC, dan tinggi kromatogram adalah 0,09%; 1,63%; dan 1,23%. Dengan demikian sistem memenuhi syarat untuk uji keberulangan penyuntikan.

Hasil pengujian faktor selektivitas, resolusi, dan faktor ikutan (Tabel 2). Faktor selektivitas yang dipersyaratkan adalah >1. Faktor selektivitas sistem adalah 3,57 ± 1,95 sehingga memenuhi persyaratan. Resolusi yang dipersyaratkan adalah ≥1,5. resolusi sistem menuhi persyaratan, yaitu 5,38 ± 0,16.

Tabel 1. Data Uji Keberulangan Penyuntikan

No	Parameter		
	Waktu Retensi (menit)	**AUC (mAU)**	**Tinggi Kromatogram (mAU)**
1	6,64	2468787	96939
2	6,63	2551096	99626
3	6,63	2542085	98807
4	6,64	2539617	98776
5	6,64	2566684	99433
6	6,65	2476544	96863
Rata-rata	6,64	2524135,5	98407,33
Standar deviasi	0,01	40154,8709	1214,3935
KV (%)	0,09	1,63	1,23

Tabel 2. Data Faktor Selektivitas, Faktor Ikutan dan Resolusi Larutan Baku Laktosa

No	Parameter		
	Faktor Selektivitas	Resolusi	Faktor Ikutan
1	2,27	5,55	1,09
2	6,15	5,36	1,15
3	2,25	5,14	1,08
4	6,03	5,34	1,08
5	2,42	5,34	1,13
6	2,32	5,57	1,13
Rata-rata	3,57	5,38	1,11
Standar Deviasi	1,95	0,16	0,03

Faktor ikutan dinyatakan simetris bila nilainya mendekati 1, berekor bila >1 dan melambung ke depan bila <1. Faktor ikutan sistem bernilai 1,11 ± 0,03 sehingga kromatogram melambung ke belakang. Faktor ikutan yang diinginkan adalah sedekat mungkin dengan 1 oleh karena itu faktor ikutan sistem dapat diterima.

Validasi

Metode ini memberikan linieritas dengan persamaan kurva kalibrasi y = 364048,15x - 17235,22 dengan r = 0,9998; koefisien variansi regresi (Vxo) = 1,25%; batas deteksi = 0,12 mg/mL; dan batas kuantitasi = 0,35 mg/mL.

Kromatogram larutan baku laktosa, larutan sampel hasil preparasi prosedur I,II, dan III masing-masing dapat dilihat pada Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5.

Hasil pengujian keseksamaan untuk prosedur preparasi I (Tabel 3) memberikan koefisien variansi 15,10%, dimana tidak memenuhi persyaratan KV ≤ 2%. Hasil pengujian kecermatan (Tabel 3) memberikan hasil 65,96%, dimana tidak memenuhi persyaratan pada produk makanan 80-120%

Prosedur prepaparasi I berdasarkan prosedur preparasi yang digunakan oleh Coppa *et al*. (1993). Preparasi sampel menggunakan asetonitril. Proses yang diterapkan adalah pencampuran sampel dan asetonitril, pendinginan, sentrifugasi dan kemudian filtrasi.

Asetonitril memiliki konstanta dielektrik lebih rendah dari air, yakni pada suhu 25^{o}C sebesar 35,94-36,70 K (Dortmun Data Bank, 2013) sedangkan air sebesar 78,3 K (Malmberg dan Maryott 1956). Semakin besar konstanta dielektrik pelarut, semakin kecil gaya tarik dari bahan terlarut. Penambahan asetonitril menurunkan konstanta dielektrik medium pelarut, sehingga memudahkan terbentuknya agregasi protein. Proses sentrifugasi dapat memisahkan lemak dari susu dari komponen lain dengan baik melalui proses pengocokan Dengan cara tersebut, secara mekanik film protein di sekeliling globula lemak retak dan pecah, sehingga memungkinkan globula lemak menggumpal dan menyusup ke permukaan. Cara ini merupakan proses pemecahan emulsi minyak dalam air (o/w) dengan pengocokan (Winarno 2003).

Proses filtrasi sampel pada metode ini cukup sulit. Sampel perlu difiltrasi beberapa kali karena mengalami kesulitan saat penyaringan. Penyaringan menggunakan kertas saring kasar, kertas saring Whatman No.1, dan membran filter 0,22 µm. Sampel yang telah disaring dengan membran filter 0,22 µm dapat mengalami presipitasi. Endapan tampak pada dasar vial yang digunakan untuk menyimpan larutan, setelah larutan tersebut dibiarkan selama beberapa hari. Diduga perolehan serta keseksamaan yang tidak memenuhi persyaratan disebabkan oleh banyaknya laktosa yang hilang akibat proses filtrasi berulang-ulang.

