

VERIFIKASI METODE DAN PENENTUAN KADAR LAKTOSA DALAM SAMPEL SUSU YANG BERPERISA MENGGUNAKAN KROMATOGRAPI CAIR KINERJA TINGGI

Sophi Damayanti¹, Low Sin Ee¹, Slamet Ibrahim¹

¹KK Farmakokimia, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung

Email: sophi.damayanti@fa.itb.ac.id

ABSTRAK

Laktosa merupakan gula disakarida dari glukosa dan galaktosa dalam susu. Sebagai sumber sumber gizi, susu dipilih oleh atlet untuk dikonsumsi. Namun demikian, laktosa dapat menyebabkan laktosa intoleransi, oleh karena itu kandungannya perlu ditentukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk verifikasi metode dan penentuan kadar laktosa dalam susu yang berperisa dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sampel susu diencerkan dengan asetonitril(1:1) dan dilarutkan hingga 100mL dengan air. Susu kemudian difiltrasi dengan 0.45 μ m filter membrane. laktosa kemudian dianalisis menggunakan KCKT detektor indeks bias, kolom fase terikat NH₂, 10 μ m (250 μ m \times ID 4.6mm), dan suhu kolom pada 25°C, fase gerak asetonitril dan air (65:35) dengan laju alir adalah 1,0mL/min. Verifikasi metode menunjukkan linearitas dengan koefisien korelasi, $r^2 = 0.9997$ dan persamaan garis $y=106434,5500x-77704,1667$. Koefisien fungsi regresi yang dihitung (V_{x0}) untuk laktosa yaitu 0.376. Pengujian presisi menghasilkan koefisien variansi untuk *inter* dan *intraday* adalah 0,3844 dan 1,6758. Persentase perolehan kembali untuk laktosa dengan metode standar adisi berada dalam rentang 99,018-101.408 %. Sampel 1 mengandung laktosa $1,277\pm 0,283$ dan sampel 2 mengandung $1,094\pm 0,013$ %. Sebagai kesimpulan, kandungan laktosa dalam susu berperisa dapat ditentukan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor indeks bias.

Kata kunci: Laktosa, susu, indeks bias, KCKT

Abstract

Lactose is a disaccharide sugar from sugar and galactose in milk. As a source of nutrition, milk is chosen by athletes to be purchased. However, Lactose can cause lactose intolerance, therefore its supply needs to be determined. The purpose of this study was to examine the method and determination of lactose content in flavored milk using high-performance liquid chromatography (HPLC). Milk samples were diluted with acetonitrile (1: 1) and dissolved to 100 mL with air. The milk is then filtered with a 0.45 μ m membrane filter. The lactose was then analyzed using the HPLC refractive index detector, the column phase received NH₂, 10 μ m (250 μ m \times ID 4.6mm), and the column temperature at 25oC, the mobile phase of acetonitrile and air (65:35) with the flow movement was 1.0mL / min. Verify the linearity conversion method with the conversion coefficient, $r^2 = 0.9997$ and the line equation $y = 106434.5500x - 77704.1667$. The calculated coefficient of regression function (V_{x0}) for lactose is 0.376. Precision testing produces variance coefficients for inter and intraday are 0.3844 and 1.6758. The percentage received again for lactose by the standard addition method is in the range of 99.018-101.408%. Sample 1 contained lactose 1.277 ± 0.283 and sample 2 contained $1.094 \pm 0.013\%$. In conclusion, lactose reserves in milk can be used using high liquid chromatography with a biased detector.

Keywords: Lactose, milk, refractive index, HPLC

PENDAHULUAN

Manusia diketahui mampu mencerna kandungan gula dalam tubuh termasuk laktosa. Sayangnya, sekitar 75% populasi dunia tidak memiliki kemampuan tersebut yang disebut dengan kondisi intoleransi laktosa (Mattar et al, 2014). Gejala intoleransi laktosa ditunjukkan oleh nyeri dan kram abdomen, flatus, dan diare (Deng et al 2015). Oleh karena itu, penentuan kandungan laktosa dalam produk susu sangat diperlukan.

Analisis gula pada monosakarida dan disakarida diperlukan dalam industri makanan untuk pengawasan mutu. Metode seperti iodometrik dan kolorimetri digunakan untuk analisis gula (Perez et al, 1997). Baru-baru ini, metode enzimatik dan kromatografi untuk menentukan laktosa juga telah ditemukan (Ellefson, 2002; Mangan et al, 2018). Metode dengan menggunakan instrumen KCKT dikenal luas sebagai

metode analisis yang efektif untuk analisis penentuan simultan (Kazakevich dan LoBrutto, 2007).

