

**PENENTUAN KADAR GLUKOSA DAN FRUKTOSA PADA
MADU RANDU DAN MADU KELENGKENG DENGAN
METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

K. Ratnayani, N. M. A. Dwi Adhi S., dan I G. A. M. A. S. Gitadewi

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

ABSTRAK

Kadar gula penyusun madu menurut SII selama ini ditentukan berdasarkan total gula pereduksi sehingga belum bisa diketahui kadar masing-masing gula penyusun madu tersebut. Madu mengandung berbagai jenis gula pereduksi yaitu glukosa, fruktosa, dan maltosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar glukosa dan fruktosa dengan metode KCKT terhadap dua jenis madu dari jenis bunga yang berbeda.

Kondisi operasional KCKT diatur pada suhu kolom 80°C dan laju alir 1 mL/menit, menggunakan kolom metacarb 87C dan eluen air deionisasi. Deteksi dilakukan dengan menggunakan detektor indeks bias, dimana glukosa dan fruktosa dipisahkan pada waktu retensi masing-masing sekitar 6 dan 7 menit. Prosedur tersebut digunakan untuk penentuan kadar glukosa dan fruktosa pada sampel madu yaitu madu randu dan madu kelengkeng.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar glukosa pada madu randu adalah sebesar 27,13 % dan pada madu kelengkeng sebesar 28,09 %. Kadar fruktosa pada madu randu sebesar 40,99 % dan pada madu kelengkeng sebesar 40,03 %. Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing sampel yang diteliti memiliki kadar glukosa dan fruktosa yang sesuai dengan syarat mutu madu nasional dimana kandungan gula pereduksi (glukosa dan fruktosa) total adalah minimal 60%. Kadar gula pereduksi total pada madu randu adalah sebesar 68,12 % sedangkan pada madu kelengkeng sebesar 68,12 %.

Kata kunci : glukosa, fruktosa, maltosa, KCKT, Madu

ABSTRACT

Honey is composed of reducing sugars i.e. glucose, fructose, and maltose. The concentration of sugar honey is determined as total reducing sugars, so the concentration of each sugar which compose the honey is not known. The research aims to determine the concentrations of glucose and fructose of honey from different cotton tree honey and longan honey HPLC using.

The HPLC operational condition was as follows 80°C of column temperature and 1 mL/minutes of flow rate, using metacarb 87C column and deionized water as eluent. The detection was carried out by using refractive index detector, where glucose and fructose can be separated at retention times of 6 and 7 minutes.

The result of research showed that the concentration of glucose in cotton tree honey was 27.13 % and in longan honey was 28.09 %. the concentration of fructose in cotton tree honey was 40.99 % and in longan honey was 40.03 %. Thees results showed that the quality standard on the total concentration of reducing sugar (≥ 60 %) was met by both types of honey. The total concentration of reducing sugar of cotton tree honey was 68.12 % and of longan honey was 68.12 %.

Keywords : glucose, fructose, maltose, HPLC, honey

PENDAHULUAN

Sejak ribuan tahun yang lalu sampai sekarang ini, madu telah dikenal sebagai salah satu bahan makanan atau minuman alami yang mempunyai peranan penting dalam kehidupan dan kesehatan. Madu merupakan produk alam yang dihasilkan oleh lebah untuk dikonsumsi, karena mengandung bahan gizi yang sangat esensial. Madu bukan hanya merupakan bahan pemanis, atau penyedap makanan, tetapi sering pula digunakan untuk obat-obatan. Madu dapat digunakan untuk menghilangkan rasa lelah dan letih, dan dapat pula digunakan untuk menghaluskan kulit, serta pertumbuhan rambut (Purbaya, 2002; Murtidjo, 1991).

Madu dihasilkan oleh lebah madu dengan memanfaatkan bunga tanaman. Madu memiliki warna, aroma dan rasa yang berbeda-beda, tergantung pada jenis tanaman yang banyak tumbuh di sekitar peternakan lebah madu. Sebagai contoh madu mangga (rasa yang agak asam), madu bunga timun (rasanya sangat manis), madu kapuk/randu (rasanya manis, lebih legit dan agak gurih), madu lengkung (rasa manis, lebih legit dan aromanya lebih tajam). Selain itu dikenal pula madu buah rambutan, madu kaliandra dan madu karet (Sarwono, 2001; Suranto, 2004).

Madu yang baik harus dapat memenuhi ketentuan yang ditetapkan oleh Standar Industri Indonesia (SII) tahun 1977 dan 1985. Kadar yang sesuai dengan standar SII hanya mungkin terdapat pada madu murni, yaitu madu yang belum diberi campuran dengan bahan-bahan lain. Di pasaran dalam negeri, jaminan akan keaslian dan mutu madu masih belum ada, oleh karenanya kecurigaan akan kepalsuan madu selalu ada (Suranto, 2004; Sujatmaka, 1988).

