

METODE ANALISIS BAHAN PANGAN DAN KOMPONEN BIOAKTIF



Dr. Ir. Rina Yenrina, MSi.



METODE ANALISIS BAHAN PANGAN DAN KOMPONEN BIOAKTIF

Tahap analisis adalah tahap yang paling penting baik dalam kegiatan penelitian maupun pengawasan mutu, kesalahan pada tahap ini dapat mengakibatkan kesalahan interpretasi sehingga akan sangat merugikan bagi perkembangan ilmu maupun dalam penilaian suatu bahan pangan.

Bahan pangan mengandung enam komponen zat gizi utama yaitu: karbohidrat, lemak, protein, vitamin, mineral dan air serta komponen lain yang tidak termasuk gizi diantaranya adalah komponen bioaktif. Komponen zat gizi terdiri dari bermacam-macam jenis.. Komponen penyusun dari bahan pangan perlu diketahui baik jumlah maupun jenisnya dengan melakukan analisis.

Metode analisis yang disajikan pada buku ini dipilih yang cukup sederhana, disesuaikan dengan alat-alat laboratorium yang tersedia, namun tetap memenuhi kaidah-kaidah analisis. Buku ini merupakan penyempurnaan dari buku sebelumnya yaitu Metode Analisis Bahan Pangan dengan penambahan metode analisis bahan penyusun lemak, asam amino, komponen bioaktif dan uji indeks glikemik.

Penambahan ini disesuaikan dengan kebutuhan dan perkembangan yang dirasa perlu.



Andalas University Press

Jalan Situjuh No.1 Padang - 25129, Tlp / Fax. (0751) 27066
email : cebitunand@gmail.com
facebook : AU PRESS (Andalas University Press)

ISBN 9786026953056



9 786026 953056

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

Dr. Ir. Rina Yenrina, M.Si.



Andalas University Press

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

Penulis :

Dr. Ir. Rina Yenrina, MSi.

Reviewer :

Deivy Andhika Permata, S.Si., M.Si

Ilustrasi Sampul dan Penata Isi :

Dyans Fahrezionaldo

Safri Y

Hak Cipta pada Penulis

Dicetak dan Diterbitkan oleh :

Andalas University Press

Jl. Situjuh No. 1, Padang 25129, Telp/Faks. : 0751-27066

email : cebitunand@gmail.com

facebook : AU Press (Andalas University Press)

Anggota :

Asosiasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia (APPTI)

Cetakan :

I. Padang, 2015

ISBN : 978-602-6953-05-6

Hak Cipta dilindungi Undang Undang.

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebahagian atau seluruh isi buku tanpa izin tertulis dari penerbit.

Isi di luar tanggung jawab percetakan

Ketentuan Pidana Pasal 72 UU No. 19 Tahun 2002

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp. 1.000.000.- (satu juta rupiah) atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 5.000.000.000.- (lima milyar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1), dipidana dengan pidana penjara lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000.- (lima ratus juta rupiah).

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan karunia-Nya penulisan buku Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif ini dapat penulis susun, buku ini merupakan hasil revisi dan penyempurnaan dari buku sebelumnya yaitu Metode Analisis Bahan Pangan. Buku ini penulis harapkan dapat dimanfaatkan sebagai bahan kuliah dan praktikum pada mata kuliah yang berkaitan dengan analisis bahan pangan di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Andalas Padang dan di Perguruan Tinggi lainnya.

Metode analisis yang disajikan pada buku ini dipilih yang cukup sederhana, disesuaikan dengan alat-alat laboratorium yang tersedia, namun tetap memenuhi kaidah-kaidah analisis. Buku ini merupakan penyempurnaan dari buku sebelumnya dengan penambahan metode analisis bahan penyusun lemak, asam amino, komponen bioaktif dan uji indeks glikemik. Penambahan ini disesuaikan dengan kebutuhan dan perkembangan yang dirasa perlu.

Penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Dr. Febrin Anas Ismail selaku PR I yang telah memfasilitasi terbitnya buku ini, Bapak Prof. Dr. Ir. Santosa, MS selaku Dekan Fateta, Bapak. Ir. Sahadi Didi Ismanto, MS. selaku Ketua ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Bapak Deivy Andhika Permata, S.Si., M.Si atas kesediaan beliau sebagai editor buku ini. Terima kasih kepada Sdr. Rita Try Wahyuni, STP yang telah membantu penulis dalam penulisan.

Dalam penulisan buku ini penulis telah berusaha melengkapi semaksimal mungkin, walaupun demikian penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu kritik dan saran dari pemakai buku ini penulis harapkan untuk perbaikan selanjutnya. Terima kasih

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR LAMPIRAN	vi
I. PENDAHULUAN	1
II. PENETAPAN KADAR AIR	3
A. Metode Oven	3
B. Metode Oven Vakum	5
C. Metode Destilasi	7
D. Penetapan Kadar Air dengan Alat Pengukur Secara Langsung (Moisture Meter)	9
III. PENETAPAN KADAR ABU DAN MINERAL	11
A. Penetapan Total Abu	11
B. Persiapan Sampel untuk Penetapan Mineral	12
C. Penetapan Kalsium	17
D. Penetapan Magnesium	19
E. Penetapan Besi	21
IV. PENETAPAN KADAR KARBOHIDRAT	23
A. Penetapan Kadar Karbohidrat <i>by different</i>	23
B. Persiapan Sampel untuk Penetapan Karbohidrat	24
C. Penetapan Total Gula	27
D. Penetapan Kadar Pati dengan Metode <i>Luff Schoorl</i>	31
E. Penetapan Kadar Amilosa	33
F. Penetapan Kadar Laktosa	35
G. Penetapan Kadar Pektin	36
V. PENETAPAN SERAT KASAR DAN SERAT MAKANAN	39
A. Penetapan Serat Kasar	39
B. Penetapan Serat Makanan	40
VI. PENETAPAN KADAR LEMAK	45
A. Metode Ekstraksi Soxhlet	45
B. Metode Babcock	47

C.	Metode Modifikasi Babcock	49
D.	Metode Hidrolisis Asam	50
E.	Analisis Komposisi Asam Lemak Penyusun Lemak atau Minyak	53
VII.	PENETAPAN KADAR PROTEIN	57
A.	Metode Mikro Kjeldahl	57
B.	Metode Biuret	62
C.	Metode Lowry	65
D.	Analisis Asam Amino	68
VIII.	PENETAPAN VITAMIN	75
A.	Vitamin C (Asam Askorbat)	75
B.	Vitamin A (Beta Karoten)	81
IX.	PENETAPAN pH DAN TOTAL ASAM	93
A.	Pengukuran pH	93
B.	Penetapan Total Asam Titrasi	97
C.	Penetapan Total Asam Volatil	101
X.	PENETAPAN BAHAN PENYEGAR DAN KOMPONEN BIOAKTIF	103
A.	Penetapan Kadar Kafein	103
B.	Penetapan Kadar Theobromin	105
C.	Penetapan Kadar Tanin	106
D.	Penetapan Kadar Nikotin	108
E.	Penetapan Kadar Asam Pitat	110
F.	Penetapan Aktifitas Antioksidan	112
G.	Penetapan Flavonoid	114
H.	Penetapan Saponin	114
XI.	PENETAPAN BAHAN TAMBAHAN PANGAN	115
A.	Penetapan Kadar Garam (Metode Volhard)	115
B.	Penetapan Kadar Garam (Modifikasi Metode Mohr)	117
C.	Penetapan Kadar Nitrit	118
D.	Penetapan Asam Sulfit dalam Buah-buahan Kering (Metode Kalorimetri)	121
E.	Penetapan Kualitatif Formalin	122
F.	Penetapan Boraks	125

G. Pengujian Kualitatif Bahan Pengawet dan Bahan Pemanis Sintetik	129
H. Pengujian Kuantitatif Natrium Benzoat secara Kuantitatif	133
I. Penetapan Zat warna Sintetis	136
XII. PENETAPAN INDEKS GLIKEMIK PANGAN	139
DAFTAR PUSTAKA	141
SEKILAS TENTANG PENULIS	159

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Percobaan Penetapan Keasaman	142
Lampiran 2. Percobaan Penetapan Kadar Gula	143
Lampiran 3. Larutan Pereaksi	146
Lampiran 4. Pembuatan Larutan Pereaksi	148
A. Pembuatan larutan Sorensen dan larutan NaOH 0.1 N	148
B. Penetapan titar larutan NaOH 0.1 N	148
C. Pembuatan dan penetapan titar HCl 0.1 N dengan boraks sebagai bahan baku	149
D. Pembuatan dan penetapan titar larutan KMnO_4 0.1 N dengan asam oksalat sebagai bahan baku	150
E. Pembuatan dan penetapan titar thio 0.1 N	151
F. Pembuatan larutan Luff	151
G. Pembuatan larutan Pb-asetat setengah basa	152
H. Pembuatan larutan dye	152
I. Pembuatan larutan $\text{NH}_2\text{OH} - \text{HCl}$ 2% (Hidroksilamin chlorrid)	152
J. Pembuatan larutan buffer asetat	152
K. Pembuatan larutan pereaksi ammonium molibdat	153
L. Pembuatan larutan dipiridil 0.1 %	153
M. Pembuatan larutan KOH dalam etanol 10%	153
N. Pembuatan ammonium nitrat 50%	153
Lampiran 5. Pembuatan Indikator – indikator	154
Lampiran 6. Tabel Luff Schrool	155
Lampiran 7. Alat – alat	156

I

PENDAHULUAN

Bahan pangan mengandung enam komponen zat gizi utama yaitu: karbohidrat, lemak, protein, vitamin, mineral dan air serta komponen lain yang tidak termasuk gizi diantaranya adalah komponen bioaktif. Komponen zat gizi terdiri dari bermacam-macam jenis. Komponen penyusun dari bahan pangan perlu diketahui baik jumlah maupun jenisnya dengan melakukan analisis.

Tahap analisis adalah tahap yang paling penting baik dalam kegiatan penelitian maupun pengawasan mutu, kesalahan pada tahap ini dapat mengakibatkan kesalahan interpretasi sehingga akan sangat merugikan bagi perkembangan ilmu maupun dalam penilaian suatu bahan pangan.

Dalam suatu penelitian sering didapatkan hasil yang tidak memuaskan seperti :1. Data hasil penelitian yang jauh menyimpang dari data hasil penelitian yang telah dilakukan orang lain sebelumnya atau tidak rasional, 2. Perbedaan hasil yang sangat jauh antara ulangan atau antara duplo dan trio, 3. Perbedaan perlakuan yang diterapkan tidak dapat dipolakan.

Kesalahan yang sering dilakukan dalam analisis dapat bermacam-macam diantaranya: 1. Kesalahan dalam pengambilan contoh, 2. Kesalahan dalam pembuatan dan pereaksi-pereaksi yang digunakan, 3. Kesalahan dalam penerapan metode analisis, 4. Kesalahan dalam pengerjaan.

Hal penting yang perlu ditekankan untuk mengurangi kesalahan yang mungkin terjadi adalah: 1. Cara-cara pengambilan contoh dan persiapan sampel yang benar, 2. Ketepatan analisis, 3. Pemilihan metode yang tepat. Untuk itu perlu pengetahuan dari buku buku lainnya, latihan dan pengalaman dalam menganalisis, perbandingan beberapa metode analisis untuk menentukan metode analisis yang akurat, sederhana dan dapat disesuaikan dengan kondisi laboratorium yang tersedia.

II PENETAPAN KADAR AIR

A. Metode Oven (Sudarmadji, 1984)

Pendahuluan

Penetapan kadar air merupakan cara untuk mengukur banyaknya air yang terdapat di dalam suatu bahan pangan. Metode pengeringan dengan metode oven ini berprinsip pada pengukuran kehilangan berat akibat menguapnya air dari bahan yang dikeringkan pada suhu sekitar 100°C. Metode ini digunakan untuk seluruh bahan pangan, kecuali jika produk tersebut mengandung komponen-komponen yang mudah menguap atau jika produk tersebut akan mengalami dekomposisi pada pemanasan 100°C.

Prinsip

Sampel dikeringkan dalam oven bersuhu 100°C – 102°C sampai diperoleh berat yang tetap

Bahan dan Alat

1. Oven dengan kisaran suhu 100°C - 102°C,
2. Cawan (stainless steel, aluminium, nikel, atau porselen), untuk bahan-bahan yang memberikan efek korosif jika dikeringkan sebaiknya tidak menggunakan cawan logam
3. Desikator,
4. Penjepit cawan,
5. Timbangan analitik.



Gambar 1. Oven

Prosedur Kerja

1. Cawan kosong dan tutupnya dikeringkan dalam oven selama 10 menit kemudian didinginkan dalam desikator selama 10 menit kemudian ditimbang. (untuk cawan porselen dikeringkan selama 20 menit) (= W_0 gram gram)
2. Timbang kira-kira 5 gram sampel dalam cawan tersebut, sampel disebarakan merata (= W_1 gram)
3. Tempatkan cawan beserta isi dan tutupnya di dalam oven selama 6 jam. Hindarkan kontak antara cawan dengan dinding oven.
4. Angkat cawan beserta isi dan didinginkan dalam desikator kemudian timbang (= W_2 gram)
5. Keringkan kembali dalam oven dan timbang sampai diperoleh bobot tetap.

Perhitungan

$$\text{Kadar Air (\% Wet basis)} = \frac{W_1 - (W_2 - W_0)}{W_1} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Air (\% Dry basis)} = \frac{W_1 - (W_2 - W_0)}{(W_2 - W_0)} \times 100\%$$

$$\text{Total Solid (\%)} = \frac{(W_2 - W_0)}{W_1} \times 100\%$$

B. Metode Oven Vakum (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

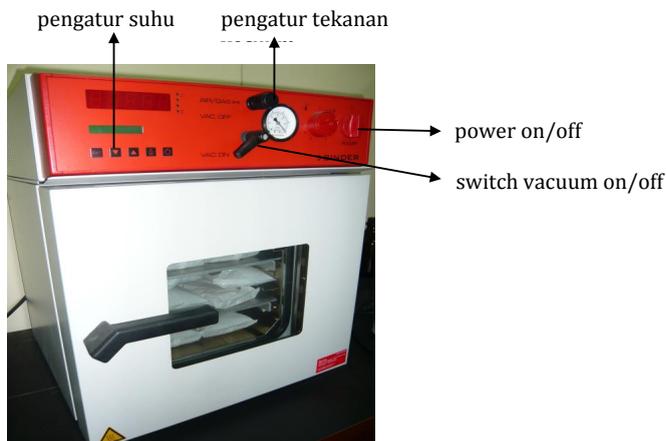
Penetapan kadar air dengan menggunakan oven vakum dapat dilakukan untuk produk-produk makanan yang mengandung komponen-komponen yang dapat terdekomposisi pada pemanasan 100^oC (misalnya bahan yang mengandung kadar gula tinggi). Oleh karena itu disarankan untuk menurunkan suhu pengeringan menjadi sekitar 70^oC.

Prinsip

Beberapa produk yang terdekomposisi pada pemanasan 100^oC dapat dikeringkan pada temperatur lebih rendah dan tekanan udara yang dikurangi. Efisiensi dari metode ini tergantung pada pemeliharaan tekanan udara serendah mungkin di dalam oven dan pemindahan uap air secepatnya dari oven.

Peralatan

1. Oven vakum lengkap dengan pompa vakum, gelas pengaman pompa, dan botol pengering gas yang berisi H₂SO₄,
2. Cawan logam dan penutupnya,
3. Desikator,
4. Penjepit cawan,
5. Timbangan analitik.



Gambar 2. Oven Vakum

Prosedur Kerja

1. Keringkan cawan dan tutupnya dalam oven bersuhu 105^oC selama 30 menit, kemudian dinginkan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang, (= W_o gram)
2. Timbang 5 gram sampel dalam cawan diatas, (= W₁ gram)
3. Tempatkan cawan beserta isi dan tutupnya dalam oven vakum bersuhu 70^oC dengan tekanan vakum dipertahankan pada 25 mm Hg, lakukan pengeringan selama 6 jam.
4. Tutup aliran vakum ke pompa, (pompa jangan ditutup sebelum tekanan vakum dalam gelas pengaman dihilangkan, hal ini untuk mencegah oli vakum agar tidak terhisap ke dalam gelas)
5. Naikkan aliran udara kering yang melewati H₂SO₄ untuk menghilangkan tekanan vakum dalam oven,
6. Angkat cawan beserta isi didinginkan dalam desikator selama 15 menit, kemudian ditimbang, (= W₂ gram)
7. Lakukan pemanasan kembali sampai diperoleh berat yang tetap.

Perhitungan

$$\text{Kadar Air (\% Wet basis)} = \frac{W_1 - (W_2 - W_o)}{W_1} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Air (\% Dry basis)} = \frac{W_1 - (W_2 - W_o)}{(W_2 - W_o)} \times 100\%$$

$$\text{Total Solid (\%)} = \frac{(W_2 - W_o)}{W_1} \times 100\%$$



Gambar 3. Desikator dan neraca analitik

C. Metode Destilasi (Andarwawulan, 2011)

Pendahuluan

Penetapan kadar air dengan menggunakan metode ini dilakukan untuk bahan pangan yang mengandung lemak dan komponen-komponen volatil. Sampel yang akan dianalisa kadar airnya didestilasi dalam pelarut yang bersifat *immiscible* (tidak bercampur dengan air); mempunyai titik didih lebih tinggi daripada air; dan mempunyai berat jenis lebih rendah daripada air.

Prinsip

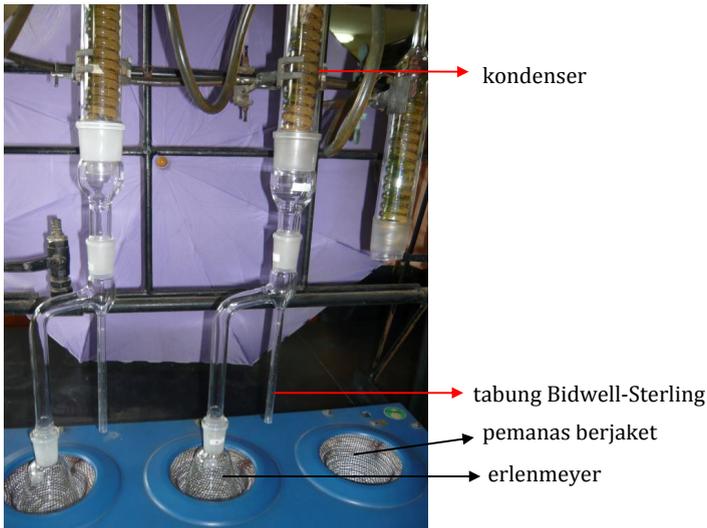
Air dikeluarkan dari sampel dengan cara destilasi azeotropik kontinyu dengan menggunakan pelarut. Air dikumpulkan dalam tabung penerima dan volume air yang terkumpul dapat diketahui dengan membaca skala yang terdapat pada tabung penerima. Karena berat jenis pelarut lebih rendah daripada berat jenis air, maka air akan selalu berada di bawah pelarut sedangkan pelarutnya akan kembali ke labu didih.

Peralatan

1. Pemanas berjaket,
2. Tabung penerima Bidwell-Sterling,
3. Kondensor tipe cold finger,
4. Labu didih.

Pereaksi

1. n - amyl alkohol : xilene = 1 : 2
2. Toluena
3. Xilene, atau pereaksi lain yang sesuai



Gambar 4. Rangkaian alat pengukuran kadar air metode destilasi

Prosedur Kerja

1. Persiapkan alat destilasi,
2. Persiapkan labu didih, atau erlenmeyer yang sudah dikeringkan dalam oven bersuhu 105^oC,
3. Timbang sampel secukupnya (5 – 7 gram), sehingga akan didapat air yang terkandung didalamnya sekitar 3 – 4 gram. (=W gram)
4. Masukkan sampel ke dalam labu didih diatas, kemudian ditambahkan 60 – 100 ml pereaksi (toluene atau lainnya),
5. Panaskan campuran tersebut dengan pemanas listrik (jangan menggunakan api) dan refluks perlahan-lahan dengan suhu rendah selama 45 menit, lalu naikan suhunya lebih tinggi selama 60 – 90 menit,

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

6. Baca volume air yang terdestilasi pada tabung Bidwell-Sterling, (= V)
7. Pereaksi dapat digunakan lagi setelah didestilasi kembali,

Perhitungan

Kadar air (%) = $V / W \times \text{Faktor Destilasi} \times 100\%$

V = volume air yang terdestilasi (ml)

W = Jumlah sampel yang ditimbang (gram)

Faktor destilasi diperlukan untuk memperoleh hasil yang lebih teliti,

1. Keringkan labu didih dan tabung Bidwell-Sterling, dan harus bebas dari lemak
2. Masukkan air sebanyak 4 gram (B) ke labu didih dan tambahkan toluena 60 ml,
3. Jumlah air yang terkandung dalam sample harus 10 ml
4. Refluks sampai seluruh air terdestilasi
5. Uap air yang ada pada bagian bawah kondensor dikumpulkan dengan menggunakan kawat atau thin glass rod sebelum dilakukan pembacaan jumlah yang terkumpul,
6. Baca volume air yang terdestilasi, (Va)
7. Faktor destilasi = B/Va

D. Penetapan Kadar Air dengan Alat Pengukur Secara Langsung (Moisture Meter) (Andarwulan, 2011)

Pendahuluan

Alat ini hanya dapat dipakai untuk menentukan kadar air padi, beras dan biji-bijian lainnya atau tepung yang mengandung air antara 12 – 30 % (tergantung dari merk alat)

Prinsip

Kadar air sampel ditentukan dengan menambah atau mengurangi persentasi yang ditunjukkan oleh temperatur kompensator dengan skala yang dibaca pada saat pengukuran sampel.

Peralatan

Moisture meter TS7 dan lainnya (aksesorinya)

Prosedur

1. Bersihkan alat sebelum dipakai
 - a. Bersihkan plate dan bagian dalam tempat plate dengan kuas yg tersedia
 - b. Bersihkan permukaan alat dengan lap kering
 - c. Periksa apakah batteray alat masih baik
2. Cocokkan alat-alat pengukur /tombol-tombol menurut angka yang semestinya
Contoh : jarum merah harus menunjukkan angka (nol) (disebelah kiri) sebelum dilakukan pengukuran sampel.
3. Lakukan pengukuran terhadap sampel.
 - a. Letakkan sejumlah sampel pada plate yang tersedia dengan pinset (jangan sampai dipegang dengan tangan)
 - b. Sampel disebarakan merata ada plate
 - c. Masukkan plate kedalam alat
 - d. Putar tombol ke kanan dan baca skala setelah jarum berhenti bergerak. Jika tombol distel kearah skala terendah maka baca skala yang terletak dibagian atas. Sebaliknya, jika tombol distel kearah skala tertinggi, maka baca skala yang terletak di bagian bawah.
 - e. Baca pula jarum tempetatur kompensator. Jika jarum ditengah pusat menunjukkan angka nol, dikiri minus dan dikanan plus. Kesalahan temperatur kompensator adalah $\pm 0,1\%$

Perhitungan

Skala yang terbaca pada pengukuran sampel (%) = X

Skala yang terbaca pada temperatur kompensatur (%) = Y

Persen kadar air sampel = (X - Y)

III

PENETAPAN KADAR ABU DAN MINERAL

A. Penetapan Total Abu (Andarwulan,2011)

Pendahuluan

Abu merupakan residu anorganik yang didapat dengan pengabuan atau memanaskan pada suhu tinggi $> 450^{\circ}\text{C}$ dan atau pendestruksian komponen-komponen organik dengan asam kuat. Residu anorganik ini terdiri dari bermacam-macam mineral yang komposisi dan jumlahnya tergantung pada jenis bahan pangan dan metode analisis yang digunakan.

Prinsip

Abu dalam bahan pangan ditetapkan dengan menimbang sisa mineral sebagai hasil pembakaran bahan organik pada suhu sekitar 550°C

Peralatan

1. Cawan pengabuan terbuat dari platina, nikel, atau silika, lengkap dengan tutupnya,
2. Hot plate
3. Tanur pengabuan,
4. Penjepit cawan

Prosedur Kerja

1. Siapkan cawan pengabuan, kemudian keringkan dalam tanur selama 15 menit, dinginkan dalam desikator, dan timbang ($=W_0$ gram)
2. Timbang sebanyak 3 - 5 gram sampel dalam cawan tersebut ($= W_1$ gram), untuk sampel cairan diuapkan terlebih dahulu diatas penangas air sampai kering.
3. Bakar di atas Hot plate sampai tidak berasap.
4. Kemudian letakkan dalam tanur pengabuan, bakar sampai didapat abu berwarna abu-abu atau sampai beratnya tetap.

Pengabuan dilakukan dalam dua tahap : pertama pada suhu sekitar 400°C dan kedua pada suhu 550°C.

5. Dinginkan dalam desikator, kemudian timbang (= W2 gram).

Perhitungan

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{(W2 - W_0)}{(W1 - W_0)} \times 100\%$$



Gambar 5. Tanur pengabuan

B. Persiapan Sampel untuk Penetapan Mineral

Pendahuluan

Untuk menentukan kandungan mineral bahan makanan, bahan tersebut harus dihancurkan / didestruksi terlebih dulu. Cara yang biasa dilakukan yaitu pengabuan kering (*dry ashing*) dan pengabuan basah (*wet digestion*). Pemilihan cara tersebut tergantung pada sifat zat organik dalam bahan, mineral yang akan dianalisa serta sensitivitas cara yang digunakan.

Pengabuan kering dapat diterapkan pada hampir semua analisa mineral kecuali merkuri dan arsen. Cara ini membutuhkan sedikit ketelitian dan mampu menganalisa bahan lebih banyak daripada pengabuan basah. Pengabuan kering dapat dilakukan untuk menganalisa kandungan Ca, P, dan Fe, akan tetapi kehilangan K dapat terjadi apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi. Oleh karena itu

untuk menganalisa K harus dihindari pemakaian suhu lebih tinggi dari 480°C. Suhu 450°C tidak dapat digunakan jika akan menganalisa kandungan Zn, penggunaan suhu yang terlalu tinggi juga akan menyebabkan beberapa mineral menjadi tidak larut (misal timah putih).

Pengabuan basah memberikan beberapa keuntungan. Suhu yang digunakan tidak dapat melebihi titik didih larutan dan pada umumnya karbon lebih cepat hancur daripada menggunakan cara pengabuan kering. Cara pengabuan basah pada prinsipnya adalah menggunakan asam nitrat untuk mendestruksi zat organik pada suhu rendah dengan maksud menghindari kehilangan mineral akibat penguapan. Pada tahap selanjutnya, proses seringkali berlangsung sangat cepat pengaruh asam perklorat atau hydrogen peroksida. Pengabuan basah pada umumnya digunakan untuk menganalisa arsen, tembaga, timah hitam, timah putih, dan seng.