Hasil pengujian keseksamaan untuk prosedur preparasi II (Tabel 3) memberikan KV 3,06% dimana tidak memenuhi persyaratan KV ≤ 2%. Sedangkan untuk pengujian kecermatan (Tabel 3) memenuhi persyaratan, yakni 96,29%.

Prosedur Chávez-Servin *et al*. (2004) untuk preparasi sampel menggunakan pereaksi larutan Carrez I dan II, serta asetonitril. Proses yang diterapkan adalah pemanasan, pendinginan, sentrifugasi, filtrasi, penambahan pereaksi, dan kemudian filtrasi kembali.

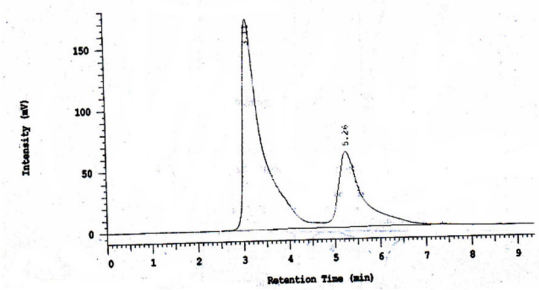
Penggunaan suhu pemanasan 70^{o}C didasari oleh beberapa literatur mengenai karakteristik protein dalam susu. Saat susu dipanaskan pada suhu di atas 65^{o}C, protein whey terbuka dan grup hidrofobik yang sebelumnya tersembunyi terbuka (Raikos 2010). Setelah terbuka, protein whey dapat berinteraksi dengan satu sama lain dan k-casein untuk membentuk agregat protein (Raikos 2010).

Penggunaan suhu 70^{o}C diterapkan karena diduga tidak akan terjadi hidrolisis laktosa pada penggunaan suhu tersebut. Karakteristik ini dapat terlihat pada penggunaan teknologi alternatif proses produksi sirup pemanis berdasarkan pada hidrolisis laktosa. Dimana proses hidrolisis diantaranya menggunakan asam sebagai pengkatalisis hidrolisis, yakni pada pH<1,5. Proses dapat dilakukan dengan penambahan asam secara langsung yang dilakukan pada suhu ~90^{o}C (Gänzle *et al.* 2008).

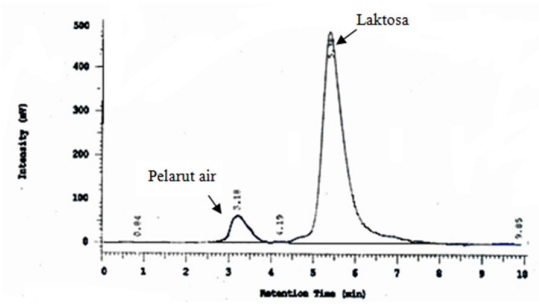
Penyimpanan dalam pendingin selama 20 menit, sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit, dan filtrasi.

Ketiga rangkaian proses tersebut bertujuan untuk menghilangkan lemak.Selain itu, menurut Fox *et al*. (1998), kasein dalam bentuk misel dapat didestabilisasi dan dipresipitasi dengan pendinginan susu (*freezing*) pada suhu sekitar -10^{o}C.

Klarifikasi dengan larutan Carrez adalah cara yang baik dalam analisis enzimatis gula, karena filtrat yang dihasilkan jernih dan analit tidak hilang. Larutan Carrez diaplikasikan pada larutan sampel dengan tujuan untuk menghilangkan protein, turbiditas, dan beberapa pewarna, serta memecah emulsi seperti susu. Mekanisme ini dapat dijelaskan sebagai proses adsorpsi material menjadi partikel kecil, yaitu presipitasi *in statu nascendi* (Henniger 2003). Larutan Carrez sebanyak 0,25 mL cukup untuk mempresipitasi dan membersihkan larutan sampel dari senyawa-senyawa yang dapat mengganggu analisis gula. Kelebihan larutan Carrez menyebabkan instabilitas *baseline* setelah injeksi beberapa sampel ke dalam sistem KCKT, dimana mengganggu analisis sakarida (Chávez-Servin 2004).