Penelitian sebelumnya telah melaporkan penggunaan kromatografi cair kinerja tinggi untuk menentukan kadar gula dalam produk makanan (Damayanti, 2012) dan pengaruh persiapan sampel untuk laktosa dalam susu formula untuk bayi (Mardiana, 2014). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memverifikasi metode dan penentuan gula dalam susu berperisa yang belum ditentukan sebelumnya dengan menggunakan KCKT.

METODE

Preparasi Larutan Standar

10 mg Laktosa ditimbang. Masing-masing dilarutkan dengan air suling dalam labu volumetrik 100 mL. Labu

volumetrik diguncang secara vertikal sampai semua laktosa dan glukosa sepenuhnya larut untuk menghasilkan larutan stok laktosa. Larutan standar laktosa dibuat pada 2%, 4%, 6%, 8%, 10% dalam labu volumetrik dengan mengencerkan larutan stok laktosa.

Preparasi Fase Gerak

50 mL asetonitril dan 350 mL dilarutkan dalam labu volumetrik 1L.

Kondisi KCKT

KCKT dengan detektor indeks bias dan kolom yang digunakan adalah kolom fase terikat NH₂, 10µm (250mm x 4.6mm I.D.) dan suhu kolom pada suhu kamar. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril: air (65:35). Laju alir adalah 0,5 mL / mnt. volume injeksi adalah 10µL.

Verifikasi Metode

Linearitas

Luas puncak rata-rata untuk setiap konsentrasi campuran dihitung. Kurva kalibrasi untuk laktosa diplot dengan memplot area puncak rata-rata versus konsentrasi. Linearitas diukur berdasarkan regresi linier yang diperoleh dari grafik. Selain itu, koefisien fungsi regresi, Vx0, dihitung berdasarkan data AUC relatif terhadap gradien kemiringan.

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi (BD dan BK)

BD dan BK dihitung berdasarkan data dari kurva kalibrasi. Batas deteksi dihitung tiga kali standar deviasi konsentrasi yang dihitung. Batas kuantifikasi dihitung sepuluh kali standar deviasi konsentrasi yang dihitung.

Akurasi

Keakuratan metode ditentukan berdasarkan persentase perolehan kembali dari jumlah laktosa yang ditambahkan ke sampel.

Presisi

Ketelitian metode ditentukan dengan menyuntikkan larutan berulang kali selama enam kali pada hari pertama dan tiga hari berturut-turut. Persentase koefisien variansi kemudian dihitung.

Preparasi sampel

Sampel susu rasa vanila dan rasa scoklat diendapkan oleh asetonitril dengan volume rasio 1: 1 dan diencerkan dengan 100 mL air suling dalam labu volumetrik. Kemudian, disaring melalui C₁₈ cartridge kemudian disaring melalui membran filter 0,45µm

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, laktosa dianalisis dengan KCKT menggunakan detektor indeks bias. Kolom yang digunakan adalah kolom fase terikat NH₂, 10µm

(250mm x 4.6mm I.D.) dan suhu kolom adalah pada suhu 25°C. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril: air (65:35). Laju alir adalah 1.0 mL /menit. volume injeksi adalah 10µL.

Uji kesesuaian sistem diterapkan untuk mengevaluasi indikator kinerja sistem dibandingkan dengan persyaratan. Resolusi, faktor kapasitas, plat teoritis dan *tailing factor* adalah parameter yang digunakan dalam parameter kesesuaian sistem (David, 2005).

Tabel 1 Hasil Uji Kesesuaian Sistem (Satinder, 2005)

Parameter	Laktosa	Persyaratan
Resolusi	1,925	> 1,5
Faktor kapasitas	7,104	1 – 20
Plat teoritis	8809	> 2000
Tailing Factor	1,083	0,9 – 1,4

Tabel 2 menunjukkan hasil presisi untuk waktu retensi dan luas area di bawah kurva (AUC) laktosa. Presisi waktu retensi dan luas area di bawah kurva (AUC) untuk laktosa menunjukkan persentase koefisien variansi kurang dari 2%. Hasil menunjukkan pengujian presisi memenuhi persyaratan untuk ketelitian

Tabel 2 Hasil Presisi AUC dan Waktu Retensi Laktosa

Sampel	Laktosa tr (min)	AUC
1	5,0467	448427
2	5,0533	468321
3	5,0733	446880
4	5,0867	463821
5	5,0867	453229
6	5,0267	448999
% KV	0,4760	1,9747