Persiapan sampel untuk penetapan mineral dengan pengabuan kering (*dry ash*)

1. Timbang dengan tepat sampel sebanyak yang dikehendaki di dalam cawan silika yang telah diketahui beratnya.
2. Panaskan sampel di atas Hot plate atau pembakar Burner dengan api sedang untuk menguapkan sebanyak mungkin zat organik yang ada (sampai sampel tidak berasap lagi)
3. Pindahkan cawan ke dalam tanur dan panaskan pada suhu 300°C sampai semua karbon berwarna keabuan, kemudian naikan suhu sampai 420°C. Pada umumnya pengabuan dilakukan pada 450°C, waktu yang dibutuhkan tergantung pada sifat bahan, biasanya 5–7 jam (apabila dikehendaki penggunaan suhu rendah misalnya 420°C dengan waktu semalam).
4. Jika diperkirakan belum semua karbon teroksidasi ambil cawan dari dalam tanur dan dinginkan. Tambahkan 1 – 2 ml HNO₃ pekat, uapkan sampai kering dan masukkan lagi ke dalam tanur sampai pengabuan dianggap selesai.
5. Ambil cawan dari tanur, dinginkan, catat berat abu yang dihasilkan.

6. Tutup cawan dengan gelas arloji , perlahan-lahan tambahkan 40 – 50 ml HCl encer (1+1) dengan menggunakan pipet. Gelas arloji berfungsi untuk mencegah muncratnya campuran.
7. Panaskan cawan diatas waterbath selama 30 menit, angkat tutupnya dan bilas. Lanjutkan pemanasan selama 30 menit untuk mendehidrasi silica.
8. Tambahkan 10 ml HCl (1 + 1) dan air untuk melarutkan garam-garam.
9. Saring menggunakan kertas saring Whatman No. 44, masukan filtrat ke dalam labu takar 100 ml.
10. Bilas residu yang tertinggal dalam cawan 1 s.d 2 kali menggunakan HCl (1+1) , kemudian cuci residu yang tertinggal dalam kertas saring menggunakan HCl (1+1) juga.
11. Encerkan sampai tanda tera dengan menggunakan aquades.
12. Kembalikan kertas saring ke dalam cawan , baker dan abukan dalam tanur pada suhu 450°C selama 1 jam, kemudian dinginkan dan timbang. Perlakuan ini memberi perkiraan kandungan silika di dalam sampel.

Persiapan sampel untuk penetapan mineral dengan pengabuan basah (*wet digestion*)

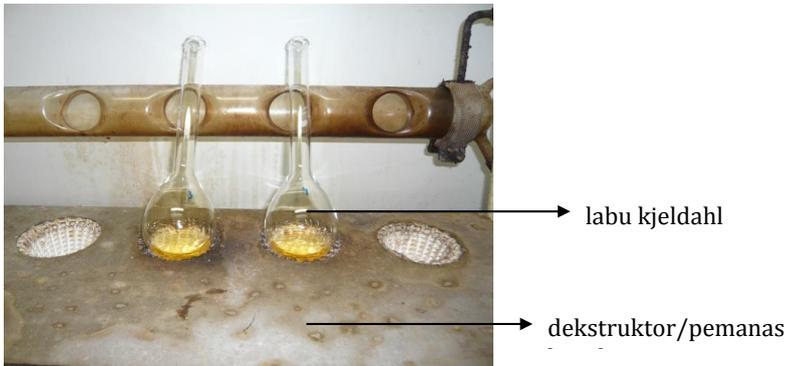
Peralatan

Gunakan labu kjeldahl berleher panjang kapasitas 300 ml dengan ground glass joint no. 1324. Hubungkan dengan extension untuk mengkondensasi uap ke dalam fume kondenser dan ditambah dengan side tap funnel untuk memasukkan pereaksi.

Untuk digestion gunakan mild steel rack bagian atasnya menggunakan asbestos dan berlubang untuk tempat labu. Leher labu disangga dengan penyangga disamping digestion stand. Extension harus masuk ke dalam fume kondenser.

Pereaksi

1. HNO₃ pekat
2. H₂SO₄ pekat
3. Asam perklorat
4. Hidrogen peroksida



Gambar 6. Proses dekstruksi pengabuan basah

Prosedur kerja

Ada tiga macam cara pengabuan basah yang dapat dilakukan, yaitu:

- Pengabuan basah menggunakan HNO_3 dan H_2SO_4 ,
- Pengabuan basah menggunakan HNO_3 , H_2SO_4 , dan HClO_4 ,
- Pengabuan basah menggunakan HNO_3 , H_2SO_4 , dan H_2O_2

Banyaknya sampel yang digunakan tergantung pada beberapa faktor. Apabila dikehendaki analisa satu macam mineral saja dianjurkan untuk menggunakan sample lebih sedikit dibandingkan dengan analisa lebih dari satu macam mineral. Kandungan mineral dalam bahan serta sensitivitas prosedur yang akan digunakan juga harus dipertimbangkan.

a. Pengabuan basah menggunakan HNO_3 dan H_2SO_4

- Timbang sejumlah sampel yang mengandung 5 - 10 gram padatan dan masukkan ke dalam labu kjedhal.
- Tambahkan 10 ml H_2SO_4 dan 10 ml HNO_3 dan beberapa buah batu didih
- Panaskan perlahan-lahan sampai larutan berwarna gelap, hindari pembentukan buih yang berlebihan.
- Tambahkan 1 - 2 ml HNO_3 dan lanjutkan pemanasan sampai larutan lebih gelap lagi.

5. Lanjutkan penambahan HNO_3 dan pemanasan selama 5 – 10 menit sampai larutan tidak gelap lagi (semua zat organik telah teroksidasi), kemudian dinginkan.
6. Tambahkan 10 ml aquades (larutan akan menjadi tidak berwarna atau menjadi kuning muda jika mengandung Fe) dan panaskan sampai berasap.
7. Dinginkan dan encerkan sampai volume tertentu.

Catatan :

1. Hindari pemanasan yang berlebihan yang mengakibatkan kekosongan untuk mencegah penguapan arsenat yang mungkin terdapat pada sampel
2. Jika menggunakan sampel basah (banyak mengandung air), panaskan lebih dulu dengan HNO_3 sebelum ditambah H_2SO_4 , perlakuan selanjutnya sama dengan jika menggunakan sampel padat.

b. Pengabuan basah menggunakan $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$

1. Timbang sejumlah sampel, masukan ke dalam labu kjeldhal
2. Tambahkan 4 ml asam perklorat (HClO_4), beberapa batu didih dan HNO_3 secukupnya untuk menyempurnakan oksidasi zat organik (kurang lebih 7 ml tiap gram sampel yang digunakan). Kemudian tambahkan pula 5 ml H_2SO_4 sampai diaduk perlahan.
3. Panaskan perlahan-lahan dengan panas rendah selama 5 – 10 menit, sampai timbul asap tebal.
4. Pindahkan/matikan pemanas/pembakar gas, dinginkan larutan
5. Panaskan lagi dengan panas rendah selama 5 – 10 menit sampai timbul asap H_2SO_4 putih tebal.
6. Besarkan panas/api dan lanjutkan pemanasan selama 1 – 2 menit. Larutan pada tahap ini tidak berwarna atau kuning muda jika mengandung Fe.
7. Jika diperkirakan masih ada karbonnya, tambah 1 – 2 ml HNO_3 dan panaskan
8. Dinginkan dan encerkan sampai volume tertentu dengan menggunakan aquades.

Catatan :

1. Pengabuan asam perklorat pada proses “*digestion*” dapat menyebabkan ledakan dan apabila digunakan dan apabila digunakan bersama-sama asam nitrat dan asam sulfat dapat menyebabkan ledakan yang lebih besar lagi, oleh karena itu cara ini sangat berbahaya dan harus dilakukan sangat hati-hati.
2. Kerjakan di dalam ruang asap yang terisolasi dengan baik
3. Gunakan masker pada waktu melakukan “*digestion*” di kamar asap.
4. Jangan naikan suhu pemanasan sampai oksidasi zat organik oleh HNO_3 dan H_2SO_4 selesai. Naikkan suhu pemanasan hanya untuk memberi kesempatan agar asam perklorat bereaksi.
5. Pada waktu pemanasan , jangan sampai kering, paling tidak 2–3 ml H_2SO_4 selalu terdapat dalam labu (untuk menghindari kekurangan asam dan titik didih yang tinggi setelah HNO_3 habis). Jika tidak ada H_2SO_4 , pemanasan dapat menyebabkan terurainya Amonium perklorat yang disertai dengan ledakan.

c. Pengabuan basah dengan menggunakan H_2SO_4 , HNO_3 dan H_2O_2

1. Lakukan perlakuan pengabuan menggunakan H_2SO_4 dan HNO_3 point 1 s.d 6.
2. Tambahkan 2 – 3 ml H_2O_2 30% dan beberapa tetes HNO_3
3. Panaskan sampai residu tidak berwarna atau pengurangan warna kuning muda tidak terjadi lagi.
4. Dinginkan dan encerkan dengan 10 ml aquades, kemudian uapkan sampai berasap.
5. Encerkan lagi dengan 5 ml aquades dan uapkan lagi sampai berasap.
6. Encerkan dengan aquades sampai volume tertentu.

C. Penetapan Kalsium (Apriyanto, 1989)

Prinsip

Kalsium diendapkan sebagai kalsium oksalat. Endapan dilarutkan dalam H_2SO_4 encer panas dan dititrasi dengan KMnO_4 .

Pereaksi

1. Amonium Oksalat jenuh
2. Indikator merah metil (larutan 0.5 gram merah metal dalam 100 ml alkohol 95%).
3. Asam asetat encer (1+4).
4. Asam sulfat encer (1+4) ; masukkan dengan perlahan-lahan asam sulfat ke dalam air sambil diaduk-aduk, dinginkan dan encerkan sampai volume tertentu.
5. Amonium Hidroksida encer (1+4).
6. KMnO_4 0.1 N
7. KMnO_4 0.01 N (encerkan KMnO_4 0.1 N sampai 100 ml menggunakan air, 1 ml 0.2mg Ca, dan buat jika akan segera digunakan).

Prosedur Kerja

1. Pipet 20 – 100 ml larutan abu hasil pengabuan kering, masukkan ke dalam gelas piala 250 ml. Jika perlu tambahkan 25 – 50 ml akuades.
2. Tambahkan 10 ml larutan ammonium oksalat jenuh dan 2 tetes indikator merah metil
3. Buat larutan menjadi sedikit basa dengan menambah ammonia encer kemudian buat larutan menjadi sedikit asam dengan menambah beberapa tetes asam asetat sampai warna larutan merah muda (pH 5.0).
4. Panaskan larutan sampai mendidih, kemudian diamkan selama minimum 4 jam atau semalam pada suhu kamar.
5. Saring menggunakan kertas saring Whatman No. 42 dan bilas dengan aquades panas sampai filtrat bebas oksalat (jika menggunakan HCl dalam pembuatan larutan abu, filtrat hasil saringan terakhir harus bebas Cl dengan mengujinya menggunakan AgNO_3).
6. Lubangi ujung kertas saring menggunakan batang gelas. Bilas dan pindahkan endapan dengan H_2SO_4 encer (1+4) panas ke dalam gelas piala bekas tempat mngendapkan kalsium. Kemudian bilas satu kali lagi dengan air panas.

7. Selagi panas (70 - 80°C) titrasi dengan KMnO_4 0.01 N sampai larutan berwarna merah jambu permanen yang pertama.
8. Masukkan kertas saring dan lanjutkan titrasi sampai tercapai warna merah jambu permanen yang kedua.

Perhitungan:

$$\text{mg Ca/100 g sampel} = \frac{\text{Hasil titrasi} \times 0.2 \times \text{total volume larutan abu} \times 100}{\text{Vol larutan abu yg digunakan} \times \text{b sampel yg diabukan}}$$

$$\text{mg Ca/100 g sampel} = \frac{\text{Hasil titrasi} \times \text{N KMnO}_4 \times 20 \times \text{total vol larutan abu} \times 100}{\text{Vol larutan abu yg digunakan} \times \text{b sampel yg diabukan}}$$

D. Penetapan Magnesium (Sudarmadji, 1984)

Prinsip

Di dalam larutan alkali yang telah dihilangkan kalsium dan besinya, magnesium diendapkan sebagai magnesium ammonium fosfat. Endapan dilarutkan di dalam larutan asam dan jumlah fosfor dapat ditentukan secara kolorimetrik, dengan demikian jumlah magnesium juga dapat ditentukan.

Pereaksi

1. Larutan jenuh ammonium oksalat $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
2. Indikator merah metal.
3. Larutan Amonium fosfat $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2%
4. Larutan Amonium hidroksida (NH_4OH) 10% v/v.
5. Asam Klorida 0.1 N
6. Larutan Asam Molibdat (larutkan 25 g amonium molibdat di dalam 300 ml air tanpa dipanasi. Encerkan 37 ml H_2SO_4 sampai 200 ml menggunakan air dan tambahkan ke dalam larutan ammonium molibdat. Simpan dalam botol coklat.
7. Larutan Hidrokuinon 2% , Tambahkan 1 tetes H_2SO_4 setiap 100 ml larutan. Buang jika larutan menjadi warna coklat.
8. Larutan Sodium Sulfit (Na_2SO_3) 10%, siapkan yang baru setiap minggu (untuk rutin)
9. Potasium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) .

Prosedur Kerja :

1. Pipet 10 ml larutan abu, masukkan ke dalam tabung sentrifuse 15 ml berskala. Tambahkan 1 tetes indikator merah metil.
2. Netralkan larutan dengan NH_4OH .
3. Tambahkan 1 ml ammonium oksalat dan encerkan larutan menjadi 13 ml dengan menggunakan air.
4. Aduk dan diamkan semalam.
5. Sentrifuse selama 10 menit dan buang endapannya.
6. Ambil 1 ml larutan supernatant tersebut kemudian masukkan ke dalam tabung sentrifuse 15 ml.
7. Tambahkan 3 ml air, 1 ml ammonium fosfat, dan 2 ml NH_4OH , aduk dan diamkan semalam.
8. Sentrifuse selama 7 menit, buang larutan supernatant, tambahkan 5 ml NH_4OH encer.
9. Sentrifuse lagi selama 7 menit dan buang larutan supernatant.
10. Keringkan endapan dengan meletakkan tabung di dalam wadah berisi air panas.
11. Tambahkan 1 ml HCl encer dan 5 ml air untuk melarutkan endapan.
12. Tambahkan 1 ml asam molibdat, 0.5 ml hidrokuinon dan 0.5 ml Na-sulfit. Aduk dan diamkan 30 menit.
13. Pindahkan larutan ke dalam kuvet dan baca absorbansinya pada kolorimeter dengan menggunakan filter merah no.66
14. Atur skala alat pada angka 0 dengan menggunakan air.

Kurva standar

1. Larutkan 0.4389 g potassium dihidrogen fosfat di dalam air dan encerkan sampai volume 1 liter. (1 ml = 0.1 mg P = 0.0784 mg Mg)
2. Untuk menyiapkan kurva standar, gunakan alikout dari larutan standar dari 0.1 sampai 0.5 ml.
3. Kerjakan setiap standar seperti langkah no.11 - no.14 di atas.

E. Penetapan Besi (Andarwulan, 2011)

Prinsip

Kandungan besi di dalam bahan pangan dianalisa dengan mengkonversi besi dari bentuk fero menjadi feri dengan menggunakan oksidator seperti $K_2S_2O_8$ (Potasium persulfat) dan H_2O_2 (Hidrogen peroksida), kemudian direaksikan dengan KSCN (Potasium tiosianat) sehingga membentuk feritiosianat yang berwarna merah. Warna yang terbentuk dapat diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 480 nm.

Pereaksi

1. H_2SO_4 pekat
2. Larutan Potasium persulfat jenuh ($K_2S_2O_8$) :
Larutkan 7–8 gram $K_2S_2O_8$ bebas besi dengan 100 ml air di dalam sebuah botol bertutup gelas, campur merata. Bagian yang tidak larut akan mengendap di dasar botol, dianggap sebagai kehilangan karena dekomposisi. Kocok sebelum digunakan dan simpan di dalam lemari es.
3. Larutan Potasium tiosianat (KSCN) 3N :
Larutkan 146 gram KSCN di dalam air dan diencerkan samapi 500 ml. saring jika keruh. Tambah 20 ml aseton murni untuk menaikkan "keeping quality".
4. Larutan Besi Standar.
Larutkan 0.702 gram kristal $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ didalam 100 ml air. Tambahkan 5 ml H_2SO_4 pekat, hangatkan sebentar dan tambah potasium permanganate pekat tetes demi tetes sampai satu tetes terakhir menghasilkan warna tetap. Pindahkan ke dalam labu takar 1 liter , bilas dengan air dan encerkan sampai tanda tera (1 ml = 0.1 mg ion feri). Larutan ini stabil.

Prosedur Kerja :

1. Gunakan larutan abu yang dihasilkan dari pengabuan kering
2. Kedalam tiga tabung reaksi bertutup yang terpisah masukkan larutan seperti berikut ini :

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

Jenis Larutan	Blanko (ml)	Standar (ml)	Sampel (ml)
Larutan besi standar	0	1	0
Larutan abu	0	0	5
Air	5	4	0
H ₂ SO ₄ pekat	0.5	0.5	0.5
K ₂ S ₂ O ₈	1	1	1
KSCN	2	2	2

Catatan : Penambahan pereaksi harus berurutan dari atas ke bawah

3. Masing-masing tabung encerkan sampai volume 15 ml dengan air.
4. Ukur Absorbansi warna larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm (blanko pada 100% transmisi)

Perhitungan :

$$\text{mg Besi/100g} = \frac{\text{Absorbansi sampel} \times 0.1 \times \text{volume total larutan abu}}{\text{Absorbansi standar} \times 5 \times \text{berat sampel sebelum pengabuan}}$$



Gambar 7. Spektrofotometer UV dan kuvet

PENETAPAN KADAR KARBOHIDRAT

A. Penetapan Kadar Karbohidrat *by different* (Andarwulan, 2011)

Karbohidrat merupakan komponen utama bahan pangan yang memiliki sifat fungsional yang penting dalam proses pengolahan bahan pangan. Termasuk didalamnya adalah 1) monosakarida (yang merupakan polihidroksi aldehyd atau keton, yang terbanyak yang terdapat di alam adalah yang berantai karbon 5 dan 6, berturut-turut disebut pentosa dan heksosa); 2) oligosakarida (yang terdiri dari 2 - 8 unit monosakarida) serta 3) polisakarida (terdiri dari > 8 unit monosakarida, dan merupakan komponen struktural tanaman (selulosa, lignin, dan lain-lain) maupun nutrien (pati dan glikogen).

Karbohidrat dapat dikelompokkan menjadi karbohidrat yang dapat dicerna (*digestible carbohydrate*) dan karbohidrat yang tidak dapat dicerna (*non-digestible carbohydrate*). Karbohidrat yang dapat dicerna adalah karbohidrat yang dapat dipecah oleh enzim α amylase di dalam system pencernaan manusia dan menghasilkan energi. Karbohidrat yang termasuk ke dalam kelompok yang dapat dicerna adalah monosakarida (seperti glukosa dan fruktosa), disakarida (seperti sukrosa, laktosa, maltosa), dan polisakarida (seperti pati dan dekstrin). Karbohidrat yang dapat dicerna tersebut di dalam tubuh akan dikonversi menjadi monosakarida yang akan diserap oleh tubuh dan menyediakan energi untuk proses metabolisme.

Karbohidrat yang tidak dapat dicerna sering dikelompokkan sebagai serat makanan atau *dietary fiber*. Karbohidrat ini tidak dapat dipecah oleh enzim α amylase yang ada di dalam tubuh manusia. Diantara karbohidrat yang termasuk ke dalam kelompok tidak dapat dicerna adalah selulosa, hemiselulosa dan substansi pektat. Selulosa, dan hemiselulosa termasuk serat yang tidak dapat larut, sedangkan pektin dan gum termasuk serat yang dapat larut.

Diantara metode analisis karbohidrat yang banyak digunakan adalah penentuan total karbohidrat dengan metode *by different* dan kadar gula dengan metode refraktometri, polarimetri, kalorimetri, volumetric, metode enzim, dan HPLC.

Analisis karbohidrat dengan metode *by different* dalam analisis proksimat dihitung berdasarkan $= 100\% - (\text{kadar air} + \text{kadar abu} + \text{kadar lemak} + \text{kadar protein})$.

Di dalam tabel komposisi bahan pangan, kandungan karbohidrat biasanya diberikan sebagai karbohidrat total *by different*, artinya kandungan tersebut diperoleh dari hasil pengurangan angka 100 dengan persentase komponen lain (air, abu, lemak dan protein). Bila hasil pengurangan ini dikurangi dengan persentase serat maka akan diperoleh kadar karbohidrat yang dapat dicerna.

B. Persiapan Sampel untuk Penetapan Karbohidrat (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Analisis karbohidrat/gula dalam bahan pangan memerlukan tahap persiapan yang bertujuan untuk memisahkan gula dari matrik bahan pangan. Hasil dari tahap persiapan sampel ini dapat digunakan untuk analisis total gula, gula pereduksi dan gula non pereduksi.

Dalam penetapan karbohidrat/gula, sampel perlu dipisahkan dulu dari komponen-komponen yang dapat mengganggu analisis seperti senyawa nitrogen, lipida, fenolik, dan pigmen-pigmen yang larut. Senyawa-senyawa tersebut dapat mengganggu filtrasi atau ikut bereaksi sehingga mengganggu pengukuran gula, untuk itu sebelum melakukan analisis perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu.

Alkohol atau gas-gas yang terlarut, misalnya pada produk karbonasi, umumnya dibuang dengan cara penguapan pada suhu rendah. Penguapan dalam keadaan vakum dikehendaki untuk mencegah terurainya gula pada saat pemanasan. Pigmen klorofil, karotenoid, dan lipida dipisahkan dengan mengekstraknya dengan petroleum eter dimana gula tidak larut. Pigmen juga dapat dihilangkan dengan arang aktif atau timbal asetat. Garam-garam timbal khususnya timbal asetat (Pb-asetat) basa, akan mengganggu penetapan gula dengan polarimetri. Bentuk Pb asetat yang netral lebih disukai dan kelebihanannya dapat dihilangkan dengan menambahkan natrium atau kalium oksalat. Protein yang mungkin mengganggu penetapan gula dengan metode reduksi dan kalorimetri dapat dihilangkan dengan cara mengendapkannya. Dengan menambahkan etanol atau aseton, protein akan menggumpal dan dapat dipisahkan dengan penyaringan atau sentrifuse. Protein juga dapat diendapkan dengan logam-logam berat seperti $\text{Zn}(\text{OH})_2$.

Prinsip

Sampel dalam bentuk cair dibuat basa dengan penambahan CaCO_3 , agar asam-asam yang terdapat dalam sampel tidak menghidrolisa gula yang ada selama pemanasan. Pemanasan sampel diperlukan untuk menginaktivasi enzim-enzim penghidrolisa gula. Untuk menghilangkan pigmen, senyawa berwarna dan senyawa koloid ditambahkan Pb-asetat basa. Kelebihan Pb-asetat dihilangkan dengan penambahan Na/K -oksalat. Jika sampel berbentuk padat, maka perlu dilakukan ekstraksi dengan menggunakan alkohol 80%. Gula sangat sensitive dengan alkohol konsentrasi tinggi, maka perlu dihilangkan dengan pemanasan rendah.

Pereaksi

1. CaCO_3
2. Pb-asetat
3. Natrium Oksalat
4. Alkohol 80%

Peralatan

1. Timbangan analitik
2. Gelas piala 600 ml
3. Penangas air / Water bath
4. Labu takar 500 ml, 250 ml
5. Kertas Whatman No. 2
6. pH meter
7. Waring blender
8. Kapas

Prosedur Kerja

Sampel Cair

1. Timbang dengan tepat sejumlah sampel yang jika dilarutkan dalam air akan memberikan gula pereduksi dengan konsentrasi tidak lebih dari 200 mg/25 ml (biasanya digunakan sebanyak 29 gram sampel dalam 500 ml larutan).

2. Pindahkan sampel ke dalam gelas piala 600 ml, tambahkan 200 – 300 ml air dan 2 gram CaCO_3 , didihkan selama 30 menit. Selama pendidihan tambahkan air secukupnya agar volumenya tetap.
3. Dinginkan larutan tersebut, pindahkan ke dalam labu takar 500 ml, kemudian tambahkan larutan Pb-asetat jenuh perlahan-lahan sampai larutan jernih (umumnya dibutuhkan 3 – 5 ml Pb-asetat).
4. Tepatkan volume larutan sampai tanda tera dengan air, campur sampai merata dan saring melalui kertas saring whatman No.2.
5. Tambahkan Natrium oksalat kering secukupnya (kira-kira 1gram) untuk mengendapkan semua Pb, campur sampai merata, dan saring kembali.
6. Filtrat siap dipakai untuk penetapan karbohidrat. Jika tidak langsung dipakai, kemudian tambahkan sedikit asam benzoat dapat disimpan dalam refrigerator dalam waktu tertentu (waktu yang lama akan merusak sampel).

Sampel Padat

1. Timbang sejumlah sampel (20 – 30 gram), tambahkan alkohol 80% dengan perbandingan 1 : 1 atau 1 : 2.
2. Hancurkan sampel dengan menggunakan waring blender sampai semua gula terekstrak.
3. Pindahkan semua hancuran ke dalam gelas piala secara kuantitatif
4. Saring sampel dengan menggunakan kapas, tempatkan filtrat dalam gelas piala. Sisa padatan pada kapas dicuci dengan alkohol 80% sampai seluruh gula terlarut dalam filtrat.
5. pH filtrat diukur. Jika asam, tambahkan CaCO_3 sampai cukup basa. Panaskan pada penangas air 100°C selama 30 menit.
6. Saring kembali dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 2
7. Hilangkan alkohol dengan memanaskan filtrat pada penangas air yang suhunya dijaga $\pm 85^\circ \text{C}$, jika akan kering, tambahkan air secukupnya. Dapat pula penghilangan alkohol tersebut dilakukan dengan bantuan vakum.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

8. Jika masih ada endapan maka sampel perlu disaring kembali. Lakukan penambahan Pb-asetat jenuh dan menghilangkan Pb dengan Na-oksalat seperti persiapan sampel cair.
9. Tepatkan volume larutan sampai volume tertentu dengan air. Kocok agar tercampur merata.
10. Larutan siap digunakan untuk penetapan gula. Jika diperlukan larutan dapat diencerkan secukupnya. Jika akan digunakan keesokan harinya, maka larutan ini harus disimpan pada refrigerator pada batas waktu tertentu (tidak boleh terlalu lama, karena sampel akan rusak).