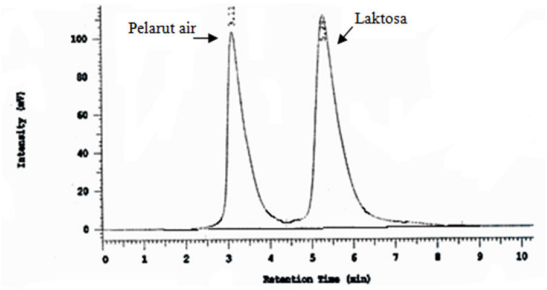


Gambar 2. Kromatogram larutan baku laktosa dengan komposisi fase gerak ACN-H_2O (65:35)

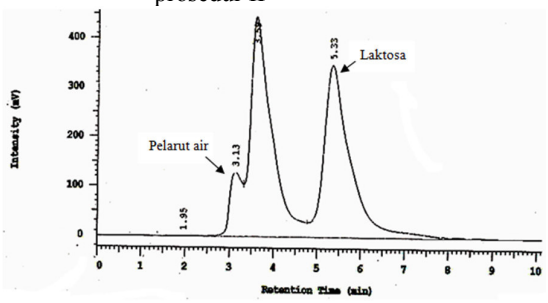


Gambar 3. Kromatogram larutan hasil preparasi prosedur I

Chávez-Servin *et al*. (2004) menggunakan fase gerak asetonitril 75% untuk analisis laktosa pada sampel susu formula wanita hamil. Fase gerak asetonitril 75% (ACN-H_2O, 75:25, v/v) mempresipitasikan komponen non gula yang ada dalam larutan sampel, terlepas dari penambahan larutan Carrez. Hal ini menyebabkan setelah injeksi ke dalam sistem KCKT, terdapat sedikit interferensi pada puncak gula. Oleh sebab itu, 5 mL asetonitril ditambahkan kepada sampel, dengan tujuan untuk benar-benar mempresipitasikan semua zat yang dapat mengganggu fase gerak (asetonitril 75%) setelah diinjeksikan ke dalam KCKT.



Gambar 4. Kromatogram larutan hasil preparasi prosedur II



Gambar 5. Kromatogram larutan hasil preparasi prosedur III

Diduga keseksamaan yang tidak memenuhi persyaratan disebabkan oleh banyaknya laktosa yang hilang akibat proses filtrasi beberapa kali, yakni saat proses penghilangan lemak dan saat proses filtrasi akhir.Hasil pengujian keseksamaan untuk prosedur preparasi III (Tabel 3) memberikan KV 1,93%; dimana memenuhi persyaratan KV ≤ 2%. Sedangkan untuk pengujian kecermatan (Tabel 3) memenuhi persyaratan, yakni 101,66%.

Prosedur Ferreira *et al*. (1998) menggunakan asam oksalat 5% (w/v) dan etanol 95% sebagai pereaksi. Kelarutan protein bergantung pada pH larutan, dan solubilitas minimum diamati pada titik isolistriknya (Malmberg dan Maryott 1956). Denaturasi protein dapat dilakukan dengan penerapan pH mendekati titik isolistrik dan pelarut organik. Protein yang terdenaturasi berkurang kelarutannya. Lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik berbalik ke luar, sedangkan bagian luar yang bersifat hidrofil terlipat ke dalam. Pelipatan atau pembalikan terjadi khususnya bila larutan protein telah mendekati pH isolistrik, dan akhirnya protein akan menggumpal dan mengendap (Winarno 2003).

Tabel 3. Data Uji Keseksamaan dan Kecermatan pada Larutan Sampel Susu Formula Bayi untuk Prosedur Preparasi I, Prosedur Preparasi II, dan Prosedur Preparasi III

Kadar Laktosa Sampel (g/100 g)	Prosedur Preparasi I		Prosedur Preparasi II		Prosedur Preparasi III	
	Kadar Laktosa (g/100 g)	Perolehan (%)	Kadar Laktosa (g/100 g)	Perolehan (%)	Kadar Laktosa (g/100 g)	Perolehan (%)
53,71	36,21	67,43	49,79	92,70	54,70	101,85
	28,68	53,33	53,20	99,06	54,69	101,83
	38,61	71,89	52,93	98,56	56,23	104,69
	41,51	77,28	53,18	99,01	52,93	98,56
	38,49	74,66	50,11	93,30	54,71	101,86
	29,10	54,19	51,09	95,12	54,32	101,15
Rata-rata (%)	65,96		96,29		101,66	
Standar Deviasi	9,96		2,95		1,96	
KV (%)	15,10		3,06		1,93	