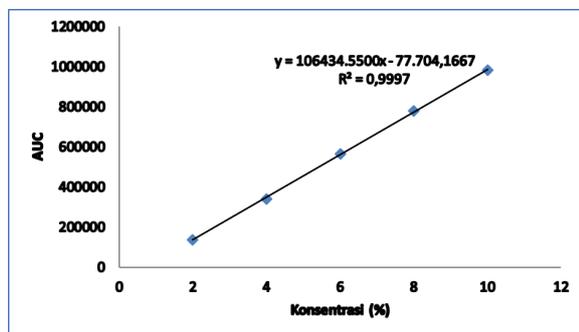
Verifikasi metode dilakukan untuk mengonfirmasi bahwa metode dapat dipercaya. Linearitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, presisi, dan akurasi adalah parameter yang diukur dalam menguji metode (David et al, 2005; Ahuja dan Dong, 2005).

Tabel 3 Data AUC Larutan Standar Laktosa

Konsentrasi (%)	AUC
2	136423,333
4	341440,333
6	565139,000
8	780048,000

10	981465,000
----	------------

Linearitas ditentukan melalui kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara respons dan konsentrasi analit (Ahuja dan Dong 2005). Kurva kalibrasi laktosa diplot antara area puncak dan konsentrasi. Luas puncak diperoleh dalam pengukuran 3 kali. Dari Tabel 3 dan Gambar 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi yang diperoleh untuk laktosa adalah $y = 106434,5500x - 77704,1667$ dengan koefisien regresi, $r^2 = 0,9997$. Koefisien fungsi regresi yang dihitung (V_{x0}) untuk laktosa adalah 0,3763. Persyaratan untuk linearitas adalah $r^2 \sim 1$ dan V_{x0} kurang dari 2%. Oleh karena itu, persyaratan untuk linearitas laktosa terpenuhi.



Gambar 1 Kurva Kalibrasi Larutan Laktosa

Batas deteksi (BD) adalah jumlah terendah yang dapat dideteksi sedangkan batas kuantifikasi (BK) adalah jumlah terendah yang dapat dikuantifikasi (David, 2005). Dari Tabel 4, BD dan BK yang dihitung dari kurva kalibrasi untuk laktosa adalah 0,00237 dan 0,00832. Dengan demikian, LOD dan LOQ untuk laktosa memiliki nilai lebih kecil dari nilai terendah dalam kisaran konsentrasi dalam kurva kalibrasi dalam nilai 2%.

Tabel 4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Laktosa

Y	136,423,333	341,440,333	565,139,000	780,048,000	981,465,000
Y'	135,164,933	348,034,033	560,903,133	773,772,233	986,641,333
(Y-Y') ²	1,258,400	6,593,700	4,235,867	6,275,767	5,176,333
$\Sigma(Y-Y')^2$	23,540,067				
Sy/x	88,582				
(Sy/x)/b	0,000833				
V _{x0}	0,376				
LOD	0,00237				
LOQ	0,00832				

Presi adalah kedekatan serangkaian pengukuran yang diperoleh dari pengukuran berulang. Parameter presisi tergantung pada koefisien variansi *intra* dan *interday*. Persentase koefisien variansi dianggap baik jika kurang dari 2% (Ahuja dan Dong, 2005). Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5, persentase koefisien variansi untuk waktu retensi *intra* dan *interday* dan AUC di bawah 2%.

Tabel 5 Hasil *Inter-day* and *Intra-day* Laktosa

Hari	t _R (min)	KV (%)	AUC	KV (%)	KV (t _R) Intra-day (%)	KV (AUC) Inter-day (%)
1	5,0467	0,4760	448427	1,9747	0,3844	1,6758
	5,0533		468321			
	5,0733		446880			
	5,0867		463821			
	5,0867		453229			
2	5,0267	0,3345	448999	1,6547		
	5,0557		449327			
	5,0445		467763			
	5,0633		445887			
	5,0776		455674			
3	5,0867	0,34258	453887	1,3981		
	5,0467		456880			
	5,0624		448431			
	5,0387		457301			
	5,0789		447867			
	5,0776	0,34258	464720	1,3981		
	5,0453		455364			
			451627			

Akurasi adalah kedekatan dari hasil yang diperoleh dan nilai sebenarnya. Akurasi dapat dinyatakan sebagai metode standar adisi (Ahuja dan Dong, 2005; Kazakevich and LoBrutto, 2007). Oleh karena itu, persentase perolehan kembali laktosa yang ditambahkan ke dalam susu sampel dapat dihitung, Presisi sampel ditentukan dengan menghitung persentase koefisien variansi dengan syarat kurang dari 2%.