Gambar 8. Water bath (penangas air)

C. Penetapan Total Gula

Metode Refraktometri (Sulaeman, 1994)

Prinsip

Didasarkan pada total soluble solid (total padatan terlarut) yang ada dalam larutan gula karena total soluble solid ini pada dasarnya merupakan kadar gula total dalam suatu bahan.

Peralatan

1. Refraktometer
2. Pipet tetes
3. Kertas lensa / tissue



Gambar 9. Hand Refraktometer

Prosedur Kerja

1. Bersihkan prisma pada refraktometer dengan kertas lensa atau tissue.
2. Ambil sampel dengan pipet tetes, kemudian letakan pada permukaan prisma dan secara perlahan ditutup
3. Nilai Brix dapat diketahui dengan melihat batas gelap dan terang. Nilai brix menunjukkan kandungan gula total dalam larutan.
4. Ulangi pengukuran untuk ketepatan.
5. Bersihkan kembali refraktometer yang telah digunakan.

Metode Luff Schoorl

Prinsip

Gula-gula pereduksi (glukosa, maltosa) dapat mereduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ . Kemudian Cu^{2+} yang tidak tereduksi (sisa) dapat dititer secara iodometri. Jumlah Cu^{2+} asli ditentukan dalam suatu percobaan blanko dan dari perbedaannya dapat ditentukan jumlah gula dalam larutan yang dianalisis.

Pereaksi

1. Pb asetat setengah basa
2. Na_2HPO_4 10%
3. KI 30%
4. H_2SO_4 25%
5. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N
6. Larutan *Luff schoorl*
7. Larutan Kanji 0.5%

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

Peralatan

1. Labu takar 250 ml, 100 ml
2. Erlenmeyer
3. Buret
4. Water bath/Penangas air

Prosedur kerja

Persiapan sampel

1. Timbang sampel sebanyak 5 – 10 gram, masukkan ke dalam labu takar 250 ml. Tepatkan dengan aquades sampai tanda tera dan kocok
2. Saring dan pipet 50 ml filtratnya, masukkan ke dalam labu takar 250 ml. Tambahkan 10 ml larutan Pb asetat setengah basa sambil dikocok. Cek apakah penambahan Pb asetat sudah cukup atau belum dengan meneteskan larutan Na_2HPO_4 10%. Bila timbul endapan putih berarti sudah cukup.
3. Tambahkan Na_2HPO_4 10% hingga cukup mengendapkan kelebihan Pb asetat (sekitar 15 ml) yaitu diuji dengan meneteskan 1 – 2 tetes larutan Na_2HPO_4 sampai tidak timbul endapan.
4. Tambahkan aquades sampai dengan tanda tera, kocok dan biarkan sekitar 30 menit, kemudian saring.

Penentuan Kadar Gula sebelum Inversi

1. Pipet 10 ml filtrat dari persiapan sample (point 4) ke dalam Erlenmeyer 500 ml bertutup.
2. Tambahkan 15 ml air, batu didih dan 25 ml larutan luff schoorl.
3. Panaskan sekitar 2 menit sampai mendidih dan didihkan terus selama 10 menit dalam water bath.
4. Angkat dan dinginkan secepatnya dengan es
5. Setelah dingin tambahkan 10 – 15 ml larutan KI 30% dan 25 ml larutan H_2SO_4 25% dengan perlahan-lahan
6. Segera titrasi dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N dan larutan kanji 0.5% sebagai indikator. Kanji baru ditambahkan pada saat warna telah berubah menjadi kuning

7. Lakukan juga terhadap blanko dengan mengganti larutan sampel/filtrat dengan air.

Perhitungan

Larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ yang digunakan = ml blanko - ml sampel = z

Z lihat pada tabel Luff school untuk melihat kandungan gulanya

$$\text{Kadar Gula sebelum inversi (\%)} = \frac{\text{mg gula} \times \text{FP} \times 100\%}{\text{Berat sampel (mg)}}$$

Penentuan Kadar Gula sesudah Inversi

1. Pipet 50 ml filtrat dan masukkan ke dalam labu takar 100 ml. Tambahkan 5 ml HCl 25%, kemudian labu dimasukkan ke dalam penangas air 60 - 70° C.
2. Biarkan selama 10 menit dalam penangas air (untuk menginversi gula-gula).
3. Angkat dan dinginkan, tambahkan NaOH 30% hingga merah jambu atau pH = 7
4. Tepatkan hingga tanda tera dan kocok secukupnya.
5. Pipet 10 ml filtrate dari persiapan sampel ke dalam erlenmeyer 500 ml bertutup.
6. Tambahkan 15 ml air, batu didih dan 25 ml larutan luff school.
7. Panaskan sekitar 2 menit sampai mendidih dan didihkan terus selama 10 menit dalam water bath.
8. Angkat dan dinginkan secepatnya dengan es
9. Setelah dingin tambahkan 10 - 15 ml larutan KI 30% dan 25 ml larutan H_2SO_4 25% dengan perlahan-lahan
10. Segera titrasi dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N dan larutan kanji 0.5% sebagai indikator. Kanji baru ditambahkan pada saat warna telah berubah menjadi kuning
11. Lakukan juga terhadap blanko dengan mengganti larutan sampel/filtrate dengan air.

Perhitungan

Kadar Sukrosa =

(% gula sesudah inverse - % gula sebelum inverse) x 0.95.

Kadar gula dihitung sebagai sukrosa = % gula sesudah inversi x 0,95

D. Penetapan Kadar Pati dengan Metode *Luff Schoorl* (Sulaeman, 1994)

Prinsip

Dasar penetapan ini adalah hidrolisis pati menjadi gula-gula pereduksi yang kemudian ditetapkan secara luff schoorl. Gula-gula pereduksi (glukosa, maltosa) dapat mereduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ . Kemudian Cu^{2+} yang tidak tereduksi (sisa) dapat dititer secara iodometri. Jumlah Cu^{2+} asli ditentukan dalam suatu percobaan blanko dan dari perbedaannya dapat ditentukan jumlah gula dalam larutan yang dianalisis.

Pereaksi

1. HCl 3%
2. NaOH 4 N
3. KI 30%
4. H_2SO_4 25%
5. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N
6. Larutan *Luff schoorl*
7. Larutan Kanji 0.5%

Peralatan

1. Labu takar 250 ml, 100 ml
2. Erlenmeyer
3. Buret
4. Water bath/Penangas air

Prosedur Kerja

1. Timbang dengan teliti kurang lebih 3 gram sampel dan masukan ke dalam erlenmeyer 500 ml.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

2. Tambahkan HCl 30% sebanyak 200 ml dan beberapa butir batu didih.
3. Hubungkan dengan kondensor dan didihkan selama 3 jam.
4. Netralkan dengan NaOH 4 N dan tambahkan 1 ml asam asetat pekat
5. Masukkan ke dalam labu takar 250 ml dan tepatkan sampai tanda tera.
6. Saring.
7. Pipet 10 ml filtrat dari persiapan sampel ke dalam erlenmeyer 500 ml bertutup.
8. Tambahkan 15 ml air, batu didih dan 25 ml larutan luff school.
9. Panaskan sekitar 2 menit sampai mendidih dan didihkan terus selama 10 menit dalam water bath.
10. Angkat dan dinginkan secepatnya dengan es
11. Setelah dingin tambahkan 10 – 15 ml larutan KI 30% dan 25 ml larutan H_2SO_4 25% dengan perlahan-lahan
12. Segera titrasi dengan larutan $Na_2S_2O_3$ 0.1 N dan larutan kanji 0.5% sebagai indikator. Kanji baru ditambahkan pada saat warna telah berubah menjadi kuning
13. Lakukan juga terhadap blanko dengan mengganti larutan sampel/filtrat dengan air.

Perhitungan

$$\text{Larutan } Na_2S_2O_3 \text{ yang digunakan} = \frac{(\text{ml blanko} - \text{ml sampel}) \times N \text{ tio}}{0.1} = Z$$

Z lihat pada tabel Luff school untuk melihat kandungan gulanya (mg glukosa)

$$\text{Kadar Pati (\%)} = \frac{\text{mg glukosa} \times \text{FP} \times 0.95 \times 100\%}{\text{Berat sampel (mg)}}$$

FP = Faktor Pengencer

E. Penetapan Kadar Amilosa (Andarwulan, 2011)

Pendahuluan

Kandungan amilosa dalam bahan pangan dapat ditentukan berdasarkan pada kemampuannya untuk bereaksi dengan senyawa iod menghasilkan kompleks berwarna biru. Intensitas warna biru ini akan berbeda tergantung pada kadar amilosa dalam bahan pangan, ini dapat ditentukan secara spektrofotometri. Sedangkan kandungan amilopektin dapat ditentukan sebagai selisih antara kandungan pati dengan kandungan amilosa.

Prinsip

Amilosa akan berwarna biru bila bereaksi dengan senyawa iod. Intensitas warna biru akan berbeda tergantung dari kadar amilosa dalam bahan.

Pereaksi

1. Amilosa standar
2. Etanol 95%
3. NaOH 1N
4. Larutan Iod (Larutkan 0.2 gram iod dan 2 gram KI dalam 100 ml aquades).
5. Asam asetat 1 N

Peralatan

1. Neraca analitik
2. Penangas air
3. Spektrofotometer
4. Tabung reaksi
5. Labu takar 100 ml
6. Pipet mohr 1 ml, 2 ml, 10 ml.

Prosedur kerja

Pembuatan Kurva Standar Amilosa

1. Timbang dengan tepat 40 mg amilosa murni dan masukkan ke dalam tabung reaksi.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

2. Tambahkan 1 ml etanol 95% dan 9 ml NaOH 1N
3. Panaskan tabung reaksi tersebut dalam air mendidih selama kurang lebih 10 menit, sampai semua amilosa membentuk gel. Setelah itu dinginkan.
4. Pindahkan seluruh campuran secara kuantitatif ke dalam labu takar 100 ml. Tepatkan sampai tanda tera dengan aquades.
5. Pipet masing-masing 1, 2, 3, 4, dan 5 ml larutan diatas dan masukkan masing-masing ke dalam labu takar 100 ml.
6. Tambahkan ke dalam masing-masing labu takar asam asetat 1 N sebanyak 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml , kemudian tambahkan masing-masing 2 ml larutan iod.
7. Tepatkan masing-masing campuran dalam labu takar sampai tanda tera dengan aquades. Biarkan selama 20 menit.
8. Intensitas warna biru yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm.
9. Buat kurva standar sebagai hubungan antara kadar/konsentrasi amilosa dengan dengan absorbansi.

Penetapan sampel

1. Timbang sebanyak 100 mg sampel ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan ke dalam tabung reaksi 1 ml etanol 95% dan NaOH 1 N
3. Panaskan tabung reaksi selama 10 menit untuk menggelatinisasi pati.
4. Setelah didinginkan, masukkan pasta pati ke dalam labu takar 100 ml dan tepatkan hingga tanda tera dengan aquades.
5. Pipet sebanyak 5 ml larutan tersebut dan masukkan ke dalam labu takar 100 ml lalu tambahkan 1 ml asam asetat 1 N, 2 ml larutan iod dan aquades hingga tanda tera.
6. Kocok, diamkan selama 20 menit.
7. Ukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm.
8. Hitung Kadar amilosa dalam sampel dengan memanfaatkan kurva standar dan rumus dibawah ini.

Perhitungan

$$\text{Kadar Amilosa (\%)} = \frac{C \times V \times FP \times 100\%}{\text{Berat sampel (mg)}}$$

C = Konsentrasi amilosa sampel dari kurva standar (mg/ml)

V = Volume akhir contoh (ml)

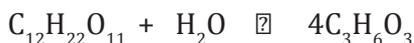
FP = Faktor Pengenceran.

F. Penetapan Kadar Laktosa (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Laktosa atau gula susu adalah disakarida yang tersusun dari satu molekul galaktosa dan satu molekul glukosa. Rumus molekul laktosa sama dengan sukrosa yaitu $C_{12}H_{22}O_{11}$ tetapi terdapat perbedaan dalam konfigurasi molekuler, kemanisan relatif, kelarutan dan sifat kimia.

Kemanisan sukrosa kira-kira enam kali kemanisan laktosa. Kelarutan sukrosa hanya sepertiga kelarutan sukrosa pada suhu $100^{\circ}C$ dan suhu $0^{\circ}C$ hanya seperempatnya. Pemanasan pada suhu $100 - 130^{\circ}C$ menyebabkan warna susu kecoklatan atau "caramel" yang disebabkan terjadinya dekomposisi laktosa. Pencoklatan ini dipercepat dengan adanya protein dan garam mineral tertentu. Laktosa lebih reaktif dibandingkan sukrosa karena pada molekulnya masih terdapat gugus aldehyd bebas pada molekul glukosa. Laktosa dalam susu mempunyai peranan penting dalam pembuatan produk-produk susu fermentasi. Laktosa didekomposisi oleh bakteri menjadi asam laktat.



Pereaksi

HCl

Peralatan

1. Erlenmeyer
2. Pemanas (Hot plate)
3. Cawan porselin
4. Kertas saring
5. Pipet 25 ml

Prosedur Kerja

1. Pipet sampel susu sebanyak 25 ml, masukkan ke dalam Erlenmeyer.
2. Tambahkan asam klorida (HCl) ke dalam sampel sampai pH-nya menjadi sekitar 4 – 5
3. Sampel disaring dan filtratnya dipanaskan sampai timbul gumpalan-gumpalan, kemudian disaring kembali.
4. Tempatkan filtrat pada cawan porselin yang kering dan sudah diketahui bobotnya.
5. Keringkan pada suhu sekitar 4° C.
6. Kristal-kristal laktosa akan menempel pada dinding dan dasar cawan
7. Timbang bobot cawan

Perhitungan

$$\% \text{ Laktosa (b/v)} = \frac{W2 - W1 \times 100\%}{\text{ml sampel}}$$

W1 = Berat cawan kosong (gram)

W2 = Berat cawan + kristal laktosa (gram)

G. Penetapan Kadar Pektin (Andarwulan, 2011))

Pendahuluan

Pektin merupakan salah satu jenis karbohidrat yang tergolong ke dalam serat pangan (*dietary fiber*) yang termasuk ke dalam serat dapat larut.

Pereaksi

1. NaOH 1 N
2. Asam asetat 1 N
3. CaCl₂ 1 N
4. Aquades
5. Larutan AgNO₃

Peralatan

1. Erlenmeyer
2. Labu Takar
3. Kertas saring
4. Penangas / Hot plate
5. Pipet
6. Oven Pengering
7. Gelas Piala 600 ml

Prosedur Kerja

1. Timbang sampel sebanyak kurang lebih 50 gram
2. Tambahkan dengan aquades 400 ml
3. Panaskan sambil diaduk (kurang lebih 30 menit)
4. Masukkan dalam labu takar 500 ml, tera dengan aquades.
5. Saring dengan kertas saring whatman No. 4
6. Ambil filtratnya sebanyak 50 ml, netralkan dengan NaOH 1 N
7. Tambahkan dengan aquades sehingga menjadi 250 ml
8. Ambil filtratnya 150 ml, tambahkan 10 ml NaOH 1 N
9. Diamkan semalam
10. Tambahkan 50 ml asam asetat 1 N, dan 25 ml CaCl₂ 1N, aduk dan diamkan.
11. Panaskan kurang lebih 1 – 2 menit, cuci dengan air panas (pencucian sampai bebas Cl, diuji dengan AgNO₃)
12. Saring dengan kertas saring whatman No. 1 yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya
13. Endapan serta kertas saring dioven semalam pada suhu 100°C
14. Timbang sampai bobot tetap

Perhitungan

$$\% \text{ Pektin (b/b)} = \frac{W2 - W1 \times 100\%}{\text{Berat sampel}}$$

W1 = Berat kertas saring kosong (g)

W2 = Berat kertas saring + endapan (g)

PENETAPAN SERAT KASAR DAN SERAT MAKANAN

A. Penetapan Serat Kasar (Apriyantono, 1989)

Prinsip

Serat kasar merupakan residu dari bahan makanan atau pertanian setelah diperlakukan dengan asam dan alkali mendidih, dan terdiri dari selulose dengan sedikit lignin dan pentosan.

Pereaksi

1. Antifoam agent
2. Asbes
3. Larutan H_2SO_4 (1.25 g H_2SO_4 pekat / 100 ml = 0.255 N H_2SO_4)
4. NaOH (1.25 g NaOH / 100 = 0.313 N NaOH)
5. Larutan K_2SO_4 10%
6. Alkohol 95%

Peralatan

1. Penggiling
2. Timbangan Analitik
3. Alat Ekstraksi Soxhlet
4. Erlenmeyer 600 ml
5. Pendingin Balik
6. Kertas Saring
7. Spatula
8. Oven 110^oC
9. Desikator

Prosedur Kerja

1. Haluskan sampel sehingga dapat melalui saringan diameter 1 mm dan aduk merata. Kalau bahan tidak dapat dihaluskan, usahakan dihancurkan sebaik mungkin.
2. Timbang 2 gram sampel. Ekstraksi lemak sampel dengan metode Soxhlet

3. Pindahkan sampel yang telah diekstrak lemaknya ke dalam Erlenmeyer 600 ml. Jika ada tambahkan 0.5 gram asbes yang telah dipijarkan dan tiga tetes zat anti buih (*antifoam agent*).
4. Tambahkan 200 ml H_2SO_4 1.25% yang panas. Tutup dengan pendingin balik.
5. Didihkan selama 30 menit dengan kadang-kadang digoyang-goyangkan.
6. Saring suspensi melalui kertas saring. Residu yang tertinggal dalam erlemeyer dicuci dengan air mendidih. Cuci residu dalam kertas saring sampai air cucian tidak bersifat asam lagi (uji dengan kertas lakmus).
7. Pindahkan secara kuantitatif residu dari kertas saring ke dalam Erlenmeyer kembali dengan spatula. Sisinya dicuci kembali dengan 200 ml larutan NaOH 1.25% mendidih, sampai semua residu masuk ke dalam Erlenmeyer.
8. Didihkan dengan dengan pendingin balik selama 30 menit sambil kadang-kadang digoyang-goyangkan.
9. Saring kembali melalui kertas saring yang telah diketahui beratnya atau krus gooch yang telah dipijarkan dan diketahui beratnya, sambil dicuci dengan larutan K_2SO_4 10%.
10. Cuci lagi residu dengan air mendidih. Kemudian dengan alkohol 95% sekitar 15 ml
11. keringkan kertas saring atau krus dengan isinya pada oven $110^{\circ}C$ sampai berat konstan (1 – 2 jam), dinginkan dalam desikator dan timbang. Jangan lupa mengurangi berat asbes (sekali digunakan)

Perhitungan

$$\text{Serat Kasar (\%)} = \frac{\text{Berat Residu (gram)} \times 100\%}{\text{Berat sampel (gram)}}$$

B. Penetapan Serat Makanan (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Serat makanan didefinisikan sebagai bagian dari komponen bahan pangan nabati yang tidak dapat dicerna oleh saluran pencernaan manusia. Definisi ini diperluas lagi sehingga seluruh polisakarida dan lignin yang tidak dapat dicerna oleh saluran pencernaan manusia termasuk ke dalam serat makanan.

Berdasarkan atas fungsinya di dalam tanaman, serat makanan dibagi menjadi tiga fraksi utama, yaitu :

1. Polisakarida struktural, terdapat dalam dinding sel dan terdiri dari selulose dan polisakarida non selulosa (hemiselulosa dan substrat pektat).
2. Non polisakarida struktural, sebagian besar terdiri dari lignin.
3. Polisakarida Non structural, termasuk gum dan mucilage serta polisakarida lainnya seperti karagenan dan agar dari alga rumput laut.

Berbagai metode telah dikembangkan orang untuk menganalisa serat makanan, akan tetapi metode Van Soest dan berbagai modifikasinya masih banyak digunakan orang karena lebih mudah dan relatif lebih cepat. Dengan menggunakan metode ini dapat ditentukan kadar ADF (Acid Detergent Fiber) dan NDF (Neutral Detergent Fiber).

ADF sebagian besar terdiri dari selulosa dan lignin dan sebagian kecil hemiselulosa dan substansi pektat, oleh karena itu ADF dianggap hanya terdiri dari selulose dan lignin. NDF terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin.

Penetapan kadar komponen serat makanan lainnya dapat ditentukan dengan metode lain. Penentuan lignin umumnya ditentukan dengan metode Klason, sedangkan substansi pektat dengan metode spektrofotometri.

Dengan menggunakan metode-metode diatas maka hampir seluruh komponen serat makanan masing-masing dapat ditentukan. Kadar hemiselulosa diperoleh dengan menghitung selisih kadar NDF dengan kadar ADF. Kadar selulosa diperoleh diperoleh dengan menghitung selisih kadar ADF dan kadar lignin. Sedangkan total serat makanan dihitung dengan menjumlahkan kadar NDF dengan kadar substansi pektat.

1. Penetapan Serat Makanan dengan metode Acid Detergent Fiber (ADF) (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Metode ini menganalisa serat yang larut dalam deterjen asam. Metode ini dapat menghitung lignin dan selulosa serta sejumlah kecil hemiselulosa dan pektin.

Prinsip

Sampel diekstrak dengan larutan ADF (setil trimetil ammonium bromide dalam H_2SO_4 1N) sehingga seluruh komponen selain komponen ADF larut. Komponen yang tidak larut kemudian disaring, dikeringkan, ditimbang, dan dikoreksi dengan kandungan mineral yang ada dalam komponen tersebut dengan cara menyabungkannya sehingga yang tinggal hanya mineralnya saja.

Pereaksi

1. Larutan ADF (Larutkan 20 gram setil trimetil ammonium bromide dalam 1 liter H_2SO_4 1N)
2. Aseton

Peralatan

1. Pendingin tegak
2. Pemanas Listrik
3. Filter gelas 2-G-3
4. Oven Pengering $100^{\circ}C$
5. Tanur $400-500^{\circ}C$
6. Timbangan Analitik
7. Desikator

Prosedur Kerja

1. Timbang sampel bentuk tepung lolos ayakan 30 mesh sebanyak 1 gram dan masukan ke dalam erlenmeyer.
2. Tambahkan 100 ml larutan ADF, didihkan pada pendingin tegak selama 60 menit.
3. Saring melalui filter gelas 2-G-3, endapan yang diperoleh dicuci dengan aquades panas beberapa kali.
4. Endapan dicuci kembali dengan aseton beberapa kali.
5. Keringkan filter gelas dan endapan dalam oven $100^{\circ}C$ sampai diperoleh berat yang tetap (sekitar 8 jam), timbang.
6. Abukan endapan dengan tanur yang bersuhu $450-500^{\circ}C$ sehingga diperoleh berat yang tetap (sekitar 3 jam), timbang.

Perhitungan

A = berat filter dan endapan setelah dikeringkan (gram)

B = berat filter dan endapan setelah di abukan (gram)

W = berat awal sampel (gram)

$$\text{Kadar ADF (\%)} = \frac{(A - B) \times 100\%}{W}$$

2. Penetapan Serat Makanan dengan metode Neutral Detergent Fiber (NDF) (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Metode ini menganalisa serat yang larut dalam deterjen netral. Metode ini hanya menghitung komponen-komponen struktural dinding sel, yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin.

Prinsip

Sampel diekstrak dengan larutan NDF sehingga seluruh komponen selain komponen NDF larut. Komponen yang tidak larut kemudian kemudian disaring dan dikeringkan, ditimbang dan dikoreksi dengan mineralnya yang ada dalam komponen tersebut. Untuk sampel yang mengandung pati, maka patinya harus dihidrolisis dulu dengan menggunakan enzim α - amylase, jika tidak pati tersebut akan menyulitkan penyaringan.

Larutan NDF yang mengandung sodium lauril sulfat sangat baik untuk melarutkan protein interseluler. Dan penggunaan enzim α - amylase adalah untuk menghilangkan pati pada analisis sehingga diperoleh hasil yang baik.

Pereaksi

1. Larutan NDF

18,16 gram EDTA-2Na, 6.81 gram $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 30 gram sodium lauril sulfat, 4.56 gram Na_2HPO_4 dan 10 ml 2-ethoxy-ethanol dilarutkan sampai 1 liter, sehingga pH 6.9 - 7.1.

2. Larutan α - amylase

α - amylase sebanyak 1 gram dimasukkan dalam 1 liter buffer fosfat, yaitu 0.067 M buffer fosfat (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4), pH 7.0 \pm 0.05.

3. Aseton.

Peralatan

1. Erlenmeyer
2. Timbangan analitik
3. Desikator
4. Inkubator 40^oC
5. Pendingin tegak
6. Filter gelas 2-G-3
7. Oven pengering 100^oC
8. Tanur 400^oC - 450^oC

Prosedur kerja

1. Timbang 0.5 gram sampel dan masukkan ke dalam erlenmeyer,
2. Tambahkan 30 ml larutan α -amilase dan inkubasi pada suhu 40^oC selama 16 jam (semalam),
3. Tambahkan 200 ml larutan NDF dan 0.5 gram Na₂SO₃,
4. Didihkan campuran pada pendingin tegak selama 60 menit,
5. Saring campuran melalui filter glass 2-G-3 dan cuci dengan aquades panas beberapa kali,
6. Bilas endapan dengan aseton beberapa kali,
7. Keringkan filter dan endapan pada oven bersuhu 100^oC sampai diperoleh berat yang tetap,
8. Abukan filter dan endapan pada tanur bersuhu 400^oC - 450^oC sampai diperoleh berat yang tetap.

Perhitungan

A : berat filter dan endapan setelah dikeringkan (gram)

B : berat filter dan endapan setelah diabukan (gram)

W : berat awal sampel (gram)

$$\text{Kadar NDF (\%)} = \frac{(A - B) \times 100\%}{W}$$

VI PENETAPAN KADAR LEMAK

A. Metode Ekstraksi Soxhlet (Andarwulan, 2011)

Pendahuluan

Lemak pangan merupakan komponen yang heterogen, oleh karena itu analisis terhadap komponen penyusun lemak menjadi sangat kompleks. Sampai saat ini, metode standar untuk ekstraksi lemak belum tersedia. Metode-metode yang telah digunakan biasanya tergantung pada jenis sampel yang dianalisa dan jenis analisa yang akan dilakukan pada sampel tersebut setelah ekstraksi lemak.

Analisa komponen lemak jarang dilakukan untuk keperluan yang bersifat rutin karena sifatnya yang kompleks dan membutuhkan waktu. Analisa kandungan lemak total biasanya dilakukan dengan jalan ekstraksi menggunakan pelarut.