Tabel 4. Penentuan Kadar Laktosa dalam Produk Susu Formula Bayi

Sampel	Kadar Laktosa Terukur (mg/mL)	Perolehan Kembali	Standar Deviasi
Sampel A			
Sampel + 3,89 mg/mL	47,01	112,47	0,03
Sampel + 7,78 mg/mL	49,57	87,52	0,98
Sampel + 11,67 mg/mL	55,20	104,16	1,36
Sampel B			
Sampel + 3,98 mg/mL	48,89	97,63	1,20
Sampel + 7,78 mg/mL	53,06	102,37	0,56
Sampel + 11,67 mg/mL	56,68	99,21	2,13

Pelarut organik dapat mempresipitasi protein dan makromelekul lainnya dengan pengurangan konstanta dielektrik medium dimana protein dan makromolekul berada (Malmberg dan Maryott 1956). Konstanta dielektrik air pada 25^{o}C adalah 78,3 (Malmberg dan Maryott 1956), sementara etanol pada suhu yang sama 24,20-25,08 K (Dortmun Data Bank 2013)

Aplikasi pada sampel SFB

Penentuan kadar laktosa dalam sampel SFB (Tabel 4) dilakukan dengan menimbang 1,5 g sampel, kemudian ditambahkan standar baku laktosa monohidrat masing-masing seberat 82,7 mg (77,82 mg laktosa); 165,6 mg (155,64 mg laktosa); dan 245,7 mg (233,46 mg laktosa) pada sampel seberat 1,5 g saat tahap penimbangan, selanjutnya dipreparasi dengan prosedur preparasi sampel III. Pembuatan dan penentuan larutan uji untuk masing-masing konsentrasi dilakukan sebanyak tiga kali.

Aplikasi metode yang telah tervalidasi pada penentuan kadar laktosa dalam sampel susu formula memberikan hasil sebagai berikut: dalam sampel susu formula A sebesar 53,71 g/100 g dan dalam sampel susu formula bayi B sebesar 60,13 g/100 g.

Kesimpulan

Telah dikembangkan metode penetapan kadar laktosa dalam susu formula bayi dengan menggunakan teknik KCKT. Dan dapat disimpulkan bahwa prosedur preparasi III dibandingkan prosedur I dan II dapat digunakan untuk penentuan laktosa yang lebih akurat dalam produk susu formula menggunakan KCKT.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penerapan prosedur III pada jenis sampel susu formula rendah laktosa.

Daftar Pustaka

BPOM, 2009, Peraturan Kepala BPOM RI Nomor HK.00.05.1.52.3920 Mengenai Pengawasan Susu formula bayi dan Susu formula bayi untuk Keperluan Medis Khusus, Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta. http://www.pom.go.id/public (Diakses pada 20 Januari 2012)

Chávez-Servin JL, Catellote AI, López-Sabater MC, 2004, Analysis of Mono and Disaccharides in Milk-based Formula by High-Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection, J. Chromatogr. A 1043: 211-215.

Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL, 1993, Changes in Carbohydrate Composition in Human Milk Over 4 Months of Lactation, Pediatrics 91(3): 637-641.

Dortmun Data Bank, 2013, Dielectric Constant, DDBST GmbH. http://www.ddbst.com/en/EED/PCP/DEC_C3. (Diakses pada 24 Maret 2013)

Ferreira IMPLVO, Gomes AMP, Ferreira MA, 1998, Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI, Carbohydrate Polymers 37: 225–229.

Fox PF, McSweeney PLH, 1998, Dairy Chemistry and Biochemistry, Klenum Academic/Plenum Publishers, New York.

Gänzle MG, Haase G, Jelen P, 2008, Lactose: Crystallization, Hydrolysis and Value-added Derivatives, International Dairy Journal 18: 685-694.

Goedhart AC, Bindels JG, 1994, The Composition of Human Milk As a Model for The Design of Infant Formulas: Recent Findings and Possible Applications; Nutrition Research Reviews 7: 1-23.

Henniger G, 2003, Enzymatics Techniques for Authenticating Food Components, in: Lees, M., (Ed), Food Authenticity and Traceability.

Malmberg CG, Maryott AA, 1956, Dielectric Constant of Water from 0° to 100° C, J. Res. Natl. Bur. Stand. 56(1): 1-8.

Merck E, 1999, Sample Preparation: Cheese, Choholate, Sausage, and Others Products (Ice Cream, Baby Food, Milk), in: Pierre-Jean Raugel, (Ed), Rapid Food Analysis and Hygiene monitoring: kits, instruments, and Systems, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.

Raikos V, 2010, Effect of Heat Treatment on Milk Protein Functionality at Emulsion Interfaces. A review, Food Hydrocolloids 24(4): 259–265.

Winarno FG, 2003, Kimia Pangan dan Gizi, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.