Berdasarkan Tabel 6, persentase perolehan kembali laktosa menggunakan metode standar adisi berada pada rentang 99,018-101,408 %. Persentase koefisien variansi adalah 1,956. Dengan demikian, metode ini memenuhi persyaratan akurasi (Ahuja dan Dong, 2005),

Tabel 6 Hasil Pengujian Akurasi

C (%)	C'	Persen Perolehan Kembali (%)	Rata-rata persen perolehan kembali (%)	% KV
0,5	0,507±0,002	101,408±0,449		
1	1,030±0,012	102,942±1,210	101,222±1,977	1,956
1,5	1,485±0,0517	99,018±3,450		

Konsentrasi laktosa yang diperoleh dari sampel susu berperisa dibandingkan dengan konsentrasi pada label seperti yang ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7 Kadar Laktosa dalam Sampel

Sampel	Kadar Pengukuran (%)	Perisa	Kadar Label (%)
1	1,277±0,283	Coklat	1,50
2	1,094±0,013	Vanila	0,75

KESIMPULAN DAN SARAN

Kromatografi cair kinerja tinggi dapat digunakan untuk menentukan kadar gula dalam susu berperisa. Kondisi optimum untuk analisis adalah sebagai berikut: kolom fase terikat NH₂, 10µm (250mm × 4,6mm ID) dan suhu kolom pada suhu kamar, fase gerak terdiri dari asetonitril dan air (65:35), laju alir 1,0 mL / menit, detektor indeks bias, dan volume injeksi adalah 10µL. Verifikasi metode menunjukkan linearitas yang baik dari persamaan untuk laktosa $y = 106434,5500x - 77704,1667$ dengan koefisien regresi, r² dari 0,9997, Koefisien fungsi regresi yang dihitung (Vx0) untuk laktosa adalah 0,3763, Persentase perolehan kembali laktosa menggunakan metode standar adisi berada pada rentang 99,018-101,408 %. Sampel 1 mengandung laktosa 1,277±0,283 dan sampel 2 mengandung 1,094±0,013

DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja S and Dong MW, 2005, Handbook of Pharmaceutical Analysis by High Performance Liquid Chromatography, 6th ed., Elsevier Academic Press, London, 19-45.
- Damayanti S, Permana B, Weng CC, 2012, Determination of Sugar Content in Fruit Juices

Using High Performance Liquid Chromatography, Vol 37, No 4.

- David GW, 2005, Pharmaceutical Analysis, 2nd ed, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, 1-17 and 267-314.
- Deng Y, Misselwitz B, Dai N, Fox M, 2015, Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management, Nutrients, 2015 Sep; 7(9): 8020–8035, doi: 10.3390/nu7095380.
- Mangan D, McCleary BV, Culleton H, Cornaggia C, Ivory R, McKie VA, Delaney E, Kargelis T, 2018, A Novel Enzymatic Method for The Measurement of Lactose in Lactose-Free Products, J, of The Sci. of Food and Agric, DOI 10.1002/jsfa,9317.
- Ellefson W, 2002, Current Protocols in Food Analytical Chemistry: High Performance Liquid Chromatography of Mono- and Disaccharide Using Refractive Index Detection, John Wiley & Sons Inc, E1,2,1–E1,2,9.
- Kazakevich Y, LoBrutto R, 2007, High Performance Liquid Chromatography for Pharmaceutical Scientists, 1st ed, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 459-495.
- Mattar R, Ferraz de Campos Mazo D, and Carrilho FJ, Lactose Intolerance: Diagnosis, Genetic, and Clinical Factors, Clin Exp Gastroenterol, 2012; 5: 113–121, doi: 10.2147/CEG,S32368.
- Perez AG, Olias R, Espada J, Olias JM, Sanz C, 1997, Rapid Determination of Sugars, Non-Volatile Acids, and Ascorbic Acid in Strawberry and Other Fruits, J, Agric, Food Chem, 45(9): 3545-3549.
- Mardiana M, Damayanti S, Ibrahim S, 2014, Pengaruh Penyiapan sample pada Pengembangan Metode Analisis Laktosa dalam Susu Formula Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Acta Pharmaceutica, Vol 39, No 1 & 2.