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi ketelitian analisis metode Soxhlet, diantaranya ukuran partikel sampel, jenis pelarut, waktu ekstraksi, dan suhu ekstraksi. Makin kecil ukuran sampel, maka kontak permukaan bahan dengan pelarut akan semakin luas sehingga proses ekstraksi lebih efisien. Setiap pelarut organik mempunyai polaritas yang berbeda, pelarut yang mempunyai polaritas yang paling sesuai dengan polaritas lemak akan memberikan hasil ekstraksi yang lebih baik. Semakin lama waktu ekstraksi maka jumlah lemak yang terekstrak oleh pelarut akan semakin banyak sampai suatu saat lemak pada sampel habis. Semakin tinggi suhu, maka ekstraksi akan semakin cepat. Pada ekstraksi soxhlet, suhu yang digunakan harus disesuaikan dengan titik didih pelarut yang digunakan. Jika suhu yang digunakan lebih tinggi dari titik didih pelarutnya akan menyebabkan ekstraksi tidak terkendali dan bisa menimbulkan resiko terjadinya ledakan atau kebakaran.

Hasil ekstraksi soxhlet akan diperoleh komponen triasil gliserol, asam lemak, sterol dan lain sebagainya.

Prinsip

Lemak diekstrak dengan pelarut dietil eter atau pelarut lemak lainnya. Setelah pelarutnya diuapkan, lemaknya dapat ditimbang dan dihitung persentasenya.

Pereaksi

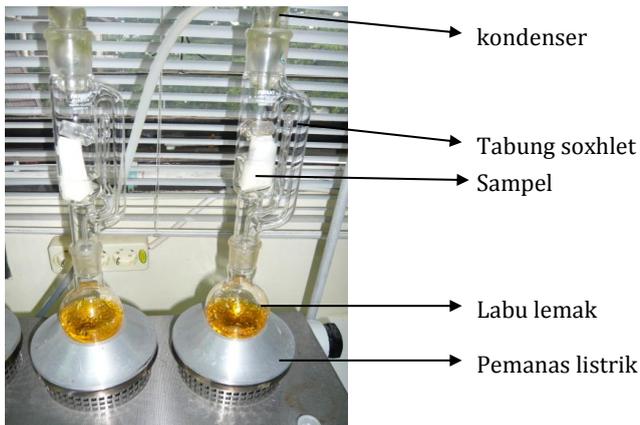
1. Pelarut Lemak (dietil eter atau petroleum eter, atau n – heksana)

Peralatan

1. Alat ekstraksi soxhlet lengkap dengan kondenser dan labu lemak,
2. Alat pemanas listrik atau penangas uap,
3. Oven,
4. Timbangan analitik.
5. Saringan thimble atau kertas saring
6. Kapas

Perhitungan

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{\text{Berat lemak (g)} \times 100\%}{\text{Berat sampel (g)}} = \frac{b - a \times 100\%}{\text{Berat sampel (g)}}$$



Gambar 10. Rangkaian ekstraksi lemak metode soxhlet

B. Metode Babcock (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Analisis kadar lemak dengan metode babcock digunakan untuk menentukan kadar lemak contoh cair atau pasta. Metode ini sering digunakan untuk penetapan kadar lemak susu dan santan. Lemak susu, santan berada dalam bentuk emulsi O/W (lemak dalam air). Emulsi ini dapat dipecah dengan menggunakan asam kuat, sentrifuse dan pemanasan.

Lemak susu yang bersifat nonpolar akan terpisah dari komponen susu lainnya yang bersifat polar. Lemak susu yang mempunyai densitas lebih rendah akan berada di bagian atas permukaan sampel. Sedangkan komponen polar sampel susu yang mempunyai densitas lebih tinggi akan berada di bagian bawah sampel.

Prinsip

Lemak dalam susu berada dalam bentuk emulsi. Emulsi ini dihancurkan dengan menggunakan H_2SO_4 dan dengan menggunakan sentrifuse dan atau pemanasan. Lemak dalam susu dapat dipisahkan dan dapat diukur kadarnya pada botol yang telah dikalibrasi (Botol Babcock).

Pereaksi

1. H_2SO_4 pekat. Berat jenis 1.80 – 1.83

Peralatan

1. Penangas air/water bath
2. Pipet volumetrik
3. Sentrifuse yang dilengkapi dengan pemanas
4. Botol Babcock standar, skala 0 – 8%, kapasitas 18 gram



Gambar 11. Botol Babcock, kapasitas 18 g

Prosedur Kerja

1. Pipet 17.6 ml susu bersuhu 22^oC, masukkan ke dalam botol Babcock.
2. Tambahkan 17.5 ml H₂SO₄ pekat bersuhu 22^oC.
3. Kocok dengan cara rotasi sampai seluruh susu larut semuanya "curd" hilang.
4. Tempatkan botol Babcock ke dalam alat sentrifuse bersuhu 60^oC, lakukan sentrifuse pada 700 – 1000 rpm selama 5 menit.
5. Tambahkan air panas (60^oC) ke dalam botol Babcock sampai batas skala terbawah. Sentrifuse lagi selama 2 menit pada suhu 60^oC.
6. Tambahkan lagi air panas (60^oC) ke dalam botol Babcock sampai sedikit dibawah batas skala teratas. Sentrifuse lagi selama 1 menit pada suhu 60^oC.
7. Tempatkan botol Babcock dalam penangas air 55 - 60^oC sampai batas skala teratas berada dibawah permukaan. Biarkan selama 5 menit.
8. Ambil botol dari penangas, ukur tingginya komponen lemak yang terbentuk di bagian atas botol.

Perhitungan

Kadar Lemak (%) = Volume lemak yang terbentuk.

C. Metode Modifikasi Babcock (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Metode ini digunakan untuk penetapan kadar lemak secara cepat untuk bahan-bahan ikan segar, ikan olahan dan cocok sebagai “*screening test*”. Metode ini perlu dilakukan penghancuran (*digestion*) menggunakan asam sulfat pekat dengan waktu lebih lama dibandingkan sampel susu. Dengan demikian lemak dari jaringan bahan akan keluar dengan optimal.

Prinsip

Sampel ikan di “*digest*” dengan menggunakan asam sulfat panas. Lemak akan terpisah dari fase aqueous dan kadarnya dapat diukur pada botol yang telah dikalibrasi.

Pereaksi

1. Asam sulfat pekat. Berat jenis 1.80 – 1.83
2. Zephiran

Peralatan

1. Timbangan analitik
2. Botol Babcock untuk skim (atau krim sampel berkadar lemak tinggi) kapasitas 9 gram
3. Heated Babcock centrifuge atau penangas air.

Prosedur Kerja

1. Timbang 9 ± 0.1 gram sampel dalam gelas piala 50 ml
2. Tambahkan 10 ml air hangat dan campur merata dengan menggunakan gelas pengaduk. Untuk “*fish balls*” dan produk-produk emulsi yang mengandung pati, tambahkan 1 ml zephiran,
3. Untuk produk-produk daging utuh, tambahkan dengan hati-hati 20 ml asam sulfat 92%. Untuk “*fish balls*” dan produk olahan ikan lainnya tambahkan 12 ml asam sulfat 92%. Sebentar-sebentar campuran digoyang-goyang sampai seluruh bahan tercerna sempurna (*terdigest sempurna*). Jika selama 10 menit belum seluruhnya tercerna maka perlu ditambahkan lagi asam sulfat sebanyak 5 ml,

4. Pindahkan isi gelas piala secara kuantitatif kedalam botol Babcock dengan cara menuangnya lalu cucilah residu yang ada dalam gelas piala dengan air panas (80°C) sebanyak dua kali masing-masing 10 ml,
5. Tambahkan air panas ke dalam botol secara berhati-hati sampai permukaan cairan berada 10 mm di bawah batas skala teratas.
6. Sentrifuse botol dalam Heated Babcock centrifuge selama 3 menit. Alternatif lain, biarkan botol dalam penangas air 70°C, permukaan air pada penangas di atas batas kolom lemak.
7. Ukur panjang kelompok lemak di dalam botol sesuai dengan skala

Perhitungan

Kadar Lemak (%) = Volume lemak yang terbentuk.

D. Metode Hidrolisis Asam (Apriyantono, 1989)

1. Hidrolisis Asam – Soxhlet

Pendahuluan

Pengukuran kadar lemak dengan menggunakan metode hidrolisis-soxhlet, yaitu penetapan kadar lemak dengan ekstraksi soxhlet tapi sebelumnya sampel mengalami perlakuan terlebih dahulu yaitu dihidrolisis (dipecah) dengan asam agar kandungan lemak yang ada di dalam sampel bebas/tidak terikat lagi. Metode ini biasanya digunakan untuk produk yang dipanggang, tepung-tepungan, penghias makanan, kasein, produk susu, telur, coklat dan ikan.

Prinsip

Ekstraksi lemak dengan menggunakan pelarut nonpolar setelah sampel dihidrolisis dalam suasana asam untuk membebaskan lemak yang terikat.

Pereaksi

1. Larutan Asam Klorida, HCl 25%
2. n – heksana atau pelarut lemak lainnya.

Peralatan

1. Kertas saring
2. Kertas saring pembungkus (thimble)
3. Kertas Lakmus
4. Labu lemak
5. Alat Ekstraksi soxhlet
6. Neraca Analitik
7. Gelas piala
8. Gelas Arloji
9. Oven

Prosedur Kerja

1. Timbang dengan tepat 1 – 2 gram sampel ke dalam gelas piala
2. Tambahkan 30 ml HCl 25% dan 20 ml air serta beberapa batu didih.
3. Tutup gelas piala dengan kaca arloji dan didihkan selama 15 menit.
4. Saring dalam keadaan panas dan cuci dengan air panas hingga tidak bereaksi asam lagi.
5. Gunakan kertas lakmus untuk mengecek bebas asam
6. Keringkan kertas saring berikut isinya pada suhu 100 -105°C
7. Setelah kering, masukkan ke dalam kertas saring pembungkus (paper thimble) dan ekstrak dengan heksana atau pelarut lemak lainnya selama 5 – 6 jam pada suhu lebih kurang 80°C
8. Suling larutan heksana atau pelarut lemak lainnya.
9. Keringkan ekstrak lemak pada suhu 100 -105°C.
10. Dinginkan dan ditimbang
11. Ulangi proses pengeringan ini hingga diperoleh bobot tetap.

Perhitungan

$$\text{Kadar Lemak (\%)} = \frac{(w1 - w2) \times 100\%}{w}$$

w = bobot sampel (gram)

w1 = bobot labu lemak sesudah ekstraksi (gram)

w2 = bobot labu lemak sebelum ekstraksi (gram)

2. Hidrolisis Asam - Mojonnier (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Pengukuran kadar lemak dengan menggunakan metode hidrolisis-Mojonnier yaitu penetapan kadar lemak dengan ekstraksi mojonnier yang sebelumnya sampel mengalami perlakuan terlebih dahulu yaitu dihidrolisis. Metode ini biasanya digunakan untuk produk keju, pasta coklat, susu kental manis, dan es krim.

Prinsip

Lemak dari sampel diekstrak dengan eter dan ditetapkan secara gravimetrik setelah diasamkan.

Pereaksi

1. HCl (36.5 – 38.0 %)
2. Ethyl eter
3. Petroleum eter

Peralatan

1. Tabung ekstraksi Mojonnier,
2. Penangas air,
3. Gelas piala 125 ml,
4. Batu didih,
5. Desikator,
6. Timbangan analitik

Prosedur Kerja

1. Gelas piala 125 ml dan batu didih dikeringkan dalam oven kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang (=a **gram**)
2. Timbang contoh sebanyak 3 gram dalam tabung ekstraksi lemak Mojonnier
3. Tambahkan 10 ml HCl pekat, kocok hati-hati dan tempatkan pada penangas air bersuhu 70°C,
4. Didihkan selama 30 menit, kocok tabung secara hati-hati setiap

5 menit. Angkat tabung dari penangas air, tambahkan sejumlah aquades sampai hampir mengisi bagian bawah tabung dan dinginkan sampai suhu kamar

5. Tambahkan 25 ml ethyl eter dan kocok
6. Tambahkan 25 ml petroleum eter (yang sudah didestilasi), kocok dan diamkan sampai terbentuk lapisan yang jernih
7. Tuangkan larutan eter-lemak ke dalam gelas piala 125 ml yang berisi batu didih.
8. Cairan dalam tabung Mojonnier diekstraksikan kembali 2 kali masing-masing dengan 15 ml ethyl eter. Larutan eter-lemak yang jernih dituangkan pada gelas piala yang sama
9. Larutan eter-lemak dievaporasi pada penangas air kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 100°C sampai beratnya konstan kurang lebih selama 90 menit, dinginkan dalam desikator dan ditimbang (=b gram)
10. Lakukan penetapan blanko terhadap reagent yang digunakan

Perhitungan

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{\text{Hasil penetapan contoh} - \text{blanko} \times 100\%}{\text{Berat contoh (gram)}}$$

$$\text{Hasil penetapan contoh} = b - a$$

E. Analisis Komposisi Asam Lemak Penyusun Lemak atau Minyak (Andarwulan, 2011)

Pendahuluan

Lemak/minyak terdiri dari trigliserida campuran yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak rantai panjang. Trigliserida dapat berwujud padat atau cair tergantung asam lemak penyusun lemak atau minyak.

Prinsip

Mengubah komponen asam lemak pada lemak/minyak menjadi senyawa *volatile* berupa metil dan ester. Metil ester asam lemak dipisahkan dengan GLC secara partisi. Komponen yang keluar dari kolom dideteksi dengan alat detektor ionisasi nyala api (*Flame*

Ionization Detector/FID). Hasil deteksi ini dapat diidentifikasi jenis dan jumlah asam lemak yang terdapat pada sampel dengan cara melakukan perbandingan terhadap standar yang telah diketahui jenis dan konsentrasi masing-masing asam lemak penyusunnya.

Pereaksi

1. NaOH 0,1N
2. Air destilat
3. Gas N₂
4. Heksana
5. Metanol
6. HCl 0,1N
7. Na₂SO₄ Anhydrous, standar internal (C:17)
8. NaOH /MeOH 0,5N
9. BF₃ metanol (14%b/v, NaCl jenuh)
10. Standar eksternal asam lemak yang telah diketahui komposisinya.

Peralatan

1. Seperangkat alat kromatografi gas (Shimadzu GC-9AM, Japan) dengan kromatopac (Shimadzu C-R6A) untuk identifikasidan kolom kapiler DB-23 (60 m x 0.25 mm i.d, J & W Scientific, Folsom, CA)
2. Neraca analitik
3. Pipet tetes
4. Pipet Mohr 5 ml
5. Pipet volumetric 1 ml
6. *Hotplate*
7. Penangas air
8. Tabung reaksi tertutup
9. *Vortex*

Prosedur Kerja

Transmetilasi

1. Timbang ± 25 mg sampel
2. Tambahkan larutan internal standar (asam lemak margarat/C17:0)
3. Heksan dalam campuran diuapkan dengan N_2
4. Tambahkan 1.5 ml NaOH metanolik 0,5 N dan diisi dengan gas N_2 lalu ditutup rapat
5. Vorteks dan panaskan larutan dalam penangas bersuhu 100°C selama 5 menit
6. Setelah didinginkan ke dalam tabung ditambahkan 2 ml BF_3 metanol (14% b/v)
7. Tabung diisi dengan N_2 , ditutup rapat dan dipanaskan kembali pada suhu 100°C selama 30 menit
8. Tabung didinginkan dibawah air mengalir hingga mencapai suhu ruang
9. Ditambahkan dengan heksan dan divorteks
10. Ke dalam tabung segera ditambahkan larutan NaCl jenuh sebanyak 5 ml dan dikocok
11. Lapisan heksan dipisahkan dan diberi Na_2SO_4 anhidrous
12. Injeksikan ke dalam alat GLC.

Analisis GC

1. Suntikkan 1μ sampel ke dalam alat GC dengan menggunakan sistem langsung
2. Setting suhu injektor 250°C , suhu detektor 260°C , suhu kolom awal 140°C pertahankan selama 6 menit, penambahan suhu kolom $3^\circ\text{C}/\text{menit}$ hingga mencapai suhu 230°C dan pertahankan selama 25 menit
3. Tekanan gas helium (gas pembawa) digunakan pada tekanan $1 \text{ kg}/\text{cm}^2$, gas hydrogen dan udara masing-masing $0,5 \text{ kg}/\text{cm}^2$
4. Gunakan asam lemak standar sebagai pembanding untuk identifikasi asam lemak pada sampel.

Perhitungan

Jenis asam lemak dihitung dengan membandingkan RRT (Relatif Retentio Time) asam lemak pada sampel dengan RRT asam lemak pada standar eksternal.

$$RRT \text{ Alx} = \frac{RT \text{ Alx}}{RT \text{ C16:0}}$$

Keterangan: RRT = Relatif retention asam lemak x
RT Alx = Relatif time asam lemak x
RT C16:0 = Retention time asam lemak palmitat

$$\text{Alx} = \frac{A_{\text{alx}}}{\text{ASI}} \times \frac{\text{BSI}}{\text{BS}} \times \text{RF} \times 1000$$

Keterangan: Alx = Konsentrasi asam lemak tertentu dalam sampel (mg/g)

Aalx = Area asam lemak tertentu pada sampel

ASI = Area standar internal pada sampel

BSI = Berat SI yang ditambahkan pada sampel (mg)

BS = Berat sampel yang dimetilasi (mg)

RF = Respon faktor dari masing-masing asam lemak

$$\text{RF} = \frac{\text{ASI}}{A_{\text{alx}}} \times \frac{\text{Balx}}{\text{BSI}}$$

Keterangan:

RF = Respon faktor

ASI = Area standar internal pada standar eksternal

Aalx = Area asam lemak tertentu pada standar eksternal

BSI = Berat standar internal pada standar eksternal

Balx = Berat asam lemak x pada standar eksternal

VII PENETAPAN KADAR PROTEIN

A. METODE MIKRO KJELDAHL (AOAC, 1999)

Pendahuluan

Metode penetapan kadar protein dengan metode Kjeldahl umum digunakan untuk menentukan kandungan protein dalam bahan pangan. Metode ini didasarkan pada pengukuran kadar nitrogen total yang ada di dalam sampel. Kandungan protein dapat dihitung dengan mengasumsikan rasio tertentu antara protein terhadap nitrogen untuk sampel yang dianalisis. Karena unsur nitrogen bukan hanya berasal dari protein, maka metode ini umumnya mendasarkan pada asumsi bahwa kandungan nitrogen di dalam protein adalah sekitar 16%. Untuk mengubah dari kadar nitrogen ke dalam kadar protein, digunakan angka faktor konversi sebesar $100/16$ atau 6.25.

Metode penetapan protein dengan metode Kjeldahl dapat digunakan untuk analisis protein semua jenis bahan pangan. Metode ini telah dijadikan sebagai metode resmi yang diakui oleh AOAC. Salah satu kelemahan metode ini mengukur bukan hanya nitrogen pada protein, tetapi juga nitrogen dari non-protein, dengan demikian informasi kadar protein dalam nitrogen dalam protein menjadi sangat penting untuk digunakan sebagai faktor konversi dalam perhitungan.

Penetapan kadar protein dengan metode Kjeldahl dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap penghancuran/destruksi (*digestion*), destilasi dan titrasi. Tahap penghancuran/destruksi (*digestion*) dilakukan dengan menambahkan asam kuat, yaitu asam sulfat dan dilakukan proses pemanasan. Tahap ini penting karena akan membebaskan nitrogen dari sampel. Potasium atau Sodium sulfat dapat ditambahkan untuk menaikkan titik didih asam, dan untuk mempercepat destruksi. Destruksi dapat pula ditingkatkan kecepatan dan kesempurnaannya dengan penambahan katalisator seperti tembaga, selenium, atau merkuri. Selama destruksi, protein akan terpecah dan nitrogen akan dikonversi menjadi ammonium sulfat.

Mengingat penggunaan asam sulfat pekat dan katalisator yang bersifat sangat beracun maka destruksi harus dilakukan diruang asap, dengan leher botol menghadap ke dinding. Aquades dapat ditambahkan

untuk membentuk proses destruksi, tetapi penambahannya harus dilakukan dalam keadaan dingin. Lama destruksi berbeda-beda tergantung jenis sampel. Pada akhir destruksi larutan harus tampak jernih tanpa ada bagian-bagian yang masih berwarna hitam. Reaksi yang terjadi selama proses destruksi :



Setelah proses destruksi, dilakukan proses destilasi. Larutan yang mengandung ammonium sulfat diperlakukan dengan penambahan alkali sodium hidroksida pekat (atau campuran sodium hidroksida dan sodium tiosulfat apabila merkuri digunakan sebagai katalisator) untuk menetralkan asam sulfat. Dengan adanya NaOH pekat ini, maka ammonium sulfat akan dipecah menjadi gas amoniak. Pada saat proses destilasi, gas amoniak kemudian akan menguap dan ditangkap oleh asam borat (H_3BO_3) membentuk $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$. Reaksi yang terjadi selama proses destilasi adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2\text{NaOH} \rightleftharpoons \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{NH}_3 + 2\text{H}_3\text{BO}_3 \rightleftharpoons 2\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$

Dalam tahap titrasi, senyawa $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ dititrasi dengan menggunakan asam klorida encer (0.02N), sehingga asam borat terlepas kembali dan terbentuk ammonium klorida. Jumlah asam klorida yang digunakan untuk titrasi setara dengan jumlah gas NH_3 yang dibebaskan dari proses destilasi. Dengan prinsip stokiometri maka akan diperoleh kesetaraan 1 mol HCl = 1 mol N = 14 gram N. Reaksi yang terjadi selama proses titrasi adalah $2\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3 + 2\text{HCl} \rightleftharpoons 2\text{NH}_4\text{Cl} + 2\text{H}_3\text{BO}_3$.

Prinsip

Penetapan protein berdasarkan oksidasi bahan-bahan berkarbon dan konversi nitrogen menjadi amonia. Selanjutnya ammonia bereaksi dengan kelebihan asam membentuk amonium sulfat. Larutan dibuat menjadi basa, dan ammonia diuapkan untuk kemudian diserap dalam larutan asam borat. Nitrogen yang terkandung dalam larutan dapat ditentukan jumlahnya dengan titrasi menggunakan HCl 0.02 N.

Pereaksi

1. Asam Sulfat pekat, berat jenis 1.84
2. Air Raksa Oksida (HgO)
3. Kalium Sulfat (K_2SO_4)

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

4. Larutan Natrium hidroksida – Natrium tiosulfat
(larutkan 60 gram NaOH dan 5 gram $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam air dan encerkan sampai 100 ml)
5. Larutan jenuh Asam Borat (H_3BO_3)
6. Larutan Asam Klorida (HCl) 0.02 N
7. Batu didih
8. Air Destilata
9. Indikator MM-MB (campuran 2 bagian 0.2% metilen red dalam etanol dan 1 bagian 0.2% metilen blue dalam etanol).
10. Indikator phenolftalein 1% (1 gram phenolftalein dalam 100 ml etanol)

Peralatan

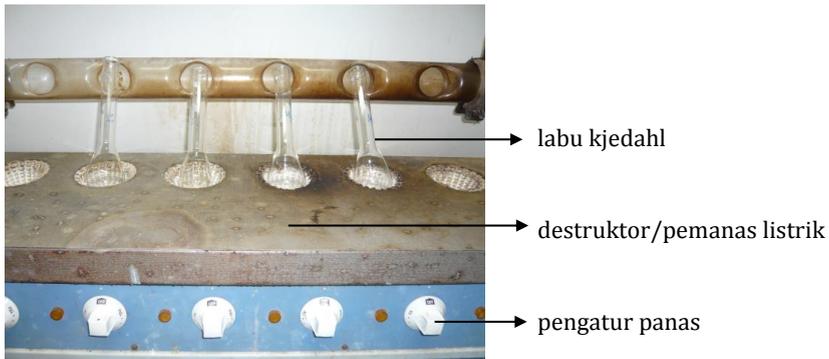
1. Pemanas Kjeldahl lengkap yang dihubungkan dengan penghisap uap melalui aspirator dalam ruang asam.
2. Labu Kjeldahl berukuran 30 ml
3. Alat Destilasi lengkap
4. Buret 50 ml
5. Labu Takar 100 ml, 1000 ml
6. Pipet ukur 2 ml, 5 ml, 10 ml
7. Erlenmeyer 100 ml, 250 ml
8. Gelas beaker 250 ml
9. Neraca analitik
10. Pengaduk magnetik
11. Pipet tetes

Prosedur Kerja

Tahap Destruksi (*digestion*)

1. Timbang sejumlah sampel (100 – 250 mg) ke dalam labu Kjeldahl
2. Tambahkan 1.0 ± 0.1 gram K_2SO_4 , 40 ± 10 mg HgO dan 2 ± 0.1 ml H_2SO_4

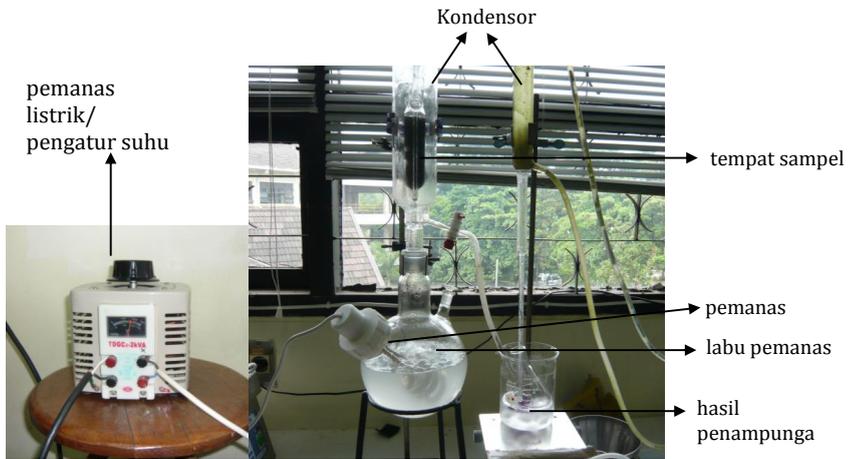
3. Tambahkan 2 – 3 butir batu didih. Didihkan sampel selama 1-1.5 jam dengan kenaikan suhu secara bertahap sampai cairan menjadi jernih dan dinginkan.



Gambar 12. Proses destruksi penetapan protein

Tahap Destilasi

1. Tambahkan sejumlah kecil aquades secara perlahan lewat dinding labu dan goyang pelan agar kristal yang terbentuk larut kembali
2. Pindahkan isi labu ke dalam alat destilasi dan bilas labu 5 – 6 kali dengan 1- 2 ml aquades.
3. Pindahkan air cucian ke labu destilasi dan tambahkan 8 – 10 ml larutan 60% NaOH-5%Na₂S₂O₃
4. Letakkan Erlenmeyer 250 ml yang berisi 5 ml larutan H₃BO₃ dan 2 – 4 tetes indikator metilen red-metilen blue di bawah kondensor. Ujung kondensor harus terendam di bawah larutan H₃BO₃
5. Lakukan destilasi sehingga diperoleh sekitar 15 ml destilat.