Standar mutu madu salah satunya didasarkan pada kandungan gula pereduksi (glukosa dan fruktosa) total yaitu minimal 60 %. Sedangkan, jenis gula pereduksi yang terdapat pada madu tidak hanya glukosa dan fruktosa, tetapi juga terdapat maltosa dan dekstrin. Sementara itu proses produksi madu oleh lebah itu sendiri merupakan proses yang kompleks, sehingga kemungkinan besar terjadi perbedaan kadar dan komposisi gula pereduksi di antara berbagai jenis madu yang beredar di masyarakat.

Komposisi gula pereduksi tiap-tiap madu kemungkinan dapat mempengaruhi khasiat madu terutama dalam proses pengobatan (Purbaya, 2002; Jarvis, 1995).

Glukosa yang terdapat di dalam madu berguna untuk memperlancar kerja jantung dan dapat meringankan gangguan penyakit hati (lever). Glukosa dapat diubah menjadi glikogen yang sangat berguna untuk membantu kerja hati dalam menyaring racun-racun dari zat yang sering merugikan tubuh. Selain itu, glukosa merupakan sumber energi untuk seluruh sistem jaringan otot. Sedangkan, fruktosa disimpan sebagai cadangan dalam hati untuk digunakan bila tubuh membutuhkan dan juga untuk mengurangi kerusakan hati (Purbaya, 2002; Sarwono, 2001). Fruktosa dapat dikonsumsi oleh para penderita diabetes karena transportasi fruktosa ke sel-sel tubuh tidak membutuhkan insulin, sehingga tidak mempengaruhi keluarnya insulin. Di samping itu, kelebihan fruktosa adalah memiliki kemanisan 2,5 kali dari glukosa (Winarno, 1982; Lehninger, 1990).

Penentuan gula pereduksi selama ini dilakukan dengan metode pengukuran konvensional seperti metode osmometri, polarimetri, dan refraktometri maupun berdasarkan reaksi gugus fungsional dari senyawa sakarida tersebut (seperti metode Luff-Schorl, Seliwanoff, Nelson-Somogyi dan lain-lain). Hasil analisisnya adalah kadar gula pereduksi total dan tidak dapat menentukan gula pereduksi secara individual. Untuk menganalisis kadar masing-masing dari gula pereduksi penyusun madu dapat dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Metode ini mempunyai beberapa keuntungan antara lain dapat digunakan pada senyawa dengan bobot molekul besar dan dapat dipakai untuk senyawa yang tidak tahan panas (Gritter, *et al.*, 1991; Dira Swantara, 1995).

Penentuan kadar glukosa dan fruktosa dengan kromatografi ini juga harus mempertimbangkan berbagai hal antara lain pemilihan detektor, kolom, pemilihan eluen, laju alir eluen serta suhu kolom. Ini disebabkan karena hal-hal tersebut dapat mempengaruhi resolusi dari tiap-tiap komponen. Bila dua puncak kromatogram dari dua komponen

terpisah sempurna maka dikatakan resolusi dua komponen tersebut sempurna. Pemisahan masing-masing komponen dengan menggunakan alat KCKT harus dilakukan pada kondisi optimum. Pemisahan yang baik adalah bila kromatogram masing-masing komponen tidak saling tumpang tindih (Adnan, 1997; Noller, 1990).

Penelitian yang dilakukan oleh Dira Swantara (1995) menyatakan bahwa pemisahan dan analisis senyawa mono- dan disakarida pada madu dan bahan sejenis lainnya dapat dilakukan dengan menggunakan teknik KCKT. Kolom yang digunakan adalah μ Bondapak-NH₂ dan eluen campuran asetonitril:air (75 : 25) yang mengandung $1,0 \times 10^{-5}$ M etanolamin. Laju alir ditentukan pada 0,6 mL/menit menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 195 nm. Namun dalam penelitian tersebut tidak dilihat pengaruh suhu kolom terhadap pemisahan masing-masing komponen madu.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dipandang perlu dilakukan penelitian untuk menentukan kadar glukosa dan fruktosa dalam madu dari jenis bunga yang berbeda dengan metode KCKT. Sehingga kadar glukosa dan fruktosa dari kedua jenis madu tersebut dapat dibandingkan. Penentuan kadar dilakukan dengan mengatur laju alir eluen dan suhu kolom dengan menggunakan eluen air deionisasi, kolom Metacarb 87C dan dideteksi dengan menggunakan detektor indeks bias. Kadar glukosa dan fruktosa yang diukur adalah kadar dari dua jenis madu yang telah memenuhi ketentuan SII (kadar gula pereduksi minimal 60 %) yaitu madu kelengkeng dan madu randu. Madu-madu tersebut berasal dari satu merk tertentu yang beredar di masyarakat.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : air deionisasi, larutan standar glukosa 5 % dan larutan standar fruktosa 5 %. Sampel penelitian adalah madu randu dan madu kelengkeng yang telah memenuhi standar SII dari merk yang sama. Tiap jenis madu

digunakan dua buah sampel dan tiap sampel dilakukan pengukuran sebanyak dua kali.

Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Seperangkat alat KCKT (buatan ICI Instruments) yang dilengkapi dengan detektor indeks bias (Shodex RI SE-61) serta integrator merek Shimadzu CR6A Chromatopac; labu ukur 20 mL, 25 mL, 50 mL, pipet volume 1,0 mL, 2,5 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 2,5 mL, alat sentrifugasi, kertas saring 0,45 μ m.

Cara Kerja

Pembuatan Larutan Standar

Larutan standar glukosa dan fruktosa dibuat dengan konsentrasi masing-masing 5 % b/v. Adapun cara pembuatannya adalah sebagai berikut :

- Masing-masing senyawa (glukosa dan fruktosa) ditimbang sebanyak 1 g.
- Senyawa-senyawa tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 20 mL, kemudian ditambah aquades sampai tanda batas (kadar glukosa dan fruktosa masing-masing 5 % b/v)

Dari konsentrasi tersebut dapat dibuat campuran dengan konsentrasi masing-masing 1 % ; 0,5 % ; 0,25 % ; dan 0,125 % dengan cara :

- Campuran glukosa dan fruktosa 1 %.
Ke dalam labu ukur 50 mL, dipipet masing-masing 10,0 mL larutan fruktosa 5 %, ditambah 10,0 mL larutan glukosa 5 %. Ditambah dengan aquades sampai tanda batas.
- Campuran glukosa dan fruktosa 0,5 %.
Ke dalam labu ukur 50 mL, dipipet masing-masing 5,0 mL larutan fruktosa 5 % ditambah 5 mL larutan glukosa 5 %. Kemudian ditambah dengan aquades sampai tanda batas.
- Campuran glukosa dan fruktosa 0,25 %.
Ke dalam labu ukur 50 mL, dipipet masing-masing 2,5 mL larutan fruktosa 5 % ditambah 5 mL larutan glukosa 5 %. Kemudian ditambah dengan aquades sampai tanda batas.
- Campuran glukosa dan fruktosa 0,125%

Campuran glukosa dan fruktosa 0,25 % pada (c) dipipet 25,0 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Campuran tersebut ditambah dengan aquades sampai tanda batas.

Masing-masing campuran glukosa dan fruktosa tersebut disaring dengan kertas saring 0,45 µm.

Penentuan Kondisi KCKT untuk Pemisahan Glukosa dan Fruktosa

Kondisi analisis untuk penentuan kandungan glukosa dan fruktosa pada sampel madu adalah pada kondisi pemisahan yang terbaik. Kondisi tersebut tercapai jika hasil kromatogram masing-masing komponen tidak tumpang tindih satu dengan yang lain. Kromatogram yang tidak tumpang tindih tersebut salah satunya dapat dicapai dengan mengatur suhu kolom dan laju alir dari eluen. Kondisi pemisahan dapat ditentukan pada saat pengukuran larutan standar, di mana eluen yang digunakan adalah air deionisasi pada kolom metacarb 87C dan dideteksi dengan menggunakan detektor indeks bias.

Pembuatan Kurva Standar

Larutan standar glukosa dan fruktosa 0,125 % diinjeksikan sebanyak 20 µL dengan menggunakan *auto syringe injector*. Biarkan sampai semua komponen keluar dan terpisah dari kolom. Waktu retensi untuk masing-masing komponen (glukosa dan fruktosa) dicatat. Langkah tersebut diulangi dengan menginjeksikan 20 µL larutan standar glukosa dan fruktosa 0,25 % kemudian dengan larutan standar 0,5 % dan 1 %. Plot hubungan antara konsentrasi larutan standar dengan luas puncak dari masing-masing komponen. Hubungan antara konsentrasi dengan luas puncak dapat dibuat persamaan regresi liniernya yaitu $y = a + bx$, dimana :

$$a = \frac{\sum y - b \cdot \sum x}{n}$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Validasi Prosedur Analisis