Gambar 13. Rangkaian alat destilasi protein

Tahap Titration

a. Standardisasi Larutan HCl 0.02 N

1. Pipet 25 ml larutan HCl 0.02 N ke dalam Erlenmeyer 250 ml, lalu tambahkan 2-3 tetes indikator fenolftalein 1%.
2. Titration larutan HCl 0.02 N dengan NaOH 0.02 N yang telah di standardisasi.
3. Catat volume NaOH yang diperlukan untuk titration hingga warna larutan berubah menjadi merah muda.
4. Hitung normalitas larutan HCl dengan menggunakan rumus :

$$N \text{ HCl} = \frac{(\text{ml NaOH}) (N \text{ NaOH})}{\text{ml HCl}}$$

b. Titration distilat dengan HCl 0.02 N standar

1. Encerkan destilat dalam erlenmeyer hingga kira-kira 50 ml.
2. Titration dengan HCl 0.02 N terstandar sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu
3. Catat volume HCl 0.02 N terstandar yang diperlukan untuk titration

c. Penetapan Blanko

1. Dengan prosedur yang sama seperti pada sampel, lakukan analisis untuk blanko (tanpa sampel)

2. Catat volume HCl 0.02 N standar yang digunakan untuk titrasi blanko

Perhitungan

$$\% N = \frac{(\text{ml HCl sampel} - \text{ml HCl blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14.007}{\text{mg sampel}} \times 100$$

$$\% \text{ Protein} = \% N \times \text{faktor konversi}$$

Gunakan faktor konversi pada Tabel 1 untuk menentukan kadar protein dari sampel. Bila sampel yang dianalisis tidak tercakup dalam tabel, gunakan faktor konversi 6.25.

Tabel 1 Faktor konversi untuk mengkonversi persen nitrogen menjadi protein

Jenis Pangan	X (%N dalam protein)	Faktor Konversi F (100/X)
Campuran	16.00	6.25
Daging	16.00	6.25
Maizena	16.00	6.25
Roti, gandum, macaroni, bakmi	16.00	6.25
Susu dan produk susu	15.66	6.38
Tepung	17.54	5.70
Telur	14.97	6.68
Gelatin	18.02	5.55
Kedelai	17.51	5.71
Beras	16.81	5.95
Kacang tanah	18.32	5.46

B. Metode Biuret (Andarwulan, 2011)

Pendahuluan

Metode Biuret pertama kali dikembangkan oleh Reigler tahun 1914. Metode ini merupakan salah satu cara yang terbaik untuk menentukan kadar protein suatu larutan.

Prinsip

Metode ini didasarkan pada prinsip bahwa zat yang mengandung dua atau lebih ikatan peptida (-CO-NH-) yang dapat membentuk kompleks berwarna abu-abu dengan gagan Cu dalam larutan alkali.

Ikatan peptida dari protein akan bereaksi dengan ion Cu^{2+} membentuk kompleks berwarna abu-abu. Intensitas warna abu-abu tersebut berbanding langsung dengan konsentrasi protein, dimana semakin meningkat intensitas warnanya konsentrasi protein semakin besar. Intensitas warna abu-abu ini dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi tidak tergantung pada jenis protein, karena seluruh protein pada dasarnya mempunyai jumlah ikatan peptida yang sama persatuan berat. Hanya sedikit senyawa lain yang mengganggu reaksi, misalnya urea (mengandung gugus -CO-NH-) dan gula pereduksi yang akan bereaksi dengan ion Cu^{2+} .

Pereaksi

1. Pereaksi Biuret

Larutkan 3 gram $\text{CuCO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 9 gram Na K Tartarat dalam 500 ml larutan NaOH 0.2 N. Tambahkan 5 gram KI kemudian encerkan sampai 1000 ml dengan menggunakan larutan NaOH 0.2 N.

2. Larutan Protein Standar

Buat larutan Bovine Serum Albumin dalam air dengan konsentrasi 5 mg/ml. Ukur kadar air serum albumin, nyatakan konsentrasi dengan dasar berat kering (agar lebih tepat).

Peralatan

1. Spektrofotometer
2. Sentrifuse
3. Waring blender
4. Tabung reaksi bertutup

Prosedur Kerja

Pembuatan Kurva Standar

1. Masukkan ke dalam tabung reaksi 0 (blanko), 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, dan 1 ml larutan standar.
2. Tambahkan air sampai volume total masing-masing 4 ml.
3. Tambahkan 6 ml pereaksi Biuret ke dalam masing-masing tabung reaksi
4. Vortek (pengaduk khusus) masing-masing tabung reaksi
5. Simpan tabung reaksi pada suhu 37°C selama 10 menit atau pada suhu kamar (30°C) selama 30 menit sampai terbentuk warna ungu sempurna.
6. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm.

Persiapan sampel

1. Sampel harus berupa cairan, jika berbentuk padatan maka harus dihancurkan dulu dengan menggunakan waring blender dan penambahan air. Hancuran yang diperoleh disaring lalu disentrifuse. Supernatan didekantansi untuk dipergunakan selanjutnya. Protein yang terukur pada supernatan adalah "soluble protein" (perhatikan faktor pengenceran).
2. Jika cairan berupa larutan protein seperti protein konsentrat, isolate yang tidak keruh maka persiapan sampel cukup dengan pengenceran secukupnya saja. Jika cairannya keruh atau mengandung bahan- bahan yang mengganggu seperti glukosa maka harus dilakukan perlakuan sebagai berikut.
 1. Alikuot atau ekstrak didistribusikan ke dalam tabung reaksi seperti pada waktu penetapan standar, kemudian ditambahkan air sampai volume total masing-masing 1 ml.
 2. Kedalam masing-masing tabung reaksi tambahkan 1 ml Trichloro Acetic Acid (TCA) 10% sehingga protein akan terdenaturasi.
 3. Sentrifuse pada 3000 rpm selama 10 menit sampai protein yang terdenaturasi mengendap, supernatant dibuang dengan cara dekantansi.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

4. Ke dalam endapan tambahkan 2 ml etil eter , campur merata, kemudian sentrifuse kembali. Ini akan menolong menghilangkan residu TCA. Biarkan mengering pada suhu kamar.
5. Ke dalam endapan kering ditambahkan 4 ml air, campur merata.
6. Tambahkan 6 ml pereaksi Biuret, alkali dalam pereaksi ini akan melarutkan endapan yang tersisa.

Penetapan sampel.

Pipet dengan tepat 0.1 s.d 1.0 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diperlakukan seperti menetapkan standar.



Gambar 14. Alat sentrifuse

C. Metode Lowry (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Metode Lowry merupakan metode pengukuran protein yang mempunyai keuntungan 100 kali lebih sensitive dari metode biuret karena selain reaksi antara ion Cu^{2+} dengan ikatan peptida juga reduksi asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat oleh tirosin dan triftofan yang merupakan residu protein.

Prinsip

Reaksi antara ion Cu^{2+} dengan ikatan peptide dan reduksi asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat oleh tirosin dan triftofan yang merupakan residu protein yang akan menghasilkan warna biru. Warna yang terbentuk terutama dari hasil reduksi fosfomolibdat dan fosfotungstat sehingga warna yang terbentuk tergantung pada

kadar tirosin dan triptofan dalam protein. Senyawa fenolik yang juga membentuk warna biru dalam metode Lowry ini dapat mengganggu hasil penetapan protein. Gangguan ini dapat dihilangkan dengan cara mengendapkan protein dengan TCA, hilangkan supernatannya lalu melarutkan kembali endapan protein yang diendapkan oleh TCA tadi, baru dianalisa selanjutnya.

Pereaksi

1. Natrium karbonat 2% dalam larutan NaOH 0.1N
2. Tembaga Sulfat 0.5% dalam larutan Na K tartarat 1% (dibuat jika hanya pada waktu akan digunakan).
3. Campuran 50 ml pereaksi (1) dengan 1 ml pereaksi (2), dibuat jika hanya pada waktu akan digunakan, hanya stabil selama 1 hari.
4. Pereaksi Folin Ciocalteau (pereaksi fenol). Biasanya tersedia secara komersial, larutkan dengan air 1 : 1 sebelum digunakan. Peraksi ini dapat dibuat sendiri dengan cara sebagai berikut :
Masukkan 100 gram natrium tungstat, 25 gram natrium molibdat, 500 ml aquades, 50 ml asam fosfat 85% dan 100 ml HCl pekat ke dalam labu 2 liter. Campuran ini kemudian direfluks dengan hati-hati selama 10 jam dengan menggunakan kondensor. Sesudah didinginkan, tambahkan ke dalam labu 150 gram litium sulfat, 50 ml aquades dan beberapa tetes Br₂ (brom), pendidihan dilanjutkan lagi selama 10 menit dengan tanpa kondensor. Sesudah pendinginan volume larutan dijadikan 100 ml dan saring jika perlu. Filtrat tidak boleh ada warna kehijauan, jika ada pendidihan harus dilakukan sekali lagi. Ini merupakan "*stock reagent*", larutkan dengan air 1 : 1 sebelum digunakan.
5. Larutan Protein Standar 0.25 mg/ml (larutan bovine serum albumin)

Peralatan

1. Spektrofotometer
2. Sentrifuse
3. Waring blender
4. Tabung reaksi bertutup

Prosedur Kerja

Pembuatan Kurva Standar

1. Masukkan ke dalam tabung reaksi : 0 (blanko), 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 dan 1.0 ml protein standar.
2. Tambahkan aquades sampai volume total masing-masing 4 ml.
3. Tambahkan 5.5 ml pereaksi (3) ke dalam masing-masing tabung reaksi, campur merata dan biarkan selama 10 – 15 menit pada suhu kamar.
4. Tambahkan 0.5 pereaksi (4) ke dalam masing-masing tabung reaksi, kocok merata dengan cepat setelah penambahan.
5. Biarkan selama kurang lebih 30 menit sampai warna biru terbentuk
6. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.
7. Buat kurva standar.

Persiapan sampel

1. Sampel harus berupa cairan, jika berbentuk padatan maka harus dihancurkan dulu dengan menggunakan waring blender dan penambahan air. Hancuran yang diperoleh disaring lalu disentrifuse. Supernatan didekantansi untuk dipergunakan selanjutnya. Protein yang terukur pada supernatan adalah “*soluble protein*” (perhatikan faktor pengenceran).
2. Jika cairan berupa larutan protein seperti protein konsentrat, isolate yang tidak keruh maka persiapan sampel cukup dengan pengenceran secukupnya saja. Jika cairannya keruh atau mengandung bahan- bahan yang mengganggu seperti glukosa maka harus dilakukan perlakuan sebagai berikut.
 1. Alikuot atau ekstrak didistribusikan ke dalam tabung reaksi seperti pada waktu penetapan standar, kemudian ditambahkan air sampai volume total masing-masing 1 ml.
 2. Kedalam masing-masing tabung reaksi tambahkan 1 ml Trichloro Acetic Acid (TCA) 10% sehingga protein akan terdenaturasi.
 3. Sentrifuse pada 3000 rpm selama 10 menit sampai protein yang terdenaturasi mengendap, supernatant dibuang dengan cara dekantansi.

4. Ke dalam endapan tambahkan 2 ml etil eter, campur merata, kemudian sentrifuse kembali. Ini akan menolong menghilangkan residu TCA. Biarkan mengering pada suhu kamar.
5. Ke dalam endapan kering ditambahkan 4 ml air, campur merata.
6. Tambahkan 6 ml pereaksi Biuret, alkali dalam pereaksi ini akan melarutkan endapan yang tersisa.

Penetapan sampel.

Pipet dengan tepat 0.1 s.d 1.0 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diperlakukan seperti menetapkan standar.

Tentukan kadar protein dengan memanfaatkan kurva standar.

D. Analisis Asam Amino (Muchtadi, 1989)

Pendahuluan

Analisis asam amino bertujuan untuk mengetahui jenis dan jumlah asam amino terutama asam amino esensial yang terdapat dalam suatu protein bahan pangan. Data yang diperoleh dari analisis asam amino sangat berguna untuk memperkirakan dan meningkatkan nilai gizi protein dengan cara suplementasi oleh asam amino yang kekurangan atau komplementasi antara dua macam protein sehingga diperoleh campuran komposisi asam amino yang lebih baik.

Metode analisis asam amino memerlukan perlakuan pendahuluan yaitu menghidrolisis protein menjadi asam amino bebas. Prosedur analisis terhadap asam amino spesifik untuk setiap bahan pangan karena komposisi protein dari suatu bahan pangan berbeda-beda.

Sampel Homogen dan Mengandung Kadar Protein Tinggi

Peralatan :

1. Timbangan
2. Pipet
3. Tabung reaksi
4. Gas oksigen
5. Oven

6. Refrigerator
7. Sentrifus
8. Desikator vakum
9. Rotary evaporator
10. Kromatografi kolom

Prosedur Kerja:

1. Timbang (pipet bila sampel cair) 2 - 5 mg protein dan masukkan ke dalam tabung reaksi pyrex standar berukuran 18 x 150 mm yang telah dicuci terlebih dahulu dengan NaOH encer, dibilas dan dikeringkan dalam oven.
2. Sampel yang berupa padatan, dipipet ke dalam tabung: (a) 0,5 ml larutan HCl pekat (reagent-grade) diikuti 0,5 ml air destilata atau (b) 1,0 ml larutan HCl 6 N yang telah didestilasi terlebih dahulu dengan peralatan gelas. Jika sampel berupa cairan, pipet ke dalam tabung sejumlah volume yang sama HCl pekat (reagent-grade).
3. Panaskan leher tabung dengan daerah sekitar 1,5 cm dari ujung tabung dengan menggunakan api gas-oksigen.
4. Setelah menyala, tarik ujung sampai terbentuk kapiler dengan diameter sekitar 1-3 mm, perhatikan agar dinding gelas tabung tidak menjadi terlalu tipis dan sampel tidak berada pada daerah tabung yang dipanaskan.
5. Setelah campuran asam dan sampel memadat dalam tabung, sambungkan ujung tabung ke alat pompa vakum sampai tekanan mencapai 50 Hg atau kurang. Gunakan Tygon tubeglass adapter untuk menyambungkan ujung tabung ke pompa vakum. Sebaiknya siapkan suatu trap es kering/alcohol untuk membekukan semua gas korosif/volatile dari sampel sebelum mencapai pompa vakum.
6. Setelah tabung sampel divakumkan, angkat tabung dari penangas es kering/alcohol dan dengan api gas oksigen tutuplah tabung ketika masih dalam keadaan vakum.
7. Letakkan tabung sampel dengan posisi berdiri dalam oven (110 °C + 1°C selama 22 jam), dianjurkan menggunakan oven yang disirkulasikan secara mekanis.

8. Ambil tabung dari oven dalam keadaan berdiri untuk menghindari mengalirnya sampel ke bagian atas tabung, lalu dinginkan tabung serta isinya dalam refrigerator atau penangas es.
9. Potong bagian atas tabung dengan cara membuat keratin pada tabung dan memanaskannya dengan api.
10. Hilangkan setiap endapan dalam hidrolisat dengan menggunakan sentrifugasi, akan tetapi penyaringan juga dapat dilakukan bila kertas saring terlebih dahulu dicuci dan dikeringkan (untuk menghilangkan amoniak dan senyawa lain yang bereaksi dengan ninhidrin).
11. Hilangkan HCl dan evaporasikan sampel sampai kering, jika volume total 2 ml atau kurang HCl dapat dihilangkan dengan cara : (a) letakkan tabung secara miring 15^oC dalam desikator vakum, (b) letakkan dalam desikator tersebut suatu piringan yang berisi pelet NaOH, (c) tutup desikator lalu vakumkan dengan aspirator air HCl akan menguap selama semalam. Jika volume total lebih dari 2 ml atau apabila sampel akan segera dianalisis, sampel akan dikeringkan dengan cepat dengan menggunakan rotary evaporator. Setelah kering, tambahkan sedikit air ke dalam sampel dan dikeringkan kembali.
12. Tambahkan sejumlah volume buffer sitrat pH 2,2 (0,20 N Na⁺) ke dalam tabung yang berisi sampel kering. Setelah semua bahan pelarut sampel siap siap untuk dianalisis, setiap padatan humin yang kelihatan selama pengeringan harus dihilangkan dengan cara penyaringan (misal dengan kertas saring whatman No.52). Jika sampel tidak akan segera dianalisis pindahkan ke dalam labu tertutup dan simpan pada suhu 4^oC.
13. Pipet sejumlah tertentu sampel untuk analisis dengan menggunakan kromatografi kolom.

Sampel Mengandung Karbohidrat dan/atau Lipid (Kadar Protein Rendah)

Peralatan:

1. Timbangan
2. Labu didih
3. Condenser refluks
4. Tabung gelas
5. Pemanas listrik
6. Sintered glass filter
7. Rotary evaporator
8. Labu ukur
9. Refrigerator/deep frizer

Prosedur Kerja:

1. Timbang sampel yang mengandung 12 + 1 mg N ke dalam labu didih 1000 ml.
2. Lalu tambahkan 300 ml HCl 6 N yang dibuat dari HCl pekat (reagent-grade) dengan menambahkan air destilata.
3. Hubungkan dengan kondensor refluks dan atur penempatan tabung gelas kecil untuk memungkinkan masuknya aliran gas nitrogen murni (N_{21}) di bawah permukaan asam.
4. Refluks selama 24 jam dalam pemanas listrik bermantel dengan mempertahankan aliran gas selama periode tertentu.
5. Setelah itu dinginkan sampai mencapai suhu kamar dan saring sambil dihisap melalui sintered glass filter dengan porositas medium untuk memisahkan humin dan cuci dua kali dengan air destilat.
6. Pindahkan filtrat ke dalam rotary evaporator dan evaporasi sampai kering di bawah vakum dengan mempertahankan suhu sampel di bawah 40°C.
7. Lakukan pencucian dua kali dengan 5 – 10 ml air destilat dan evaporasi lagi sampai kering.
8. Larutkan sampel dalam buffer sitrat pH 2,2 dan pindahkan ke dalam labu ukur 25 ml, tepatkan volumenya dengan buffer pencucian labu evaporator serta buffer baru. Jika diperlukan penyaringan maka lakukan dengan sintered glass filter yang terlebih dahulu dicuci dan dikeringkan.

9. Sampel bisa segera dianalisis atau disimpan dalam wadah tertutup dalam suatu refrigerator atau penyimpanan dalam jangka panjang dalam suatu deep freezer.
10. Sejumlah sampel yang diperlukan (aliquots) adalah sekitar 0,10 - 0,25ml, tergantung dari sensitivitas alat analisis asam amino.

Pro-Oxidasi Asam Performat untuk Asam-asam Amino Belerang (Sistein dan Sistin sebagai Asam Sisteat, dan Metionin sebagai Metionin Sulfon)

Peralatan:

1. Timbangan
2. Labu 500 ml
3. Deep freezer
4. Rotary evaporator
5. Kromatografi

Prosedur Kerja:

1. Siapkan pereaksi asam performat: Tambahkan 1,5 ml methanol (untuk mencegah pembekuan) dan 7,5 ml H₂O₂ 30% ke dalam 72 ml asam performat (98-100%). Biarkan campuran dalam suhu kamar selama 2 jam dalam wadah tertutup (untuk pembentukan asam performat secara maksimum).
2. Timbang sampel yang mengandung sekitar 7 mg nitrogen dan pindahkan ke dalam labu 500 ml yang berisi beberapa tetes asam performat (cukup untuk membasahi sampel). Dinginkan sampel dalam deep freezer hingga mencapai suhu -10 s/d -15°C selama 30 menit. Lalu tambahkan 25 ml asam performat, campuran diaduk-aduk selama semalam pada suhu 41°C.
3. Tambahkan 25 ml air destilat dan 2 ml HBr 40% (untuk menghilangkan kelebihan asam performat), lakukan pengadukan agar tercampur sempurna.
4. Kemudian evaporasi sampai kering dalam rotary evaporator dan sediakan larutan NaOH dalam labun penerima (receiver) untuk mengabsorpsi HBr.

5. Tambahkan 100 ml HCl 6 N, dan kerjakan seperti pengerjaan sampel berprotein rendah (urutan prosedur 2-9).
6. Untuk kromatografi, sekitar 0,1 – 0,25 ml sampel diperlukan tetapi pengerjaan diperpanjang sampai semua metionin sulfonin muncul.

Penentuan Triptofan

Peralatan :

1. Kromatografi
2. Desikator
3. Pompa vakum elektrik
4. Timbangan
5. Tabung sentrifus polipropilen
6. Vortex test tube shaker
7. Tabung reaksi standar soft glass
8. Penangas es

Pereaksi :

1. Tepung kentang terhidrolisis sebagian (antioksidan selama hidrolisis); sekitar 50g tepung kentang ditambahkan ke dalam 99 ml aseton yang telah dicampur dengan 1 ml HCl pekat. Biarkan campuran pada suhu 50°C selama 2 jam, lalu tambahkan 25 ml Na-asetat 1 M untuk menetralkan hidrolisat, dan slurr dituangkan ke dalam tabung kromatografi serta dicuci dengan 2L air destilat kemudian dengan aseton. Setelah itu keringkan produk dalam desikator menggunakan pompa vakum. Tepung kentang terhidrolisa sebagian komersial juga bisa digunakan tetapi harus dicuci terlebih dahulu dengan aseton dan dikeringkan. Tumbuk halus kedua macam tepung sebelum digunakan.
2. Bufer Na-sitrat (untuk loading): 0,20 N pH 4,25.
3. Bufer Na-sitrat (untuk kromatografi) : 0,21 N , pH 5,4 dibuat dari buffer standar (0,35 N) untuk asam amino basa dengan cara mengencerkan 3 bagian bufer dengan 2 bagian air tanpa ion (deionized water)

Prosedur Kerja:

1. Timbang sampel yang telah dihomogenkan dan mengandung sekitar 1,5 mg nitrogen ke dalam tabung sentrifus polipropilen (potong menjadi 10,9 x 50 mm dengan menggunakan silet).
2. Tambahkan sejumlah pati kentang yang telah dihidrolisis sebagian agar diperoleh berat total tabung sentrifus 60 mg.
3. Lalu tambahkan 0,2 mg air destilat 1,0 ml NaOH 5N dan 2 tetes oktanol 1% dalam toluene, campurkan dengan menggunakan vortex test tube shaker.
4. Masukkan ke dalam tabung reaksi standar soft glass kemudian bakar ujung tabung dan tarik hingga mengecil, setelah itu hampakan tabung dengan pompa vakum elektrik (diperlukan kevakuman tinggi) sambil tabung terus berada dalam es kering/aseton dan akhirnya tabung ditutup dengan cara pembakaran.
5. Lakukan hidrolisis pada suhu 110^oC selama 16 jam.
6. Dinginkan tabung, buka secara hati-hati, kemudian tambahkan 1 ml bufer Na-sitrat pH 4,25 dan campurkan.
7. Letakkan labu ukur 10 ml dalam penangas es, masukkan 0,42 ml HCl 6 N dan biarkan asam mendidih. Setelah itu pindahkan sampel ke dalam labu sedikit demi sedikit dengan menambahkan 0,5 ml Na-sitrat pH 4,25 beberapa kali, jangan biarkan suhu meningkat. (catatan: jumlah dan normalitas asam dan alkali harus tepat karena sampel sedang benar-benar dinetralkan).
8. Jika volume total dalam labu telah mencapai 8-9 ml biarkan mencapai suhu ruang dan tepatkan volumenya menjadi 10 ml.
9. Sebelum dikromatografi (sebaiknya dilakukan pada hari yang sama, bila memungkinkan) sampel harus disentrifus sampai jenuh.
10. Kromatografi : 1 ml sampel yang telah dinetralkan pada pH 4,25 dituangkan ke dalam tabung pendek (0,9 x 12 cm) resin Backman PA-35 atau yang sejenis digunakan dalam kolom. Kecepatan aliran buffer adalah 50 ml/jam pada suhu 52^oC. Bufer yang digunakan adalah Na-sitrat (0,21N untuk natrium pada pH 5,4). Pemisahan tergantung pada karakteristik spesifik alat yang digunakan.

VIII PENETAPAN VITAMIN

A. Vitamin C (Asam Askorbat)(Apriyantono, 1989)

Metode Oksidimetri I

Pendahuluan

Buah dan sayur merupakan sumber utama vitamin C (asam askorbat). Cara penetapan asam askorbat yang paling baik adalah yang didasarkan atas reduksi 2,6-diklorofenol indofenol oleh asam askorbat dan yang didasarkan atas reaksi dehidro-asam askorbat dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin.

Prinsip

Indofenol, sering disebut “dye” yang berwarna biru di dalam larutan basa dan merah di dalam larutan asam direduksi oleh asam askorbat membentuk dehidro-asam askorbat dan indofenol tereduksi yang tidak berwarna. Reaksi ini merupakan reaksi kuantitatif dan spesifik untuk asam askorbat di dalam larutan dengan kisaran pH 1 – 3.5

Pereaksi

1. Asam Metafosfat (HPO_3) 3% : Larutan HPO_3 batang/pellet dalam aquades.
2. Asam askorbat standar : Timbang tepat 100 mg asam askorbat dan larutkan dengan HPO_3 3% sampai volume 100 ml (1 ml = 0.1 mg asam askorbat). Simpan dalam lemari es dan jauhkan dari sinar matahari langsung.
3. Larutan dye : Larutkan 50 mg garam Na dari 2.6-diklorofenol indofenol di dalam \pm 150 ml aquades panas yang mengandung 42 mg sodium bikarbonat. Dinginkan kemudian encerkan sampai volume 200 ml dengan aquades, saring. Simpan dalam lemari es dalam botol berwarna coklat. Standarisasi setiap akan digunakan.

Peralatan

1. Mikroburet
2. Pipet ukur 10 ml, 20 ml.
3. Labu ukur 100 ml
4. Erlenmeyer 50 ml
5. Gelas ukur 100 ml
6. Blender
7. Kertas saring

Prosedur Kerja

Standarisasi Larutan dye :

1. Isi mikroburet dengan larutan dye
2. Pipet 5 ml larutan standar asam askorbat ke dalam erlenmeyer, kemudian tambahkan 5 ml HPO_3 3%.
3. Titrasi dengan larutan dye sampai berwarna merah jambu yang bertahan 15 detik.
4. Hitung "*factor dye*" sebagai mg asam askorbat per ml dye menggunakan rumus :

$$\text{Faktor dye} = \frac{0.5}{\text{ml titer}}$$

Persiapan sampel

1. Sari Buah : pipet 10 – 20 ml sampel ke dalam labu ukur 100 ml, encerkan dengan HPO_3 3% sampai tanda tera. Saring atau sentrifuse.
2. Makanan padat atau semi padat : Timbang 100 gram sampel, aduk dengan 50 – 60 ml HPO_3 3% dalam blender, encerkan sampai volume 100 ml dengan HPO_3 3%. Saring atau sentrifuse

Pengujian Ekstrak Sampel

1. Ambil 2 – 10 ml ekstrak sampel yang dihasilkan dari tahap persiapan sampel.
2. Titrasi perlahan-lahan dengan larutan dye sampai tercapai titik akhir, yaitu warna merah jambu yang bertahan 15 detik. Titer yang didapat merupakan titer pendahuluan yang digunakan untuk menentukan titer yang sebenarnya.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

3. Ulangi langkah (1), kemudian titrasi dengan larutan dye. Caranya : tambahkan hampir semua dye yang dibutuhkan (diketahui dari langkah 2), kemudian titrasi perlahan-lahan sampai tercapai titik akhir. (titer tidak boleh lebih dari 3 – 5 ml).

Catatan :

Apabila di dalam sampel yang diuji terdapat SO_2 , indofenol yang terdapat dalam dye akan tereduksi. Reaksi ini menyebabkan hasil analisa asam askorbat tidak tepat lagi. Oleh karena itu perlu dilakukan kalibrasi menggunakan prosedur kondensasi Formaldehid berikut ini:

1. Masukkan 10 ml filtrat ke dalam Erlenmeyer 50 ml
2. Tambahkan 1 ml formaldehid 40% dan 0.1 ml HCl
3. Diamkan selama 10 menit
4. Titrasi seperti langkah “pengujian ekstrak sampel”.

Perhitungan :

$$\text{mg Asam Askorbat per 100 g/100 ml sampel} = \frac{\text{Titer x faktor dye x volume ekstrak total} \times 100}{V \times B}$$

V = Volume ekstrak yang digunakan untuk penetapan

B = Berat/volume sampel yang digunakan untuk penetapan.

Metode Oksidimetri II

Pereaksi

1. Larutan Asam metafosfat – asam asetat : Larutkan dengan pengadukan 15 gram pekat HPO_3 dalam 40 ml asam asetat dan 200 ml H_2O , larutkan sampai 500 ml saring melalui kertas saring ke dalam botol. Simpan larutan dalam lemari es, larutan ini stabil selama 7 – 10 hari.
2. Standar Asam Askorbat
3. Larutan Standar Indofenol : Larutkan 50 mg garam natrium dari 2.6 diklorofenol indofenol dalam 50 ml air yang mengandung 42 mg NaHCO_3 , kocok hingga merata. Setelah larut encerkan sampai 200 ml dengan H_2O . Saring melalui kertas saring ke dalam botol berwarna coklat. Simpan secara tertutup di dalam lemari es dan jauhkan dari sinar matahari langsung.

Peralatan

1. Pipet ukur 5 ml, 10 ml, 20 ml.
2. Labu ukur 100 ml
3. Erlenmeyer 50 ml, 100 ml
4. Gelas ukur 100 ml

Prosedur Kerja

Standarisasi Larutan Indofenol

1. Timbang dengan tepat 100 mg standar asam askorbat, masukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan sampai tanda tera dengan larutan asam metafosfat-asam asetat.
2. Ambil tiga buah Erlenmeyer 50 ml yang masing-masing berisi 5 ml larutan asam metafosfat-asam asetat.
3. Tambahkan ke dalam masing-masing Erlenmeyer tersebut 2 ml larutan standar asam askorbat.
4. Titrasi segera dengan larutan indofenol sampai warna merah jambu muda terbentuk paling singkat 5 detik (setiap titrasi seharusnya membutuhkan 15 ml larutan indofenol dan keragamannya seharusnya berkisar ± 0.1 ml).
5. Lakukan juga titrasi terhadap tiga blanko yang terdiri dari 7.0 ml larutan asam metafosfat-asam asetat dan sejumlah H_2O yang setara dengan volume larutan indofenol yang dibutuhkan pada titrasi diatas.
6. Setelah hasil titrasi standar dikurangi rata-rata titrasi blanko (biasanya ± 0.1 ml), hitung konsentrasi larutan indofenol sebagai mg asam askorbat.
7. Lakukan standarisasi indofenol setiap akan melakukan analisis.

Persiapan dan Pengujian Sampel.

1. Ambil sejumlah volume sari buah, kemudian tambahkan kedalamnya asam metafosfat – asam asetat dalam volume yang sama. Saring melalui kertas saring.
2. Ambil sebanyak 10 ml larutan diatas titrasi dengan larutan standar indofenol. Lakukan juga penetapan blanko dengan memperhitungkan koreksi menggunakan volume asam dan air yang sesuai.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

3. Hitung dan nyatakan kadar asam askorbat sebagai mg/100 ml sari buah.

Perhitungan :

$$\text{mg Asam Askorbat per 100 gram/100 ml sampel} = \frac{\text{Titer} \times I \times \text{volume ekstrak total}}{V \times B} \times 100$$

I = Konsentrasi larutan indofenol sebagai mg asam askorbat

V = Volume ekstrak yang digunakan untuk penetapan = 10

B = Berat/volume sampel yang digunakan untuk penetapan

Metode Spektrofotometri

Prinsip

Asam askorbat dioksidasi seluruhnya menjadi dehidro asam askorbat oleh arang aktif dengan bantuan asam asetat. Kemudian direaksikan dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin dan ditambahkan asam sulfat sehingga terbentuk warna merah yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm.

Pereaksi

1. Larutan campuran asam metafosfat 5% dan asam asetat 10%: Larutkan 15 gram HPO_3 dan 40 ml asam asetat glasial dalam 450 ml air. Saring dan simpan di refrigerator. (setelah 10 hari larutan ini tidak dapat digunakan lagi).
2. Larutan Thiourea 10%
3. Larutan 2,4-dinitrofenilhidrazin : Larutkan 2 gram 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam 100 ml H_2SO_4 9 N, saring.
4. H_2SO_4 85% : Ke dalam 100 ml H_2O tambahkan 900 ml H_2SO_4 pekat.
5. Arang aktif.

Peralatan

1. waring blender atau mortar.
2. Spektrofotometer

Prosedur Kerja

1. Hancurkan dan homogenkan 10 gram sampel (buah/juice) dalam waring blender/mortar dengan menggunakan 50 ml larutan metafosfat-asam asetat.
2. Saring hancuran tersebut. Ambil 15 ml filtrate, tambahkan 0.75 gram arang aktif, kocok merata.
3. Saring. Ambil 4 ml hasil saringan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 1 tetes thiourea 10% dan 1 ml larutan dinitrofenilhidrazin.
4. Buat blanko seperti prosedur diatas tetapi tanpa penambahan dinitrofenilhidrazin (diganti air).
5. Tempatkan tabung reaksi tersebut dalam water bath 37°C selama 3 jam.
6. Dinginkan dalam campuran air dan es. Tambahkan 5 ml H₂SO₄ 85% ke dalam sample dan blanko, kocok merata.
7. Biarkan selama 30 menit. Baca absorbansi larutan pada panjang gelombang 540 nm.
8. Buat kurva standar dengan konsentrasi asam askorbat 0.25 – 1.5 µg/ml.
9. Hitung konsentrasi total asam askorbat (Vitamin C) dalam sampel.

Perhitungan :

$$\begin{array}{l} \text{mg Asam Askorbat} \\ \text{per 100 gram/100 ml sampel} \end{array} = \frac{C \times 50/15 \times 100}{4 \times W}$$

C = Konsentrasi asam askorbat (mg/ml) dari kurva standar

W = Berat/volume sampel yang digunakan untuk penetapan

Metode Titrimetri (dengan Iod) (Sulaeman, 1995)

Pereaksi

1. Larutan Iod 0.01 N
2. Indikator kanji / pati (1%)

Peralatan

1. Waring blender
2. Buret
3. Erlenmeyer

Prosedur Kerja

1. Hancurkan sampel sebanyak 100 gram dengan waring blender dengan penambahan aquades sebanyak 100 ml
2. Masukkan campuran tersebut ke dalam labu takar 250 ml, encerkan sampai tanda tera dengan aquades.
3. Ambil 25 ml filtrat ke dalam Erlenmeyer
4. Titrasasi dengan larutan iod 0.01 N sampai sampai larutan berwarna coklat muda
5. Tambahkan 3 tetes indikator kanji.
6. Titrasasi dengan larutan iod 0.01 N sampai berubah menjadi warna yang stabil (terbentuk warna biru ungu).

Perhitungan

$$\text{mg Asam Askorbat per 100 gram/100 ml sampel} = \frac{\text{ml Iod 0.01 N} \times 0.88 \times \text{FP} \times 100}{W}$$

FP = Faktor Pengenceran

W = Berat/volume sampel yang digunakan untuk penetapan

B. Vitamin A (Beta Karoten) (Sulaeman, 1995)

Metode Spektrofotometri

Pendahuluan

Pigmen-pigmen golongan karoten sangat penting ditinjau dari segi kebutuhan gizi, baik untuk manusia maupun hewan. Hal ini disebabkan

karena sebagian dari padanya dapat diubah menjadi vitamin A. Pigmen-pigmen ini banyak ditemukan dalam tanaman bersama-sama dengan klorofil, merupakan polyene yang dapat dikategorikan menjadi empat kelompok :

1. Karoten, $C_{40}H_{56}$ yang termasuk α , β , γ karoten dan lycopene.
2. Xanthophyll dan turunan-turunan oxy dan hidroxy dari karoten termasuk cryptoxanthin ($C_{40}H_{55}OH$) dan lutein ($C_{40}H_{54}(OH)_2$)
3. Ester dan xanthophyll, yaitu ester dari xanthophyll dan asam lemak.
4. Asam-asam karotenoid, yaitu turunan karboksil dari karoten.

Diantara beberapa kelompok provitamin A yang dijumpai di alam, yang dikenal lebih baik adalah α , β , γ dan neo- β -karoten dan cryptoxanthin. Karoten mengandung dua gugus cincin β -ionone dan dapat terpecah menjadi dua molekul vitamin A, sedangkan yang lain hanya mempunyai satu gugus sehingga kurang kadar vitamin A nya.

Prinsip

Karotenoid biasanya dipisahkan dengan kromatografi. Caranya berdasarkan pada pemisahan pigmen-pigmen karoten yang secara biologis aktif seluruh pigmen-pigmen karoten di dalam suatu ekstrak dengan menggunakan suatu "adsorbent" yang memiliki kemampuan mengikat yang berbeda untuk pigmen-pigmen yang berlainan.

Pereaksi

1. Aseton
2. Petroleum eter
3. Natrium sulfat anhidrat serbuk
4. Adsorbent : Campurlah dengan tepat satu bagian magnesium oksida (MgO) dengan tiga bagian Supercel.
5. Eluen : 3% aseton dalam petroleum eter.

Peralatan

1. Corong pemisah 500 ml dengan tempat berdirinya.
2. Kolom adsorpsi, 150 x 19 mm (diameter dalam), terbuat dari gelas dengan bagian yang menyempit pada salah satu ujung yang bersambung dengan tabung gelas 3 mm.

3. Penyodok untuk pembuatan kolom adsorpsi, terbuat dari gelas. Diameternya harus 1 – 2 mm kurang dari diameter kolom.

Prosedur Kerja

Pembuatan Kurva Standar

1. Timbang dengan teliti 25 mg β karoten murni, larutkan dalam 2.5 ml kloroform dan buat menjadi 250 ml dengan petroleum eter (1 ml = 0.1 mg atau 100 μ g).
2. Encerkan 100 ml larutan ini menjadi 100 ml dengan petroleum eter (1 ml = 10 μ g).
3. Pipet 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ml larutan ini ke dalam labu takar 100 ml yang terpisah. Masing-masing labu takar diisi dengan 3 ml aseton.
4. Encerkan sampai tanda tera dengan petroleum eter, sehingga konsentrasinya menjadi 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, dan 3.0 μ g/ml.
5. Ukur absorbansi larutan ini pada panjang gelombang 452 nm dengan menggunakan aseton 3% dalam petroleum eter sebagai blanko.
6. Buat grafik hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi β karoten.

Ekstraksi

1. Timbang sampel (5 – 10 gram atau sampai 25 gram) yang mengandung 10 sampai 500 μ g karoten. Bila sampel banyak mengandung gula bisa dicuci dengan air diatas suatu corong gelas berpenahan disertai dengan pompa penyedot.
2. Haluskan dalam mortar dengan menggunakan aseton sebagai pelarut. Gunakan pasir murni (bila perlu) untuk membantu penghalusan.
3. Saring melalui kapas, masukkan filtrat ke dalam erlenmeyer.
4. Lanjutkan ekstraksi dan penyaringan sampai sisanya menjadi tidak berwarna.
5. Pindahkan filtrat ke dalam labu pemisah. Tambahkan 10 sampai 15 ml petroleum eter.

6. Pindahkan pigmen ke dalam fase petroleum eter dengan cara mengencerkan aseton dengan air yang mengandung 5% natrium sulfat (menambahkan Na_2SO_4 5% sedikit demi sedikit ke dalam labu pemisah).
7. Ulangi ekstraksi fraksi aseton dengan sebagian volume petroleum eter (bila perlu), sampai tidak ada lagi warna yang terekstrak
8. Saring ekstrak dari petroleum eter melalui Na_2SO_4 anhidrous. Pekatkan ekstrak petroleum eter (bila perlu) dan buat menjadi volume tertentu (misal 25 ml).

Keterangan :

Penyabunan diperlukan bagi bahan-bahan dimana ester dari xanthophyl terbentuk seperti pada beberapa jenis mangga, "apricot" dan "peaches".

1. Sabunkan sampel dengan mencampurkan sampel yang sudah ditimbang dengan 150 ml KOH 12% dalam alkohol selama 5 menit pada suhu ruang dalam blender.
2. Pindahkan isi dari blender ke dalam labu pemisah dengan menggunakan KOH dalam alkohol untuk membilas.
3. Tambahkan 10 sampai 15 ml petroleum eter. Kocok labu pemisah perlahan-lahan paling sedikit 30 detik dan biarkan lapisan memisah. Bila masih ada warna kuning yang nyata pada lapisan air alkohol, tambahkan air atau air yang mengandung 5% Na_2SO_4 untuk membantu pemindahan pigmen ke lapisan petroleum eter.
4. Ulangi ekstraksi dengan petroleum eter sampai lapisan alkohol-air tidak berwarna lagi.

Pemisahan dengan Kromatografi

a. Pembuatan Kolom

1. Sambungkan kolom adsorpsi pada labu Buchner dan tempatkan sumbat dari kapas yang tidak menyerap atau wool gelas ke dalam bagian yang menyempit.
2. Jalankan vakum dan tambahkan adsorbent secukupnya untuk membuat kolom 2 - 2.5 cm panjangnya.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

3. Tekan ke bawah absorbent tersebut sekali atau dua kali dengan penyodok. Longgarkan permukaan adsorbent sekeliling tepi gelas dengan menggunakan spatula yang tipis.
 4. Tambahkan adsorbent lebih banyak dan ulangi tahap ini sampai kira-kira kolom 10 cm panjangnya.
 5. Tempatkan 1 cm Na_2SO_4 diatas kolom.
- b. Adsorpsi dan elusi
1. Basahi kolom dengan 25 sampai 50 ml petroleum eter. Sementara ml terakhir dari petroleum eter masih diatas Na_2SO_4 , putuskan vakum dan pindahkan kolom adsorpsi ke suatu labu Buchner kering dan bersih.
 2. Pipet 5 sampai 10 ml ekstrak yang akan dikromatografikan ke dalam kolom dengan disertai penyedotan dengan vakum.
 3. Cuci kolom terus menerus dengan eluent. Tambahkan eluent berikutnya bila yang sebelumnya sedikit diatas Na_2SO_4 . β karoten bergerak mendahului pigmen-pigmen lainnya. Teruskan pencucian sampai pigmen yang dikehendaki telah seluruhnya meninggalkan kolom dan eluen menjadi tidak berwarna lagi.
 4. Pindahkan isi dari labu ke labu takar dan encerkan volumenya dengan eluen (kepekatan dari karoten harus antara 1 – 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
 5. Ukur kepekatan warnanya pada panjang gelombang 452 nm dengan menggunakan aseton 3% dalam petroleum eter sebagai blanko.
 6. Baca konsentrasi β karoten dalam $\mu\text{g}/\text{ml}$ larutan dengan memanfaatkan kurva standar.
 7. Untuk mengukur total karoten (karoten, xanthophyl dan ester-esternya), pipet cairan ekstrak petroleum eter dari sampel (yang belum diadsorpsi) ke labu takar 100 ml yang telah berisi 3 ml aseton dan encerkan sampai tanda tera dengan petroleum eter, ukur warnanya pada panjang gelombang 425 nm.



Gambar 15. Proses kromatografi kolom

Perhitungan

$$\begin{array}{l} \mu\text{g karoten} \\ \text{per 100 gram} \end{array} = \frac{C \times V \times \text{FP} \times 100}{W}$$

C = Konsentrasi larutan aseton yang terbaca pada kurva standar ($\mu\text{g/ml}$)

V = Volume akhir

FP = Faktor Pengenceran

W = Berat sampel yang digunakan

Penetapan Total Karoten dalam Minuman (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Metode ini dapat diterapkan untuk menerapkan total karoten (α , β , γ , δ , dan ϵ -trans-karoten) dalam minuman seperti sari buah, "vitamin juices", "fruitmilk", "fruit buttermilk", "vitamin drink", dan lain-lain. Metode karoten yang terukur dengan metode ini terhitung sebagai total β karoten dan dinyatakan dalam $\text{mg}/100\text{g}$ atau 100 ml sampel.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

Prinsip

Sampel minuman diekstrak dengan kloroform, ekstrak yang diperoleh dikromatografikan pada alumunium oksida sehingga karoten terpisah dari komponen lainnya. Absorbansi fraksi karoten yang diperoleh dapat diukur pada panjang gelombang 450 nm.

Pereaksi

1. Pasir laut (*sea sand*) yang sudah dicuci dengan asam
2. Sodium sulfat anhydrous
3. n-Heksana
4. Etanol absolute
5. Kloroform, distabilkan dengan etanol.
6. Alumunium oksida 90 aktif, netral (tingkat aktivitas I). Diaktifasikan dengan cara : masukan 100g Al_2O_3 ke dalam Erlenmeyer, tambahkan 12 ml air, aduk merata sampai tidak ada gumpalannya lagi. Biarkan selama 2 jam.

Peralatan

1. Alat-alat gelas
2. Labu bulat berdasar rata 500 ml
3. "Orbit shaker"
4. Sentrifuse
5. Rotary evaporator
6. Kolom Kromatografi, diameter 2 cm, dilengkapi dengan saringan
7. Spektrofotometer
8. Kuvet gelas, tebal 1 cm.



Gambar 16. Alat rotary evaporator

Prosedur Kerja

Persiapan sampel

1. Minuman yang tidak jernih atau mengandung endapan harus dikocok dulu sebelum dilakukan pengambilan contoh.
2. Jumlah sampel yang diambil untuk analisa tergantung dari jenis minuman yang dianalisa , biasanya sekitar 50 ml atau 50g.

Ekstraksi

1. Masukkan 50 ml atau 50 gram \pm 0.1 gram minuman ke dalam labu bulat berdasar rata. Tambahkan 200 – 400 ml kloroform.
2. Kocok campuran dengan menggunakan orbit shaker selama 30 menit.
3. Sentrifuse, untuk memisahkan emulsi kloroform-air.
4. Buang fase aqueous (atas), dan ekstrak kloroform (bawah) disaring dengan kapas wool yang dilapisi sodium sulfat anhydrous. Filtrat yang diperoleh disebut ekstrak sampel.
5. Uapkan ekstrak sampel sampai kering dengan menggunakan rotary evaporator dalam keadaan vakum pada suhu 40° C.
6. Jika masih ada air, tambahkan sedikit etanol kemudian uapkan lagi.
7. Jika perlu residu kering, ditambah n-heksana lalu diuapkan lagi untuk menghilangkan sisa etanol, lalu tambahkan lagi n-heksana sampai volumenya 3 – 5 ml. Larutan ini disebut Konsentrat Karoten.

Pemisahan Karoten dengan Kromatografi Kolom

1. Siapkan kolom kromatografi. Masukkan pasir laut ke dalam kolom setinggi 0.5 cm. Kemudian masukkan alumunium oksida yang sudah diaktifasi yang disuspensikan dalam n-heksana. Tuang perlahan-lahan suspensi ke dalam kolom dan tepuk-tepuk kolom sehingga partikel terdistribusi merata ke seluruh kolom. Lanjutkan sampai tinggi lapisan alumunium oksida 8 – 9 cm. Kolom ini selalu dibasahi dengan heksana.
2. Pindahkan secara kuantitatif konsentrat karoten ke dalam kolom dengan bantuan pipet tetes, cuci wadah konsentrat dengan heksana, masukkan cucian ke dalam kolom.
3. Lakukan elusi dengan menggunakan n-heksana sampai seluruh karoten berwarna kuning-orange keluar dari kolom. Elusi diakhiri apabila eluen yang keluar dari kolom sudah tidak berwarna lagi. Tampung hasil elusi dalam labu takar yang sesuai, misal labu takar 100 ml.
4. Tepatkan volume eluat dalam labu takar sampai tanda tera dengan menggunakan heksana. Larutan ini disebut larutan uji.

Pengukuran dengan Spektrofotometri

1. Ukur absorbansi larutan uji dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm, gunakan heksana sebagai blanko.
2. Buat kurva standar, absorbansi dengan konsentrasi β karoten. Buat satu seri larutan β karoten dalam heksana dengan konsentrasi 0.1 – 5 $\mu\text{g/ml}$.
3. Hitung konsentrasi karoten dalam sampel berdasarkan kurva standar yang dibuat.

Penetapan Total Karoten dalam Sayuran dan Buah-buahan (Apriyanto, 1989)

Prinsip

Pigmen diekstrak dari sampel dengan menggunakan pelarut aseton-heksana. Pigmen karoten dipisahkan dari pigmen lainnya dengan menggunakan kolom adsorpsi. Magnesium oksida-Supercel, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 436 nm.

Pereaksi

1. Aseton : Campur aseton dengan sejumlah Na_2SO_4 anhydrous. Saring, tambahkan beberapa potong saringan berbentuk granular (10 mesh) kemudian di destilasi sehingga diperoleh aseton murni.
2. Heksana, titik didih 60 – 70° C
3. Adsorben = Campuran Magnesium oksida + Supercel 1 : 1

Peralatan

1. Kolom adsorpsi : Tinggi 17 cm, diameter 2 cm.
2. Penyodok : Panjang 25 cm, terbuat dari gelas, salah satu ujungnya rata.
3. Pompa vakum.

Prosedur Kerja

Ekstraksi

1. Buah dan Sayuran Kering
 1. Giling sampel sampai lolos ayakan 40 mesh
 2. Timbang dengan tepat 1 – 4 gram sampel, tempatkan dalam timbel, masukkan ke dalam soxhlet extractor.
 3. Tambahkan 30 ml campuran aseton komersial dan heksan (3+7) ke dalam labu soxhlet, refluks selama 1 jam atau lebih dengan kecepatan 1 – 3 tetes per detik sampai tidak ada lagi warna yang terekstrak. Dinginkan pada suhu ruang. Tepatkan volume hasil ekstraksi menjadi 100 ml dengan heksana.
 4. Alternatif lain, tambahkan pelarut ke dalam sampel yang sudah digiling halus dan biarkan di dalam tempat gelap semalam pada suhu ruang. Dekantansi atau saring ekstrak tersebut, masukkan ke dalam labu takar 100 ml, cuci residu kemudian ditepatkan sampai tanda tera dengan heksana. Larutan ini sekarang mengandung aseton 9%.
2. Buah dan Sayuran segar atau Olahan
 1. Hancurkan sejumlah sampel dalam blender (untuk bahan segar, jika analisa tidak segera dilakukan, blansir sampel dalam air mendidih selama 5 – 10 menit, simpan dalam keadaan beku).

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

2. Ekstrak 5 – 10 gram sampel dengan campuran 40 ml aseton dan 60 ml heksana dan 0.1 gram $MgCO_3$ dalam blender selama 5 menit.
3. Biarkan residu mengendap, kemudian dekantansi dalam labu pemisah (ekstrak dikeluarkan).
4. Cuci residu dua kali masing-masing dengan 25 ml aseton, kemudian cuci lagi dengan 25 ml heksana.
5. Gabungkan seluruh ekstrak yang diperoleh.
6. Pisahkan dan ambil/buang aseton dari ekstrak dengan pencucian menggunakan air berkali-kali.
7. Pindahkan lapisan atas ke dalam labu takar 100 ml yang telah berisi 9 ml aseton dan encerkan sampai tanda tera dengan heksana. (jika diinginkan alkohol dapat digunakan untuk menggantikan aseton dalam tahap ekstraksi).

Pemisahan Pigmen secara Kromatografi

1. Siapkan kolom kromatografi dengan adsorben campuran Magnesia aktif dan supercel (1 + 1)
2. Tempatkan lapisan Na_2SO_4 anhydrous setinggi 1 cm diatas lapisan adsorben.
3. Dengan menggunakan vakum secara kontinyu pada kolom, masukkan 50 ml ekstrak pigmen ke dalam kolom.
4. Lakukan elusi dengan menggunakan pelarut aseton heksana. Jaga agar lapisan atas selalu terisi dengan pelarut selama operasi.
5. Karoten akan melewati secara cepat. "Band" (pita) santofil, produk oksidasi karoten dan klorofil akan teradsorpsi dalam kolom.
6. Kumpulkan hasil elusi. Jika warna larutan terlalu terang, pekatkan larutan dengan tekanan rendah (vakum), tepatkan sampai volume tertentu dengan menggunakan aseton 9% dalam heksana.
7. Ukur warnanya pada panjang gelombang 436 nm. Set alat pada 100% T dengan menggunakan aseton 9% dalam heksana.
8. Tentukan konsentrasi karoten dalam sampel berdasarkan kurva standar yang dibuat.

Pembuatan Kurva Standar

1. Timbang dengan teliti 25 mg β karoten murni, larutkan dalam 2.5 ml kloroform dan buat menjadi 250 ml dengan petroleum eter (1 ml = 0.1 mg atau 100 μg).
2. Encerkan 100 ml larutan ini menjadi 100 ml dengan petroleum eter (1 ml = 10 μg).
3. Pipet 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ml larutan ini ke dalam labu takar 100 ml yang terpisah. Masing-masing labu takar diisi dengan 3 ml aseton.
4. Encerkan sampai tanda tera dengan petroleum eter, sehingga konsentrasinya menjadi 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, dan 3.0 $\mu\text{g/ml}$.
5. Ukur absorbansi larutan ini pada panjang gelombang 452 nm dengan menggunakan aseton 3% dalam petroleum eter sebagai blanko.
6. Buat grafik hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi β karoten.