a. Ketepatan

Ketepatan dari metode yang digunakan ditentukan dengan melakukan beberapa kali pengukuran konsentrasi dari senyawa standar dengan konsentrasi yang sama. Ketepatan dinyatakan dengan perbandingan antara nilai konsentrasi yang terukur dengan nilai konsentrasi yang sebenarnya. Dari data yang diperoleh dicari prosentase kesalahan relatifnya dengan rumus :

$$\%e = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100 \%$$

dimana : \bar{x} = konsentrasi rata-rata larutan standar terukur

μ = konsentrasi larutan standar (konsentrasi sebenarnya)

b. Ketelitian

Prosedurnya sama dengan prosedur ketepatan, kemudian data yang didapat dihitung simpangan bakunya (S_B) dan % koefisien variansi (K_V) dengan rumus :

$$S_B = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$K_V = \frac{S_B}{\bar{x}} \times 100 \%$$

dimana : S_B = Simpangan baku

K_V = Koefisien variansi

\bar{x} = Konsentrasi rata-rata larutan standar terukur

c. Batas Deteksi

Batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan kadar analit yang memberi signal sebesar signal blanko ditambah 3 kali simpang blanko.

$y = y_B + 3 s_B$

dimana : y_B = signal blanko

s_B = simpang baku blanko

Dari persamaan regresi yang telah dibuat, dapat dihitung batas deteksi untuk alat dengan mengasumsikan :

$$y_B = a$$

$$s_B = S_{y/x}$$

$$\text{dimana : } S_{y/x} = \left[\frac{\sum (Y_i - \hat{Y})^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

Penentuan Kadar Glukosa dan Fruktosa

Analisis Sampel

Masing-masing madu dipipet 0,5 mL dan diencerkan sampai volumenya tepat 50 mL kemudian disentrifugasi selama 30 menit. Sampel tersebut disaring dengan kertas saring 0,45 μm . Sampel diinjeksikan sebanyak 20 μL pada alat kromatografi dan sistem dibuat dengan kondisi pemisahan terbaik, semua komponen dibiarkan terpisah. Hasil yang diperoleh dilakukan uji kualitatif dan uji kuantitatif (Nur, *et al.*, 1992).

Perhitungan Kadar Glukosa dan Fruktosa

Kromatogram yang dihasilkan berupa puncak-puncak untuk setiap senyawa yang dianalisis. Luas area diukur secara otomatis oleh alat pengolah data. Uji kualitatif untuk komponen glukosa dan fruktosa dalam sampel dilakukan dengan mencocokkan waktu retensi dari masing-masing puncak pada kromatogram sampel dengan waktu retensi senyawa standar. Untuk uji kuantitatif, luas area komponen-komponen yang dianalisis diplot ke dalam persamaan regresi linier.

Uji Statistik

Untuk menguji ada tidaknya variasi yang nyata pada kadar glukosa dan fruktosa dari tiap sampel madu, maka akan dilakukan uji statistik BNT terhadap data hasil analisis (kadar glukosa dan fruktosa). Uji statistik dilakukan dengan menggunakan metode uji F.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah melibatkan pengamatan sifat kromatografi senyawa – senyawa standar secara individual yaitu glukosa dan fruktosa, yang dilanjutkan dengan pemisahan senyawa-senyawa standar tersebut dalam campurannya dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Kondisi-kondisi pemisahan diperoleh dari pengukuran senyawa-senyawa glukosa dan fruktosa tersebut kemudian diaplikasikan untuk penentuan kadar senyawa tersebut pada sampel madu randu dan madu kelengkeng.

Eluen yang digunakan adalah air deionisasi, di samping murah juga tidak beracun. Air deionisasi memiliki sifat kepolaran yang sesuai dengan karbohidrat dan ternyata dengan eluen tersebut pemisahan glukosa dan fruktosa menghasilkan resolusi yang baik. Penelitian ini menggunakan detektor indeks bias karena detektor tersebut sesuai untuk pemisahan komponen-komponen karbohidrat.

Kromatografi Campuran Senyawa Standar

Untuk kromatografi campuran senyawa standar, dipilih beberapa kondisi yang diharapkan dapat menghasilkan pemisahan glukosa dan fruktosa dengan resolusi yang baik.

Tabel 1. Hubungan antara laju alir dan waktu retensi dari masing-masing komponen

Komponen	Konsentrasi (%)	Laju Alir (mL/menit)	W_R (menit)
GLUKOSA	5	1	6,025
FRUKTOSA	5	1	7,822

Tabel 1 menunjukkan bahwa glukosa muncul sebagai puncak pada waktu retensi yang lebih cepat daripada fruktosa. Hal ini disebabkan karena adanya interaksi yang lebih kuat antara fruktosa (yang mengandung gugus keton) dengan fase diam daripada interaksi antara glukosa (yang mengandung gugus aldehid) dengan fase diam. Semakin mirip sifat kepolaran antara senyawa yang dipisahkan dengan fase

diam, maka interaksinya akan semakin kuat, sehingga waktu retensi dari senyawa tersebut akan semakin lama.

Penentuan Kondisi KCKT untuk Pemisahan Glukosa dan Fruktosa

Kondisi analisis untuk penentuan kandungan glukosa dan fruktosa pada sampel madu adalah pada kondisi pemisahan yang terbaik. Kondisi tersebut tercapai jika hasil kromatogram masing-masing komponen tidak tumpang tindih satu dengan yang lain. Kromatogram yang tidak tumpang tindih tersebut salah satunya dapat dicapai dengan mengatur suhu kolom dan laju alir dari eluen.

Tabel 2. Hubungan antara laju alir, suhu dan waktu retensi dari campuran senyawa standar (glukosa dan fruktosa)

Konsentrasi (%)	Laju Alir (mL / menit)	Suhu (°C)	W _R (menit)		Resolusi Pemisahan
			Glukosa	Fruktosa	
1	0,6	75	6,310	7,957	6,76
		80	6,522	7,895	5,40
	1	70	6,492	7,823	7,85
		80	6,212	7,793	9,32

Tabel 2 menunjukkan bahwa jika laju alir dipercepat atau suhu kolom ditingkatkan, maka komponen akan keluar sebagai puncak pada waktu retensi yang lebih pendek. Sedangkan jika laju alir diperlambat atau suhu kolom diturunkan, maka komponen akan keluar sebagai puncak pada waktu retensi yang lebih lama.

Penelitian ini dilakukan pada laju alir 1 mL/menit dengan suhu kolom 80°C karena pada saat tersebut diperoleh pemisahan yang baik. Kedua komponen (glukosa dan fruktosa) dapat terpisahkan satu dengan yang lain sampai garis alas. Pada kondisi ini glukosa dan fruktosa muncul pada waktu retensi yang relatif cepat daripada kondisi-kondisi lainnya sehingga memerlukan eluen yang tidak terlalu banyak sehingga lebih efisien. Selain itu, pada kondisi tersebut diperoleh resolusi yang terbaik.

Resolusi diartikan untuk menjelaskan bagaimana dua buah pita / puncak dapat terpisah satu sama lain. Bila dua puncak kromatogram dari dua senyawa terpisah sempurna maka dikatakan dua senyawa tersebut terpisah secara sempurna atau resolusi dua senyawa tersebut sempurna. Resolusi antara dua puncak merupakan fungsi dari tiga faktor yaitu : retensi, selektifitas, dan efisiensi kolom. Retensi dan selektifitas merupakan fungsi sifat kimia fasa gerak dan fasa diam. Retensi dapat dinyatakan melalui beberapa cara yakni waktu retensi absolut, waktu retensi terkoreksi atau faktor kapasitas. Selektifitas merupakan ukuran kemampuan fasa diam untuk membedakan dua senyawa. Efisiensi kolom merupakan ukuran seberapa luas pita-pita komponen menyebar dalam perjalanannya sepanjang kolom. Suatu kolom yang lebih efisien akan menghasilkan puncak yang lebih sempit dari kolom yang kurang efisien, untuk waktu retensi yang sama.

Penelitian yang dikerjakan oleh Dira Swantara (1995) menyatakan bahwa pemisahan dan analisis senyawa mono- dan disakarida pada madu dan bahan sejenisnya dapat dilakukan dengan teknik KCKT. Dalam penelitian tersebut, sampel madu diambil secara acak tanpa melihat jenis bunganya. Pada penelitian yang dilakukan, sampel madu adalah madu yang diambil dari jenis bunga yang berbeda yaitu randu dan kelengkeng.

Kolom yang digunakan dalam penelitian ini adalah kolom Metacarb 87C dengan eluen air deionisasi. Kolom tersebut dipilih karena menggunakan eluen air deionisasi yang relatif murah dan tidak beracun. Penelitian sebelumnya menggunakan kolom μ Bondapak-NH₂ dan eluen campuran asetonitril:air (75 : 25) yang mengandung $1,0 \times 10^{-5}$ M etanolamin. Eluen yang digunakan pada penelitian tersebut relatif mahal. Selain itu dalam penelitian ini juga dilihat pengaruh suhu kolom dan laju alir, sedangkan dalam penelitian sebelumnya hanya dilihat pengaruh laju alir terhadap pemisahan masing-masing komponen.