Perhitungan

$$\begin{array}{l} \mu\text{g Beta Karoten} \\ \text{per 100 gram} \end{array} = \frac{C \times \text{FP} \times 100}{W}$$

C = Konsentrasi beta karoten yang terbaca pada kurva standar ($\mu\text{g/ml}$)

FP = Faktor Pengenceran

W = Berat sampel yang digunakan

IX

PENETAPAN pH DAN TOTAL ASAM

A. Pengukuran pH (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Beberapa bahan pangan mengandung asam, yang secara alami memang terkandung dalam bahan pangan itu sendiri atau memang sengaja ditambahkan selama proses pengolahan. Perubahan nilai pH bahan pangan dapat berpengaruh terhadap flavour, warna, tekstur dan stabilitas bahanpangan selama proses pengolahan. Karakteristik sifat asam dan basa dalam bahan pangan memiliki fungsi yang sangat penting diantaranya adalah untuk mengontrol pertumbuhan mikroba, menghambat reaksi pencoklatan, mencegah oksidasi lipid, emulsifikasi dan meningkatkan flavour.

Di dalam suatu larutan, hydrogen akan bereaksi dengan air membentuk ion-ion Hidronium (H_3O^+), Jumlah atau konsentrasi ion H_3O^+ bebas inilah yang disebut pH atau keasaman aktif. Secara alami konsentrasi H_3O^+ dinyatakan dalam 14 skala. Istilah pH secara matematis adalah nilai minus logaritma dari jumlah H^+ atau OH^- dalam larutan.

Pengukuran pH umumnya dilakukan dengan pH meter yang memiliki 4 komponen utama, yaitu elektroda acuan, indicator elektroda, voltmeter/amplifier, dan contoh yang akan dianalisis. Untuk mencapai ketepatan maksimal, pH meter distandarisasi menggunakan dua nilai kalibrasi yang masing-masing mewakili nilai pH rendah dan pH tinggi. Buffer standar yang umumnya digunakan di laboratorium untuk kalibrasi pH meter adalah buffer pH 4.0 dan pH > 7.0.

Standarisasi pH-meter

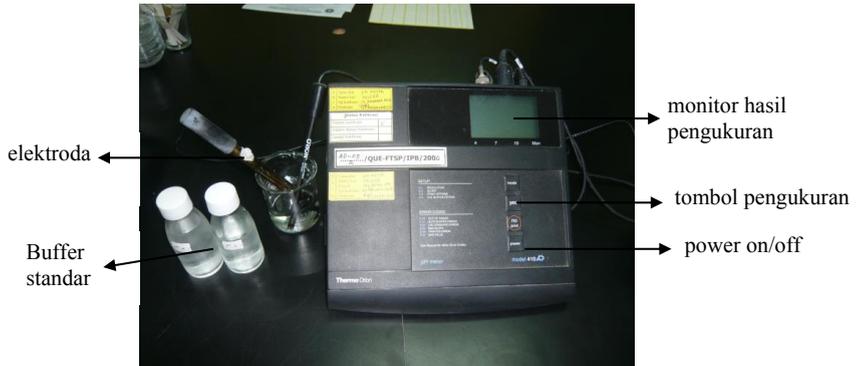
Setiap jenis buffer yang digunakan untuk standarisasi pH-meter mempunyai karakteristik tersendiri seperti koefisien suhu, buffer capacity, masa simpan, dan kemampuan mengikat karbon dioksida. Perbedaan karakteristik ini akan mempengaruhi ketepatan buffer dan juga ketepatan pengukuran pH.

Buffer yang baik yaitu buffer yang dapat digunakan berulang-ulang dengan ketepatan yang tinggi. Hal ini dapat diusahakan dengan mencegah kontaminasi pada larutan buffer dan secara periodik larutan buffer harus diganti dengan yang baru.

Buffer yang digunakan untuk menstandarisasi tergantung pH sampel yang akan diukur. Sebagai contoh jika sampel mempunyai pH 3 maka buffer yang digunakan lebih baik pH 4 daripada pH >7.

Langkah-langkah yang harus dilakukan dalam menstandarisasi pH-meter, yaitu :

1. Nyalakan pH-meter, biarkan stabil selama 15 – 30 menit.
2. Ukur suhu larutan buffer, set pengatur suhu pH-meter sesuai dengan suhu larutan buffer.
3. Bilas elektroda dengan larutan buffer atau akuades, kemudian keringkan dengan kertas tissue jika digunakan akuades (hati-hati dalam mengeringkan elektroda jangan sampai elektroda tergores, cukup ditempelkan saja pada bagian pinggir dan ujung elektroda, jangan ditekan atau digesek-gesek).
4. Celupkan elektroda dalam larutan buffer, set pengukuran pH.
5. Biarkan elektroda beberapa saat sampai setimbang dengan larutan buffer sehingga diperoleh pembacaan yang stabil.
6. Sesuaikan pengatur standarisasi pH-meter (tombol kalibrasi) sampai diperoleh angka pH yang sesuai dengan pH buffer pada suhu terukur.
7. Untuk standarisasi rutin, biasanya pH-meter dikalibrasi dengan dua macam buffer, yaitu buffer pH 4 dan buffer pH > 7.



Gambar 17. pH meter dan larutan buffer pH 4 dan pH > 7

Penetapan pH

Tahap-tahap penetapan pH secara umum adalah sebagai berikut (dilakukan pada pH-meter yang sudah dikalibrasi) :

1. Ukur suhu sampel, set pengatur suhu pH-meter pada suhu terukur.
2. Nyalakan pH-meter, biarkan sampai stabil (15 – 30 menit).
3. Bilas elektroda dengan alikuot sampel atau akuades (jika menggunakan aquades, keringkan elektroda dengan kertas tissue).
4. Celupkan elektroda larutan sampel, set pengukur pH.
5. Biarkan elektroda tercelup beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil.
6. Catat pH sampel.

Persiapan Sampel Untuk Penetapan pH

1. Untuk sampel yang berbentuk larutan homogen yang tidak terlalu pekat maka penetapan pH-nya dapat langsung, jika terlalu pekat maka harus diencerkan dulu (perhatikan faktor pengenceran, harus sama untuk setiap sampel yang sama).
2. Jika sampel berupa padatan yang larut dalam air (sebagian besar larut) maka sampel harus dilarutkan dulu dalam air dengan perbandingan tertentu yang sama untuk sampel yang sama. Sebagai contoh jika kita ingin menetapkan pH buah

pepaya, maka kita timbang 20 gram pepaya kemudian larutkan dalam 50 ml air, homogenkan biarkan \pm 15 menit baru diukur pH-nya (dalam prosedur harus disebutkan perbandingan jumlah sampel dengan air).

3. Sampel kering dan poros (tepung-tepungan dan sejenisnya), ada dua cara yaitu :
 - a. Metode ekstraksi
 - b. Metode permukaan

Metode Ekstraksi

1. Timbang dengan tepat 1 gram sampel (sampel harus dalam bentuk tepung yang homogen).
2. Tambahkan 20 ml air kemudian kocok dengan "stirrer" sampai basah sempurna, kemudian tambahkan 50 ml air, homogenkan.
3. Biarkan sampel selama 1 jam. Jangan disaring. Biarkan endapan mengendap.
4. Ukur pH supernatan sampel
5. Perbandingan jumlah sampel dan air yang digunakan dapat bervariasi tergantung bahan yang diukur.

Metode Permukaan

1. Teteskan satu tetes (atau lebih) aquades atau larutan KCl pada permukaan sampel. Bagian sampel yang dibasahi ini harus cukup untuk dapat ditempel dengan elektroda.
 2. Tempelkan ujung elektroda pada bagian sampel yang basah, setelah 60 detik ukur pH-nya.
4. Sampel berbentuk koloid, kental, "slurries" dan "sludge"
Masalah yang ditemui dalam mengukur pH sampel ini berkaitan dengan "liquid junction error". "Liquid junction error" ini dapat dikurangi dengan beberapa cara yaitu :
 - a. Menaikkan aliran "filling solution" (larutan pengisi elektroda). Gunakan "sleeve type reference electrode" atau "kombinasi electrode" atau kombinasi elektroda dengan "annular ceramic junction".
 - b. Mengganti "filling solution" dengan bahan yang tidak bereaksi dengan sampel. Syarat yang harus dipenuhi yaitu :

1. Larutan pengisi tidak bereaksi dengan sampel
2. Membentuk potensial yang stabil dengan “*internal cell*”
3. Mempunyai kemampuan menghantar listrik

Syarat 1 tergantung dari sampel yang di gunakan, syarat 2 dapat dipenuhi dengan menggunakan “*double junction electrode*” atau “*auxiliary salt bridge*”, dapat juga digunakan “*intermediate electrolyte*”.

- c. Penambahan sejumlah garam ke dalam sampel yang mempunyai kekuatan ionik rendah dapat menetralkan pengaruh partikel koloid tanpa banyak mempengaruhi nilai pH.
5. Sampel yang bersuhu rendah atau tinggi
 - a. Untuk sampel yang bersuhu rendah, gunakan ‘low resistance pH glass electrode’.
 - b. Untuk sampel bersuhu tinggi, gunakan “silver-silver chloride reference electrode”. Sebagai catatan : “Calomer reference electrode” akan pecah pada suhu diatas 65° C.

B. Penetapan Total Asam Titrasi (Apriyantono, 1989)

Pendahuluan

Total Asam Titrasi (TAT) adalah pengukuran konsentrasi total asam dalam bahan pangan (atau disebut juga total asam). Pengukuran TAT dilakukan dengan menitrasi kandungan asam yang ada dalam bahan pangan dengan basa standar. Asam pada Total Asam Terlarut umumnya berupa asam-asam organik (sitrat, malat, laktat, dan tartarat). Adanya asam organik berpengaruh terhadap citarasa (misalnya rasa pahit), warna, kestabilan terhadap mikroba, dan kualitas selama penyimpanan. TAT dan kandungan gula pada buah digunakan sebagai indikator kematangan.

Walaupun asam-asam organik secara alami terdapat dalam bahan pangan, tetapi asam-asam ini juga terbentuk selama proses fermentasi, ditambahkan dalam formula atau selama pengolahan. TAT biasanya dinyatakan sebagai komponen asam yang paling dominan. Misalnya, total asam pada jeruk dan sitrus dinyatakan sebagai asam sitrat, pada anggur sebagai asam tartarat, pada apel sebagai asam malat, dan pada produk fermentasi sebagai asam asetat.

Prinsip

Total Asam Tertitrasi dihitung dengan cara menitrasi sampel bahan pangan yang telah diketahui volume atau beratnya dengan basa standar, dengan menggunakan pH atau indikator phenolftalein untuk menentukan titik akhir titrasi. Jumlah (volume) titran yang digunakan, normalitas basa standar, dan volume atau berat sampel yang digunakan untuk menghitung Total Asam Tertitrasi. Basa standar yang dipakai biasanya adalah NaOH. Sebagai contoh reaksi yang terjadi antara asam sitrat dengan NaOH selama titrasi adalah sebagai berikut :



Pereaksi

1. Larutan NaOH 0.1 N yang sudah distandarisasi dengan Kalium Hidrogen Ptalat (sebelum digunakan KHP dikeringkan dulu dalam oven 110° C selama 4 jam), jika KHP tidak tersedia dapat digunakan $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
2. Indikator fenolphthalein 0.1% (dalam alkohol).

Peralatan

1. Peralatan titrasi
2. Waring Blender atau Mortar
3. Spatula
4. Pisau

Prosedur Kerja

Persiapan Sampel

1. Juice : Aduk merata sampai homogen, kemudian saring dengan kapas. Untuk juice segar, peras buah dengan baik sampai terekstrak hampir seluruh juice, kemudian saring.
2. Jelly dan Sirup : Campur merata sampai homogen. Timbang 300 gram sampel masukkan ke dalam labu takar 2 liter, kocok, tepatkan sampai tanda tera dengan aquades, kocok kembali (jika sampel tidak tersedia banyak, dapat dilakukan modifikasi yaitu dengan menimbang 25 – 50 gram sampel masukkan dalam labu takar 250 ml, tambahkan aquades sampai tanda tera).

3. Buah-buahan segar, preserve, jam, marmalade : Timbang 300 gram bahan, hancurkan dengan menggunakan waring blender sampai menjadi pulp. Pindahkan ke dalam gelas piala 1.5 – 2.0 liter, waring blender dicuci dengan aquades beberapa kali sampai bersih. Hasil cucian masukkan ke dalam sampel yang sudah ditempatkan dalam gelas piala. Tambahkan \pm 800 ml aquades, didihkan selama 1 jam. Dinginkan, pindahkan ke dalam labu takar 2 liter, tambahkan dengan aquades sampai tanda tera, kocok sampai homogen, saring (dapat dilakukan modifikasi dengan menimbang 25 – 50 gram sampel, hancurkan dalam waring blender dengan menambahkan air secukupnya. Pindahkan ke gelas piala, cuci waring blender dan cuciannya masukkan ke gelas piala lagi, didihkan selama 1 jam pindahkan ke dalam labu takar 250 ml, tambah aquades sampai tanda tera, homogenkan dan saring).

Penetapan Sampel

- a. Larutan tak berwarna atau sedikit berwarna
 1. 10 gram larutan dari persiapan sampel dilarutkan menjadi 250 ml dalam labu takar, titrasi dengan NaOH 0.1 N, dengan penambahan indikator fenolftalein (0.3 ml untuk 100 ml larutan).
 2. Untuk persiapan sampel (2) dan (3), ambil 25 ml kemudian tambahkan indikator fenolftalein, titrasi dengan NaOH 0.1 N.
 3. Nyatakan hasilnya sebagai ml NaOH 0.1N/100g atau 100 ml sampel.
- b. Larutan berwarna cukup pekat
 1. Larutkan sejumlah sampel yang diketahui beratnya dengan tepat ke dalam sejumlah aquades.
 2. Titrasi dengan NaOH 0.1 N, indikator PP sampai mendekati titik akhir
 3. Ambil 2 – 3 ml larutan yang dititrasi, masukkan ke gelas piala kecil, tambah 20 ml aquades, amati warna PP yang terbentuk (warna pink).
 4. Jika warna PP belum terbentuk masukkan larutan yang diperiksa ke dalam larutan yang sedang dititrasi kemudian titrasi dilanjutkan sampai titik akhir tercapai. Jika titik akhir sulit dilakukan ulangi tahap 3.

Perhitungan

$$\text{TAT} = \frac{V \times \text{FP} \times 100}{W}$$

TAT dinyatakan dalam ml NaOH 0.1 N/100gram atau ml larutan sampel

V = Volume NaOH 0.1 N yang telah distandarisasi

FP = Faktor Pengenceran

W = Berat Sampel (dalam gram atau ml)

N = Normalitas NaOH

Keasaman suatu sampel dapat juga dinyatakan sebagai persen asam yang paling dominan dalam suatu sampel.

Untuk sari jeruk asam dominannya adalah asam sitrat (BM 192)

$$\% \text{ Asam Sitrat} = \frac{V \times N \times \text{FP} \times 64 \times 100}{W}$$

Untuk apel asam dominannya adalah asam malat (BM 134)

$$\% \text{ Asam Malat} = \frac{V \times N \times \text{FP} \times 67 \times 100}{W}$$



Gambar 18. Proses titrasi

C. Penetapan Total Asam Volatil (Apriyantono, 1989)

Pereaksi

1. Larutan NaOH 0.1 N
2. Indikator Penolptalein

Peralatan

1. Peralatan titrasi
2. Alat Destilasi Mikro Kjeldahl

Prosedur Kerja

1. Ambil 10 gram sampel, pindahkan ke dalam alat destilasi Mikro Kjeldahl atau alat destilasi protein lainnya.
2. Destilasikan sampel tersebut. Tampung hasil destilasi dalam erlenmeyer 125 ml. Destilasi dilakukan sampai tertampung 10 fraksi destilat (masing-masing fraksi berisi 10 ml destilat).
3. Titrasi tiap-tiap destilat dengan NaOH 0.1 N dengan menggunakan indikator fenolptalein
4. Hitung total asam volatil, dinyatakan sebagai persen asam asetat per 10 ml fraksi destilat
5. Hitung total asam sampel (dinyatakan sebagai total asam asetat)
6. Buat Grafik hubungan antara % asam volatile dengan volume destilat.

PENETAPAN BAHAN PENYEGAR DAN KOMPONEN BIOAKTIF

A. Penetapan Kadar Kafein (Muchtadi & Sugiyono, 1989)

Pendahuluan

Kafein merupakan alkaloid utama yang terdapat pada kopi dan teh. Adanya kafein inilah maka teh dan kopi digolongkan dalam bahan penyegar. Kafein memberikan efek merangsang pada jaringan tubuh manusia maupun hewan. Jadi kafein merupakan komponen penting pada produk kopi dan teh.

Kafein dapat larut dalam air, mempunyai aroma wangi tetapi rasanya sangat pahit. Kafein bersifat basa "mono-acidic" yang lemah dan dapat memisah dengan penguapan air. Dengan asam, kafein akan bereaksi membentuk garam yang tidak stabil. Reaksi kafein dengan basa akan membentuk garam yang stabil. Kafein mudah terurai dengan alkali panas membentuk kafeidin.

Pereaksi

1. MgO
2. H₂SO₄
3. Kloroform
4. KOH

Peralatan

1. Erlenmeyer
2. Labu Takar
3. Pemanas/Hot plate dan Pendingin Balik
4. Corong pemisah

Prosedur Kerja

1. Giling sampel dengan halus kemudian ayak hingga lolos saringan 30 mesh.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

2. Timbang sampel sebanyak 5 gram, masukkan ke dalam erlenmeyer
3. Tambahkan 5 gram MgO dan aquades sebanyak 200 ml.
4. Didihkan perlahan-lahan selama 2 jam dengan pendingin balik
5. Setelah dingin encerkan dengan aquades dalam labu takar sampai volumenya 500 ml, kemudian saring.
6. Ambil filtratnya sebanyak 300 ml, kemudian masukkan ke dalam labu godok.
7. Tambahkan 10 ml H_2SO_4 (1 : 9), kemudian didihkan sampai volume cairan tinggal kurang lebih 100 ml.
8. Masukkan cairan ke dalam labu pemisah.
9. Bilas labu godok dengan sedikit H_2SO_4 (1 : 99) dan kocok berkali-kali dengan kloroform berturut-turut menggunakan 25 ml, 20 ml, 15 ml, 10 ml, 10 ml, dan 10 ml.
10. Masukkan cairan bilasan ke dalam corong pemisah, tambahkan 5 ml KOH 1%, kemudian kocok dan biarkan beberapa lama sampai cairan terpisah jelas.
11. Cairan bagian bawah merupakan larutan kafein dalam kloroform, keluarkan dan tampung dalam Erlenmeyer.
12. Tambahkan lagi 10 ml kloroform ke dalam corong pemisah, kocok dan biarkan sampai cairan terpisah jelas.
13. Keluarkan cairan bagian bawah dan tampung dalam Erlenmeyer yang sama.
14. Ulangi perlakuan ini sekali lagi
15. Larutan dalam Erlenmeyer diuapkan residunya, selanjutnya keringkan dalam oven $100^\circ C$ sampai diperoleh bobot konstan yang merupakan berat kafein kasar.

Perhitungan

$$\text{Kadar Kafein (\%)} = \frac{\text{Bobot residu (gram)} \times 3.464 \times 500 \times 100}{300 \times \text{gram sampel}}$$

B. Penetapan Kadar Theobromin (Muchtadi & Sugiyono, 1989)

Pendahuluan

Theobromin merupakan alkaloid pada coklat yang mempunyai efek merangsang. Dengan demikian kadar theobromin pada produk coklat merupakan parameter yang sangat penting sebagai bahan penyegar.

Pereaksi

1. Petroleum eter
2. MgO
3. Tetrakhloroethan
4. Ethyl eter.

Peralatan

1. Cawan porselin
2. Labu didih
3. Kondensor
4. Kertas saring
5. Neraca Analitik

Prosedur Kerja

1. Sampel yang banyak mengandung lemak harus diekstrak dulu lemaknya. Ekstrak lemak sampel dengan petroleum ether.
2. Timbang sampel sebanyak 10 gram pada cawan porselin.
3. Tambahkan 2 - 3 gram MgO dan campur sampai merata.
4. Tambahkan aquades sebanyak 9 - 20 ml sehingga sampel menjadi adonan.
5. Tempatkan adonan sampel pada penangas uap selama 30 menit, aduk sesekali untuk mencegah pengeringan (adonan sampel sebaiknya dalam bentuk granular).
6. Pindahkan contoh pada Erlenmeyer 250 ml dan tambahkan tetrakhloroethan sebanyak 150 ml
7. Hubungkan dengan kondensor dan didihkan selama 30 menit.
8. Saring dan tampung filtratnya (filtrat seharusnya jernih dan tidak berwarna).
9. Masukkan residu dan kertas saring ke labu didih

10. Tambahkan tetrakloroethan sebanyak 120 ml dan refluks selama 20 – 30 menit.
11. Sementara itu saring ekstrak sampel dan tampung filtratnya pada wadah yang sama dengan filtrat yang pertama.
12. Lakukan ekstraksi dua kali lagi menggunakan 120 ml tetrakloroethan sampai volumenya tersisa 3 – 5 ml.
13. Setelah filtrat dingin, tambahkan ether sebanyak 65 ml, kocok dan biarkan selama 1 jam atau lebih sampai supernatannya kelihatan jernih.
14. Saring endapan dengan kertas saring yang telah diketahui bobotnya.
15. Cuci residu pada kertas saring dengan ether sebanyak 5 – 7 ml beberapa kali.
16. Keringkan kertas saring dan residunya pada suhu 100°C, kemudian timbang untuk mengetahui berat residunya.

Berat residu merupakan berat theobromin sampel, tambahkan angka 0.004 gram pada berat residu sebagai faktor koreksi larutnya theobromin dalam ether.

Perhitungan

$$\text{Kadar Theobromin (\%)} = \frac{\text{Berat residu (g)} + 0.004 \times 100}{\text{Berat contoh (g)}}$$

C. Penetapan Kadar Tanin (Muchtadi & Sugiyono, 1989)

Pendahuluan

Tanin merupakan komponen penting pada teh. Tanin menentukan citarasa dan warna seduhan teh.

Prinsip

Tanin dioksidasi oleh KMnO_4 dan jumlah tanin dihitung berdasarkan kesetaraan 1 ml larutan asam oksalat 0.1 N dengan 0.0046 gram tanin (asam gallotannat).

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

Pereaksi

1. Larutan KMnO_4 standar
2. Larutan asam oksalat 0.1 N
3. Larutan Gelatin
4. Larutan NaCl asam
5. Larutan Indigo

Peralatan

1. Erlenmeyer
2. Pipet 10 ml dan 50 ml
3. Buret dan Plat pemanas
4. Kertas saring
5. Pengaduk magnet
6. Neraca Analitik
7. Labu Takar

Pembuatan Larutan

1. Larutan KMnO_4 : Larutkan KMnO_4 sebanyak 1.333 gram dalam 1 liter aquades. Larutan ini standarisasi dengan larutan asam oksalat 0.1 N setara dengan 0.00416 gram.
2. Larutan Indigo : Larutkan sodiumindigotindisulfonat sebanyak 6 gram dalam aquades 500 ml dan encerkan dengan aquades 500 ml dan diencerkan sampai volumenya 1 liter kemudian di saring.
3. Larutan Gelatin : Rendam gelatin sebanyak 25 gram selama 1 jam dalam larutan NaCl jenuh. Lakukan pemanasan untuk melarutkan gelatinnya dan setelah dingin diencerkan dengan larutan NaCl jenuh sampai volumenya 1 liter.
4. Larutan NaCl asam : Tambahkan H_2SO_4 sebanyak 25 ml pada larutan NaCl jenuh sebanyak 975 ml.

Prosedur kerja

1. Rebus 5 gram sampel (teh) selama 30 menit dalam 400 ml aquades.
2. Setelah dingin pindahkan pada labu takar 500 ml dan encerkan sampai tanda tera dengan aquades.

3. Pipet larutan sampel sebanyak 10 ml dan saring. Jika filtrat tidak jernih, tambahkan 25 ml larutan indigo dan 750 ml aquades.
4. Tempatkan diatas magnetic stirrer dan titrasi dengan larutan KMnO_4 standar sampai cairan berwarna kuning muda atau merah muda pada permukaannya. (Catat volume larutan KMnO_4 yang diperlukan, misalnya = a).
5. Pipet sebanyak 100 ml larutan sampel yang sudah disaring, tambahkan 50ml larutan gelatin, 100 ml larutan NaCl asam dan 10 gram bubuk kaolin.
6. Kocok campuran selama beberapa menit kemudian biarkan menguap, saring dengan kertas saring.
7. Ambil filtrat sebanyak 25 ml, tambahkan 25 ml larutan indigo serta 750 ml aquades
8. Titrasi campuran terakhir ini dengan larutan KMnO_4 standar seperti diatas sampai titik akhir berwarna kuning muda atau merah muda pada permukaan campuran
9. Catat volume larutan KMnO_4 yang diperlukan (misalnya b).

Perhitungan

$$\text{Kadar Tanin (\%)} = \frac{(b - a) \times (N/25) \times 0.00416 \times 100}{\text{Berat sampel (g)}}$$

N = ml larutan KMnO_4 standar yang equivalent dengan 25 ml larutan asam oksalat 0.1 N (hasil standarisasi).

D. Penetapan Kadar Nikotin (Muchtadi & Sugiyono, 1989)

Rumus molekul molekul $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$ dengan berat molekul 162,23. Berasal dari daun tembakau (*Nicotiana tabacum* dan *N.rustica*). daun tembakau kering mengandung 2 - 8% nikotin yang terikat dengan asam sitrat dan asam malat. Berbentuk cair seperti minyak tak berwarna sampai warna kuning pucat dan akan berubah menjadi coklat apabila terkena udara atau sinar. Sangat higroskopis dan mudah membentuk garam dengan semua macam asam. Sangat mudah larut dalam alkohol, khloroform, ether, petroleum ether, minyak tanah dan minyak nabati.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

Pereaksi

1. NaOH 20%
2. Petroleum ether
3. Indikator methyl merah
4. HCl 0,01 N

Peralatan

1. Erlenmeyer
2. Gelas pengaduk
3. Penangas air
4. Buret

Prosedur Kerja

1. Masukkan satu (1) g bahan yang telah dihaluskan (berupa tepung) kedalam Erlenmeyer 50 ml yang tertutup dan bubuhkan 1 ml larutan NaOH 20% dengan menggunakan pipet ukur. Aduk sampai rata dengan gelas pengaduk.
2. Tambahkan 20 ml petroleum ether dan tutup dengan rapat
3. Gojog sampai merata sambil menekan tutupnya supaya tidak terlompat
4. Diamkan selama 24 jam hingga bagian atas ether menjadi jernih
5. Pipet 10 ml cairan ether dengan alat penghisap (jangan pakai mulut) dan pindahkan kedalam erlenmeyer lain yang bersih.
6. Uapkan ethernya di atas penangas air sampai cairan tinggal lebih kurang 2q ml (selama 2 menit)
7. Tambahkan aquades 10 ml dan dua tetes indikator methyl merah
8. Titrasi dengan HCl 0,01 N sehingga warna hijau kekuningan berubah menjadi merah muda.