Evaluasi Kuantitatif Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar untuk glukosa dan fruktosa disiapkan dengan pengukuran luas area

kromatogram dari masing-masing senyawa standar yang diperoleh dengan menyuntikkan larutan standar campuran pada sistem kromatografi yang bekerja pada kondisi pemisahan terbaik. Sistem kromatografi tersebut adalah sebagai berikut :

Kolom : Metacarb 87C
 Eluen : Air deionisasi
 Laju Alir : 1 mL / menit
 Suhu Kolom : 80°C
 Detektor : Indeks bias

Tabel 3. Data luas area dari kromatogram campuran glukosa dan fruktosa pada berbagai konsentrasi

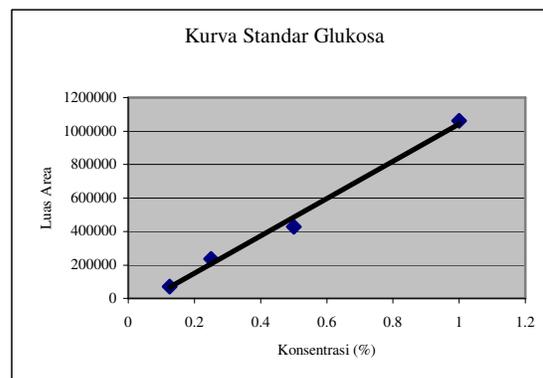
Konsentrasi (%)	Luas Area	
	Glukosa	Fruktosa
0,125	70940 ±	80924 ±
	1103,087	977,222
0,25	236790 ±	195161 ±
	958,837	881,055
0,5	428752 ±	351812 ±
	10431,946	749,533
1	1061880 ±	949714 ±
	2122,028	625,082

Berdasarkan data pada Tabel 3, maka dapat dihitung persamaan regresi linier untuk glukosa dan fruktosa. Persamaan regresi linier untuk glukosa dan fruktosa adalah sebagai berikut :

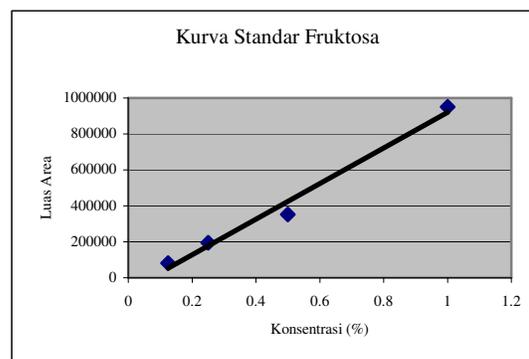
$$\text{Glukosa : } y = -73545,652 + 1116023,791 x \\ (r = 0,9960)$$

$$\text{Fruktosa : } y = -69966,565 + 990654,539 x \\ (r = 0,9918)$$

Dari persamaan regresi linier diatas, maka dapat dibuat kurva standar glukosa dan fruktosa yang disajikan pada Gambar 1. dan Gambar 2.



Gambar 1. Kurva Standar Glukosa



Gambar 2 Kurva Standar Fruktosa

Validasi Ketepatan dan Ketelitian

Serangkaian validasi metode analisis perlu dilakukan untuk menguji kestabilan dan validitas alat. Pengujian ini bertujuan agar hasil yang diperoleh dari suatu alat memiliki ketepatan dan ketelitian yang tinggi sehingga dalam mengambil kesimpulan menjadi tepat.

Ketepatan analisis dapat dilihat dari % kesalahan relatif suatu analisis, dimana % kesalahan relatif untuk glukosa adalah 1,76 %, sedangkan untuk fruktosa dengan cara yang sama diperoleh nilai % kesalahan relatif sebesar 2,95 %. Ini berarti data yang diperoleh berdasarkan hasil pengukuran telah memenuhi kriteria ketepatan analisis, dimana prosentase kesalahan relatif (%e) ≤ 5 %⁽²⁰⁾. Ketelitian analisis dapat dilihat dari nilai simpangan baku dan % koefisien variansi. Nilai simpangan baku untuk glukosa adalah $1,437 \times 10^{-3}$ dan untuk fruktosa adalah

$4,950 \times 10^{-4}$. Sedangkan nilai prosentase koefisien variansi untuk glukosa adalah 0,1412 % dan untuk fruktosa adalah 0,0481%. Hal ini menunjukkan bahwa data yang diperoleh

berdasarkan hasil pengukuran telah memenuhi kriteria ketelitian analisis, di mana prosentase koefisien variansi ($\% K_V \leq 5 \%$ (Day dan Underwood, 1993).

Tabel 4. Validasi Ketepatan dan Ketelitian

Komponen	Konsentrasi (%)	Luas Area	Konsentrasi Rata-rata	% e	S _B	% K _V
Glukosa	1	1063380	1,0176	1,76	$1,437 \times 10^{-3}$	0,1412
		1060379				
		1062765				
Fruktosa	1	950156	1,0295	2,95	$4,950 \times 10^{-4}$	0,0481
		949272				
		950238				

Batas Deteksi

Batas deteksi didefinisikan sebagai kadar analit terendah yang dapat menghasilkan signal sebesar signal blanko ditambah tiga kali simpang bakunya.

Pengukuran batas deteksi dengan menggunakan detektor indeks bias untuk glukosa dan fruktosa masing-masing sebesar 0,104 % dan 0,136 %. Ini berarti bahwa kadar glukosa terendah yang dapat dideteksi oleh alat KCKT yang digunakan adalah sebesar 0,104 %. Sedangkan untuk fruktosa, kadar terendah yang dapat dideteksi oleh alat KCKT adalah 0,136 %.

Analisis Kadar Glukosa dan Fruktosa Pada Sampel Madu

(a) Perlakuan Sampel

Sampel madu yaitu madu kelengkeng dan madu randu dipipet sebanyak 0,5 mL. Sampel diencerkan sampai volumenya 50 mL. Sampel disentrifugasi selama 30 menit. Tujuan dari sentrifugasi adalah untuk memisahkan komponen yang larut dalam air dengan yang tidak larut dalam air. Hasil dari sentrifugasi adalah terbentuknya dua lapisan. Lapisan atas diambil dan dilakukan penyaringan dengan kertas saring 0,45 μm . Filtrat hasil penyaringan

kemudian diambil 20 μL dan disuntikkan ke alat KCKT.

(b) Pola Kromatogram Sampel

Kromatogram-kromatogram sampel madu mempunyai pola yang sederhana. Pada kondisi kromatografi yang digunakan, senyawa standar glukosa dan fruktosa keluar sebagai puncak dengan waktu retensi masing-masing 6,212 menit dan 7,793 menit.

Berdasarkan pola kromatogram sampel yang dianalisis, terlihat bahwa pemisahan glukosa dan fruktosa dalam sampel madu dapat dilakukan dengan baik. Pada kromatogram juga terlihat adanya komponen-komponen lain yang kemungkinan merupakan sakarida-sakarida lain yang juga menyusun madu seperti sukrosa, maltosa, laktosa dan karbohidrat lainnya. Namun keberadaan komponen lain tersebut tidak mengganggu identifikasi komponen utama.

(c) Analisis Kuantitatif (Kadar Glukosa dan Fruktosa)

Hasil perhitungan konsentrasi glukosa dan fruktosa dalam sampel madu disajikan pada Tabel 5 berikut.

Tabel 5. Kadar glukosa dan fruktosa dalam sampel madu

Sampel Madu	Kadar (%)	
	Glukosa	Fruktosa
R ₁	27,57 ± (3,53x10 ⁻⁴)	41,62 ± (7,07x10 ⁻⁵)
R ₂	27,04 ± (4,60x10 ⁻³)	40,37 ± (1,41x10 ⁻⁴)
Rata-rata	27,13	40,99
K ₁	28,23 ± (1,41x10 ⁻⁴)	41,26 ± (1,41x10 ⁻⁴)
K ₂	27,94 ± (2,83x10 ⁻⁴)	38,79 ± (5,66x10 ⁻⁴)
Rata-rata	28,09	40,03

Keterangan :

R₁ = Madu randu (sampel 1)

R₂ = Madu randu (sampel 2)

K₁ = Madu kelengkeng (sampel 1)

K₂ = Madu kelengkeng (sampel 2)

Hasil pada Tabel 5 terlihat bahwa pada semua sampel madu, kadar fruktosa lebih tinggi daripada glukosa. Jika dilihat dari nilai rata-rata kadar glukosa, maka kadar glukosa pada madu kelengkeng lebih tinggi daripada madu randu. Sedangkan nilai rata-rata kadar fruktosa pada madu randu lebih tinggi daripada kadar fruktosa pada madu kelengkeng. Ini berarti bahwa madu randu memiliki rasa yang lebih manis daripada madu kelengkeng karena fruktosa memiliki kemanisan 2,5 kali dari glukosa.

Pada ketentuan SII ditetapkan bahwa kadar gula pereduksi (glukosa dan fruktosa) total minimal 60 %. Tabel 5 menunjukkan bahwa sampel madu yang dianalisis telah memenuhi ketentuan SII, dimana kadar gula pereduksi total pada madu randu sebesar 68,12 % dan pada madu kelengkeng sebesar 68,12 %. Pada madu palsu, madu tersebut tidak memenuhi ketentuan SII, seperti kadar air yang cukup tinggi, kadar sukrosa yang melebihi ketentuan atau total gula pereduksi yang kurang dari 60 %. Hal ini disebabkan karena pada madu palsu sering dilakukan pengenceran atau ditambah dengan komponen lain seperti pemanis buatan, gula

pasir, dan pewarna makanan. Pada beberapa kasus madu palsu, kadar total gula pereduksi (glukosa dan fruktosa) masih dapat memenuhi ketentuan SII. Ini disebabkan karena jika proses penyimpanan madu cukup lama, maka sukrosa yang terdapat pada madu akan mengalami peruraian membentuk glukosa dan fruktosa.

Penelitian yang dilakukan oleh Dira Swantara (1995) menunjukkan bahwa kadar total glukosa dan fruktosa pada madu diperoleh sekitar 79 %, dimana kadar fruktosa lebih besar daripada kadar glukosa. Penelitian tersebut juga melihat kadar sukrosa dari masing-masing sampel. Namun, kadar sukrosa jauh lebih rendah daripada glukosa dan fruktosa. Pada beberapa madu yang diduga palsu, ternyata kadar sukrosa lebih tinggi daripada kadar glukosa dan fruktosa.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Pemisahan dan analisis kadar glukosa dan fruktosa pada madu randu dan madu kelengkeng dapat dilakukan menggunakan teknik KCKT. Kolom yang digunakan adalah kolom metacarb 87C dengan eluen air deionisasi. Kondisi operasional yang terbaik diperoleh pada suhu kolom 80°C dan laju alir 1 mL/menit dengan menggunakan detektor indeks bias.
2. Kadar glukosa pada madu randu adalah sebesar 27,31 % dan pada madu kelengkeng sebesar 28,09 %. Sedangkan kadar fruktosa pada madu randu sebesar 40,99 % dan pada madu kelengkeng sebesar 40,03 %.
3. Kadar glukosa dan fruktosa dari tiap-tiap sampel madu telah memenuhi syarat mutu madu nasional (SII) dimana kadar gula pereduksi total pada madu randu sebesar 68,12 % dan pada madu kelengkeng sebesar 68,12 %.

Saran

Sesuai hasil penelitian, dapat dikemukakan saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kandungan senyawa sakarida lain selain glukosa dan fruktosa dalam madu seperti sukrosa, maltosa, dan laktosa.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai syarat mutu madu selain glukosa dan fruktosa untuk menentukan kualitas madu seperti enzim, dan kadar dekstrin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Drs. I Wayan Suarsa, M.Si., Ibu Sri Rahayu Santi, S.Si., M.Si., dan Bapak I Wayan Sudiarta, S.Si., M.Si. atas saran dan kerjasamanya dalam penyelesaian tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M., 1997, *Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan*, Edisi Pertama, Andi, Yogyakarta
- Day, R. A. dan A. L. Underwood, 1993, *Quantitative Analysis*, Sixth Edition, Prantice-Hall of India Private Limited, New Delhi
- Dira Swantara, I M., 1995, *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Beberapa Senyawa Mono- dan Disakarida Serta Penerapannya Untuk Analisis Madu dan Bahan Jenis Lainnya*, *Tesis*, Universitas Padjadjaran, Bandung
- Gritter, R. J., Bobbit, J. M., Schwarting, A. E., 1991, *Pengantar Kromatografi*, Edisi Kedua, a.b. Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung
- Jarvis M. D. D. C., 1995, *Pengobatan Tradisional Dengan Madu dan Apel / Folk Medicine*, Pionir Jaya, Bandung
- Lehninger, A. L., 1990, *Dasar-dasar Biokimia*, Jilid I, a.b. M. T. Awidjaja, Erlangga, Jakarta
- Murtidjo, B. A. , 1991, *Memelihara Lebah Madu*, Kanisius, Yogyakarta
- Nollet, L. M. L., Ed, 1990, *Food Analysis by HPLC*, Industriële Huges School Van Heet, Gemeen Schap Sonder Wijs, C. T. L., Marcel Dekker Inc., Printed in USA, p. 257-271
- Nur, M. A., Juwana H. A., dan Kosasih, 1992, *Teknik Laboratorium*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, IPB Bogor
- Purbaya, J. R. ,2002, *Mengenal dan Memanfaatkan Khasiat Madu Alami*, Pionir Jaya, Bandung
- Sarwono, B. , 2001, *Kiat Mengatasi Permasalahan Praktis Lebah Madu*, Agromedia Pustaka, Tangerang.
- Sujatmaka, 1988, *Menghasilkan Madu Berkualitas Tinggi*, *Trubus*, 4 (I) : 24-25
- Suranto, A. , 2004, *Khasiat dan Manfaat Madu Herbal*, Agromedia Pustaka, Tangerang
- Winarno, F. G. , 1982, *Madu Teknologi, Khasiat dan Analisa*, Ghalia Indonesia, Bogor