Perhitungan

1 ml HCl 0,01 N = 1,6223 mg nikotin

Jika normalitas larutan HCl = N
maka 1 ml HCl = $\frac{N}{0,01} \times 1,6223$ mg nikotin

E. Penetapan Kadar Asam Pitat (*phytic Acid*) (Sudarmadji, 1984)

Asam pitat terutama dalam bentuk garamnya banyak terdapat dalam bahan biji-bijian misalnya jenis padi-padian, kacang-kacangan dan kelapa. Asam pitat dalam bahan makanan sangat stabil terhadap berbagai perlakuan dalam pengolahan dan bersifat mengikat mineral dan logam sehingga dapat mengganggu penyerapan unsur-unsur mineral sehingga menyebabkan defisiensi didalam tubuh.

Prinsip :

Berdasarkan pengendapan sebagai garam Fe

Pereaksi

1. Tri Cloro Acetic acid (TCA, CCl_3COOH)
2. FeCl_3
3. Na_2SO_4
4. NaOH
5. $\text{Fe}(\text{OH})_3$
6. HCl
7. Hydroxylamine dalam HCl ($\text{NH}_2\text{OH} - \text{HCl}$)
8. Na asetat
9. O-phenanthroline
10. Aquades

Peralatan

1. Erlenmeyer
2. Penggojog listrik
3. Sentrifuse
4. Pipet
5. Pemanas listrik
6. Aquades
7. Spektrofotometer

Prosedur Kerja

1. Timbang sampel yang telah dihaluskan (sebaiknya lewat 40 mesh) sebanyak 2 g dalam erlenmeyer 125 ml. Ekstraksilah asam pitat dengan 40 ml TCA 3%. Kalau dapat gojog selama 45 menit
2. Suspensi kemudian disentrifuse pada 12.000 x G selama 10 menit. Pindahkan 10 ml aliquot dari supernatan ke dalam tabung sentrifuse yang bersih. Tambahkan larutan FeCl_3 sebanyak 5 ml ke dalam aliquot cepat-cepat dengan cara menghembuskannya dari pipet.
3. Panaskan tabung sentrifuse dengan isinya dalam air mendidih selama 1 jam, apabila supernatan tidak jernih dalam waktu 30 menit, tambahkan 2 atau 1 tetes larutan 3% Na_2SO_4 dalam 3% TCA dan lanjutkan pemanasan.
4. Kemudian sentrifuse selama 10-15 menit dan supernatan yang jernih didekantasi dan dibuang. Cucilah endapan dengan mengaduk baik-baik dengan 20 ml TCA 3%, panaskan dalam air mendidih selama 5-10 menit dan sentrifuse lagi. Buanglah supernatannya.
5. Ulangi pencucian dengan aquades. Setelah disentrifuse supernatan dibuang dan endapan diaduk lagi dalam 5 ml aquades dan tambahkan 5 ml NaOH 0,6 N
6. Panaskan dalam air mendidih selama 45 menit sampai semua $\text{Fe}(\text{OH})_3$ mengendap. Sekali lagi disentrifuse selama 10 – 15 menit dan supernatan dengan hati-hati didekantasi dan dibuang. Endapan sekali lagi dicuci dengan aquades sentrifuse dan dekantasi
7. Endapan kemudian dilarutkan dalam 5 ml HCl 0,5 N dengan pemanasan dalam air mendidih selama 10 – 15 menit sampai warna jernih kekuningan dari FeCl_3 tercapai. Pindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan sampai tanda tera dengan HCl 0,1 N.
8. Penentuan kadar Fe dari larutan di atas dilakukan dengan memindahkan 1 ml larutan ke dalam labu ukur 25 ml. Tambahkan larutan 10% hydroxylamine dalam HCl ($\text{NH}_2\text{OH} - \text{HCl}$) putar-putar larutan dalam labu beberapa menit. Kemudian tambahkan 9,5 ml 2M larutan Na-asetat dan 1 ml

larutan O-phenanthroline (0,1g/100ml) kemudian encerkan dengan aquades sampai tanda tera dan gojog. Diamkan lebih kurang 5 menit dan baca Absorbansi pada panjang gelombang 510 nm dengan spektrofotometer.

$$9. \text{ a. Berat asam pitat} = \frac{[A (510) - 0,007]}{(\text{mg})} \times 2,9546 \times \text{faktor pengenceran} \quad 0,783$$

Absorbansi pada 510 nm

Cara perhitungan lain :

Setelah pembacaan absorgansi pada panjang gelombang 510 nm, maka carilah konsentrasi Fe dalam larutan dengan kurva hubungan antara kadar Fe dan absorbansi pada 510 nm (kurva ini harus dibuat dulu). Dari berat Fe yang diketahui dihitung berat pitat :

$$\begin{aligned} \text{Berat pitat} &= \frac{\text{BM pitat}}{\text{BM Fe} \times 4} \times \text{Berat Fe} \times \text{pengenceran} \\ &= \frac{660}{56 \times 4} \times \text{Berat Fe} \times \text{pengenceran} \end{aligned}$$

F. Penetapan Aktivitas Antioksidan (Bintang, 2010)

Metode asam tiobarbiturat

Pendahuluan

Malonaldehid MDA adalah produk hasil peroksidasi lipid dalam tubuh dan terdapat dalam bentuk bebas atau terkompleks dengan jaringan atau organ dalam tubuh. Reaksi ionisasi radikal bebas juga dapat membentuk MDA, banyaknya MDA dalam tubuh dapat dideteksi, salah satu metode yang digunakan yaitu asam tiobarbiturat. Analisis MDA merupakan analisis radikal bebas secara tidak langsung dan mudah menentukan jumlah radikal bebas yang terbentuk. Pengukuran MDA dapat dilakukan dengan pereaksi asam tiobarbiturat yang akan membentuk senyawa merah muda yang dapat diukur intensitasnya dengan spektrofotometer.

Prinsip

Metode yang digunakan adalah TBARS (*thiobarbituric acid reactive substance*) dengan prinsip pemanasan akan menghidrolisis peroksida lipid, sehingga MDA yang terikat akan dibebaskan dan akan bereaksi dengan TBA dalam suasana asam membentuk kompleks MDA-TBA yang berwarna merah muda dan diukur pada panjang gelombang 532 nm.

Metode DPPH (difenilpikril hidrazil) (Huang, 2005)

Prinsip

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu ruang sehingga digunakan pada analisis ini. DPPH akan menerima electron atau radikal hydrogen sehingga membentuk molekul diamagnetic yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH.

Peralatan:

1. Tabung reaksi
2. Spektrofotometer

Prosedur Kerja

1. Siapkan larutan DPPH dalam methanol dengan konsentrasi 2×10^{-4} M.
2. Buat serangkaian larutan sampel dari ketiga fraksi ekstrak dengan variasi konsentrasi menggunakan pelarut methanol
3. Tambahkan 2 mL larutan DPPH dari masing-masing larutan, sehingga diperoleh serangkaian larutan dengan konsentrasi yang berbeda.
4. Diamkan selama 30 menit (dihitung setelah penambahan larutan DPPH), kemudian ukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm
5. Gunakan data absorbansi yang diperoleh untuk menentukan % inhibisi
6. Dari kurva % inhibisi versus konsentrasi sampel dapat diperoleh nilai IC_{50} ekstrak dengan analisis statistik menggunakan regresi linear.

G. Penetapan Flavonoid (Harborne, 1987)

Prinsip

Uji flavonoid digunakan untuk menentukan flavonoid dalam suatu bahan pangan dengan dihasilkannya warna merah atau kuning yang menunjukkan adanya flavonoid.

Prosedur Kerja

1. Merah atau kuning pada lapisan amil alkohol Sejumlah sampel ditambahkan 0,05 g magnesium dan 0,2 mL asam alkohol (campuran asam klorida 37% dan etanol 95% dengan volume yang sama), lalu tambahkan 2 mL alcohol
2. Kemudian kocok campuran, adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknyawarna.

H. Penetapan Saponin (Harborne, 1987)

Prinsip

Uji ini digunakan untuk menentukan adanya saponin dalam suatu bahan pangan dengan terbentuknya sabun atau busa. Bila lipid dipanaskan dalam alkali akan terlepas asam lemak dan gliserol. Alkali berikatan ester dengan asam lemak bila dikocok dengan air akan membentuk sabun yang berbusa. Bilangan penyabunan adalah jumlah milligram KOH yang dibutuhkan untuk menetralkan asam lemak hasil hidrolisis dari 1 g lipid.

Prosedur Kerja

1. Timbang sebanyak 5 g sampel, lalu didihkan dalam 100 mL aquades selama 5 menit, kemudian saring dalam keadaan panas
2. Ambil larutan tersebut sebanyak 10 mL dan tambahkan dengan 5 mL larutan KOH alkohol 0,5 mol/L, kemudian kocok kuat secara vertical selama 10 detik
3. Jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil sekitar 10 menit dan tidak hilang pada penambahan setetes HCl 2 N maka menunjukkan adanya saponin.

XI

PENETAPAN BAHAN TAMBAHAN PANGAN

Pendahuluan

Terdapat berbagai bahan tambahan dan ingredien pangan yang sering ditambahkan dalam proses pengolahan pangan, diantaranya : pengawet, pewarna, antioksidan, pengental/pembentuk gel, pemanis buatan, stabilizer, emulsifier, dan sebagainya. Penggunaan bahan tambahan pangan dibatasi penggunaannya dalam bahan pangan, sehingga konsentrasi yang digunakan tidak boleh melebihi batas konsentrasi yang telah ditetapkan. Batas maksimum konsentrasi bahan tambahan pangan di Indonesia telah diatur oleh Peraturan Menteri Kesehatan No. 722/1988.

A. Penetapan Kadar Garam (Metode Volhard) (Apriyantono, 1989)

Prinsip

Klorida-klorida dibebaskan dari sampel dengan cara pengabuan basah atau kering. Perak nitrat diberikan berlebihan untuk mengendapkan seluruh ion klorida sebagai perak klorida. Kelebihan perak kemudian dititrasi dengan potassium tiosianat untuk menghitung jumlah klorida di dalam sampel.

Pereaksi

1. Larutan Perak Nitrat 0.1 N atau 0.5 N
2. Larutan Potasium tiosianat 0.1 N
3. Larutan Amonium Feri Sulfat Jenuh
4. Asam Nitrat pekat (70%)
5. Nitrobenzen atau dietil eter

Peralatan

1. Neraca Analitik
2. Erlenmeyer 250 ml
3. Pipet Volumetrik 25 ml
4. Hot plate
5. Buret 50 ml

Prosedur Kerja

1. Timbang dengan tepat 5 gram sampel dalam Erlenmeyer. Atau pindahkan residu dari hasil pengabuan sampel ke dalam Erlenmeyer. (Lihat cara penetapan kadar abu).
2. Tambahkan dengan pipet 25 ml larutan perak nitrat 0.1 N. Apabila kandungan garam yang diharapkan lebih besar dari 2.75% gunakan larutan nitrat sebanyak yang tertera pada Tabel. Jumlah larutan perak nitrat yang sama digunakan pula pada pembuatan blanko (pembuatan blanko dilakukan bersamaan dengan penetapan sampel).

Tabel Larutan Perak Nitrat yang dibutuhkan untuk mengendapkan semua klorida di dalam sampel dengan kandungan garam berbeda-beda.

Kandungan garam yang diharapkan	Penambahan Larutan Perak Nitrat
0.00 - 2.75%	10 ml 0.1 N
2.75 - 4.50%	25 ml 0.1 N
4.50 - 5.50%	10 ml 0.5 N
5.50 - 8.50%	15 ml 0.5 N

3. Labu digoyang-goyang untuk mencampur sampel dengan perak nitrat dan tambahkan 15 ml asam nitrat pekat.
4. Didihkan campuran (lakukan diruang asam sampai semua sampel larut, kurang lebih 10 menit).
5. Apabila diperlukan tambahkan sejumlah kecil larutan potassium permanganat, didihkan diantara setiap penambahan sampai larutan kuning pucat atau tidak berwarna.
6. Tambahkan 25 ml aquades dan didihkan selama 5 menit.
7. Biarkan dingin dan tambahkan aquades sampai volume 150 ml.
8. Tambahkan lebih kurang 1 ml nitrobensena atau 25 ml dietil eter kocok labu untuk melapisi endapan.
9. Tambahkan 5 ml larutan ammonium ferisulfat jenuh kemudian titrasi dengan potassium tiosianat 0.1 M. Titik akhir titrasi tercapai apabila warna merah yang terbentuk bertahan selama 15 detik.



Gambar 19. Hot plate

Perhitungan

$$\% \text{ garam (sebagai NaCl)} = \frac{(B - S) \times N \times 5.85}{W}$$

B = Titer Blanko

S = Titer Sampel

N = Normalitas Potasium Tiosianat

W = Berat Sampel

B. Penetapan Kadar Garam (Modifikasi Metode Mohr) (Apriyantono, 1989)

Prinsip

Sampel kering hasil pengabuan dapat langsung dititrasi dengan perak nitrat. Ion-ion perak mengendap sebagai perak khlorida sampai habis dan kelebihan perak diukur dengan potassium khromat.

Pereaksi

1. Larutan Perak Nitrat 0.1 N
2. Larutan Potasium Kromat 5%

Peralatan

1. Erlenmeyer 250 ml
2. Buret 50 ml

Prosedur Kerja

1. Timbang dengan tepat 5 gram sampel dan abukan seperti pada cara penetapan kadar abu.
2. Cuci dengan aquades sedikit mungkin dan pindahkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml
3. Tambahkan 1 ml larutan potassium kromat 5% dan titrasi dengan larutan perak nitrat 0.1 M. Titik akhir titrasi tercapai apabila timbul warna orange/jingga yang pertama.

Perhitungan

$$\% \text{ garam (sebagai NaCl)} = \frac{T \times N \times 5.85}{W}$$

T = Titer

N = Normalitas Perak Nitrat

W = Berat Sampel (gram)

C. Penetapan Kadar Nitrit (Apriyantono, 1989)

Prinsip

Nitrit bebas dalam sampel diekstraksi dengan air panas dan protein-protein terlarut akan diendapkan. Larutan nitrit disaring dan diperlakukan dengan sulfanilamide untuk membentuk garam diazonium yang kemudian direaksikan dengan naftiletildiamin sehingga membentuk "azo dye" yang berwarna merah jambu. Intensitas warna dye sebanding dengan jumlah nitrit dalam sampel dan diukur dengan spektrofotometer.

Pereaksi

1. Larutan Potasium ferisianida : Larutkan 106 gram potassium ferisianida trihidrat dalam aquades dan encerkan sampai volume 1000 ml.
2. Larutan Seng Asetat : Larutkan 220 gram seng asetat dihidrat dalam aquades, tambahkan 30 ml asam asetat glacial dan encerkan sampai volume 1000 ml.
3. Larutan Boraks Jenuh : Larutkan 50 gram disodium tetraborat dekahidrat dalam 1000 ml aquades.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

4. Larutan Sulfanilamid : Larutkan 2 gram sulfanilamide dalam 200 ml aquades (jika perlu hangat), dinginkan, kalau perlu disaring, tambahkan 100 ml asam klorida pekat dan encerkan sampai volume 1000 ml.
5. Larutan Naptiletilendiamin: Larutkan 0.1 gram N-naptiletilendiamin dihidroklorida dalam aquades dan encerkan sampai 100 ml.
6. Larutan Asam Klorida : Encerkan 445 ml asam klorida pekat sampai volume 1 liter dengan aquades.
7. Larutan Stok Sodium Nitrit : Larutkan 10 gram sodium nitrit dalam aquades dan encerkan sampai volume 100 ml.
8. Larutan Kerja Sodium Nitrit : Buat setiap hari akan digunakan. Encerkan 5 ml larutan stok dengan aquades sampai volume 1 liter. Encerkan masing-masing 5, 10, dan 20 ml sampai volume 1 liter. Larutan ini mengandung 2.5 μg , 5.0 μg , dan 10 μg sodium nitrit/ml

Peralatan

1. Neraca Analitik
2. Spektrofotometer
3. Kuvet, diameter 10 mm
4. Labu takar 100 ml, 200 ml, 1000 ml.
5. Pipet Volumetrik
6. 10 ml, 25 ml.
7. Erlenmeyer 250 ml.
8. Kertas saring bebas Nitrat
9. Penangas air.

Prosedur Kerja

Pembuatan Kurva Standar

1. Pipet ke dalam satu seri labu takar 100 ml masing-masing 10 ml larutan sodium nitrit 0.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
2. Tambahkan kira-kira 50 ml aquades ke dalam masing-masing labu.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

3. Tambahkan 10 ml larutan sulfanilamide dan 6 ml larutan asam khlorida. Kocok dan biarkan larutan dalam ruangan gelap selama 5 menit.
4. Tambahkan 2 ml larutan naptiletilendiamin, kocok dan diamkan larutan dalam ruangan gelap selama 3 menit. Tepatkan sampai tanda tera dengan aquades.
5. Ukur absorbansi larutan pada 538 nm dengan spektrofotometer.
6. Buat kurva absorbansi vs konsentrasi sodium nitrit ($\mu\text{g/ml}$).

Penetapan Sampel

1. Timbang dengan tepat 10 gram dalam Erlenmeyer 250 ml.
2. Tambahkan 5 ml larutan boraks jenuh dan 100 ml aquades panas (diatas 70°C).
3. Panaskan labu diatas penangas air mendidih selama 15 menit.
4. Biarkan dingin sampai suhu kamar dan tambahkan 2 ml larutan potassium ferisianida dan 2 ml larutan seng asetat. Kocok merata sehabis setiap penambahan.
5. Pindahkan larutan dalam Erlenmeyer ke dalam labu takar 200 ml dan bilas dengan 50 ml aquades. Diamkan larutan selama 30 menit dan tepatkan sampai tanda tera dengan aquades.
6. Kocok merata isi labu takar, dan saring 30 ml larutan dengan kertas saring.
7. Pindahkan 10 ml filtrat diatas ke dalam labu takar 100 ml dan lakukan seperti pada pembuatan kurva standar tahap 2 sampai 5. Apabila kandungan sodium nitrit diperkirakan kurang dari 50 mg/Kg, gunakan 25 ml nitrit.
8. Baca konsentrasi NaNO_2 berdasarkan absorbansi larutan sampel pada kurva standar.

Perhitungan

$$\text{NaNO}_2 \text{ (mg/Kg)} = \frac{C \times 2000}{V \times W}$$

C = Konsentrasi NaNO_2 ($\mu\text{g/ml}$) dalam larutan sampel, dibaca pada kurva standar

V = Volume filtrat sampel (ml)

W = Berat Sampel (gram)

Catatan : 1.23 x ekivalen nitrit = ekivalen nitrat

D. Penetapan Asam Sulfit dalam Buah-buahan Kering (Metode Kalorimetri) (Apriyantono, 1989)

Prinsip : Spektrofotometri dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 550 nm

Pereaksi

1. Larutan Formaldehid 0.015% : Dibuat dari formaldehid 40% dengan dua kali pengenceran, dari 10 menjadi 1000 ml dan dari 75 menjadi 2000 ml.
2. Acid-bleached p-rosaniline hydrochloride : Tempatkan 100 mg p-rosaniline HCl dan 200 ml H₂O dalam labu takar 1 liter. Tambahkan 100 ml HCl (1+1) dan encerkan sampai tanda tera. Biarkan 12 jam sebelum digunakan.
3. Sodium Tetrachloromercurate : Tempatkan 23.4 gram NaCl dan 54.3 gram HgCl₂ dalam labu takar 2 liter. Larutkan dengan ± 1900 ml H₂O, kemudian tepatkan sampai tanda tera.
4. Larutan Sulfur dioksida standar : Larutkan ±170 mg NaHSO₃ dalam H₂O, encerkan menjadi 1 liter. Standarisasi dengan larutan I 0.01 N sebelum digunakan ± 100 (µg SO₂/ml).

Peralatan

1. Spektrofotometer
2. Waring Blender

Prosedur Kerja

Pembuatan Kurva Standar

1. Masukkan masing-masing 5 ml pereaksi mercurate ke dalam satu seri labu takar 100 ml.
2. Tambahkan masing-masing 0, 1.0, 2.0, 3.0 dan seterusnya ml larutan standar SO₂. Encerkan samapi tanda tera, kocok merata.
3. Pindahkan 5 ml masing-masing larutan standar ke dalam tabung reaksi (tinggi 200 mm) yang sudah berisi 5 ml pereaksi rosaniline.

4. Tambahkan 10 ml larutan HCHO 0.015%, campur merata. Biarkan selama 30 menit pada 22° C.
5. Baca absorbansinya pada 550 nm, standar 0 sebagai blanko.
6. Buat Kurva Standar.

Penetapan Sampel

1. Timbang 1.0 gram \pm 0.2 gram sampel buah-buahan kering yang telah dihaluskan, masukkan ke dalam waring blender. Tambahkan 290 ml H₂O, blender (hancurkan selama 2 menit)
2. Ambil 10 gram alikuot dari dasar bkender dengan pipet Mohr 10 ml dan pindahkan ke dalam labu takar yang telah berisi 4 ml NaOH 0.5 N (gunakan 2 ml untuk apel dan 1 ml untuk “golden raisins”).
3. Campur merata selam 13 – 30 detik.
4. Tambahkan 4 ml H₂SO₄ 0.5 N (gunakan 2 ml untuk apel dan 1 ml untuk “golden raisins”) dan 20 ml pereaksi mercurate. Encerkan sampai dengan tanda tera. (Buat blanko dengan cara yang sama, 10 ml alikuot sampel diganti denga H₂O).
5. Tambahkan 10 ml larutan HCHO 0.015%, campur merata. Biarkan selama 30 menit pada 22° C.
6. Baca absorbansinya pada 550 nm
7. Tentukan konsentrasi total asam sulfite dalam sampel (dinyatakan sebagai ppm SO₂).

Catatan :

Jika menggunakan kuvet yang sama untuk sampel yang berbeda, kuvet harus dicuci dulu dengan HCl (1+1) dan H₂O

E. Penetapan Kualitatif Formalin (SNI, 01-2894-1992)

Pendahuluan

Formalin atau dikenal dengan nama-nama lain (formol, methylene, aldehyde, paraforin, morbicid, oxomethana, polyoxymethylene glycols, methanal, formoform, soperlysoform, formic aldehyde, formalith, tetraoxymethylene, mehyl oxide, karsan, trioksan, oxymethylene, methylene glycol) adalah bahan yang sering disalahgunakan untuk

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

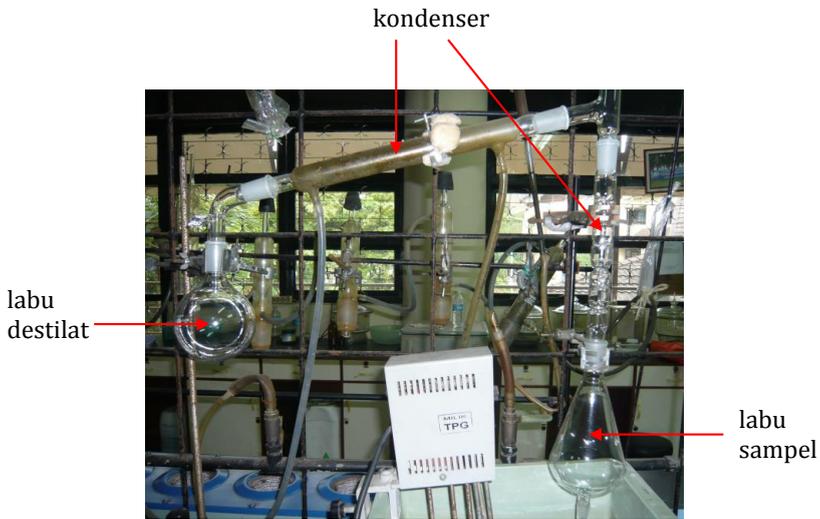
pengawet bahan. Senyawa ini memiliki rumus molekul formaldehida, dimana gugus fungsional utamanya adalah gugus karbonil.

Pereaksi

1. Pereaksi A = Larutan jenuh asam 1.8 dihidroksinaftalein 3.6 disulfonat dalam H_2SO_4 72%).
2. Campuran 1 bagian air brom jenuh dengan 1 bagian H_2SO_4 dingin
3. Asam asetat 4 N
4. Etil eter
5. Feri Klorida 10%
6. Asam sulfat pekat.
7. Susu segar bebas aldehide

Peralatan

1. Mortar
2. Alat penyulingan/destilasi
3. Tabung reaksi
4. Penangas Air
5. Erlenmeyer
6. Corong pemisah
7. Pinggan Penguap
8. Gelas piala



Gambar 20. Alat penyulingan untuk uji formalin

Prosedur Kerja

Persiapan Sampel

1. Padatan atau Semi padat : Campurkan 100 gram sampel dengan 100 ml air dengan cara menggerusnya dengan mortar. Pindahkan ke dalam labu kjeldahl 800 ml, asamkan dengan H_3PO_4 dan tambahkan 1 ml berlebih. Hubungkan dengan pendingin dan sulingkan. Tampung hasil sulingan.
2. Susu : Encerkan 100 ml susu dengan 100 ml air, asamkan dan sulingkan.
3. Cairan : Asamkan 200 ml sampel dan sulingkan.

Uji dengan Asam Khromotrofik

1. Masukkan 5 ml pereaksi A ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 1 ml larutan hasil sulingan sampel sambil diaduk.
2. Letakkan dalam penangas yang mendidih selama 15 menit dan amati perubahan yang terjadi.
3. Adanya HCHO ditunjukkan dengan adanya warna ungu terang sampai ungu tua.

Uji Hehner – Fulton

1. Kedalam 6 ml H_2SO_4 dingin tambahkan 5 ml larutan hasil sulingan sambil didinginkan.
2. Masukkan 5 ml campuran tersebut ke dalam tabung reaksi
3. Tambahkan 1 ml susu yang bebas aldehid secara perlahan-lahan dan sambil didinginkan, lalu tambahkan 0.5 ml larutan pengoksidasi dan diaduk.
4. Adanya HCHO/formalin ditunjukkan dengan adanya warna merah muda ungu .

Uji dengan $FeCl_3$

1. Timbang 5 gram sampel, tambahkan 5 ml aquades dan masukkan ke dalam corong pemisah.
2. Tambahkan 1 - 2 ml asam asetat 4 N lalu kocok dengan 2 x 20 ml eter.
3. Panaskan dan uapkan dalam pinggan penguap hingga kering
4. Tambahkan 10 - 20 ml aquades ke dalam residu, aduk
5. Tuangkan larutan tersebut ke dalam 3 ml asam sulfat yang ditetesi dengan 2 tetes $FeCl_3$ 10% secara perlahan-lahan
6. Terbentuknya warna merah lembayung menunjukkan adanya formaldehid.

F. Penetapan Boraks (SNI 01-2358-1991)

Pendahuluan

Penetapan boraks dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif dapat dilakukan dengan menggunakan *tumeric paper* dan larutan NH_4OH , dimana kertas akan berubah warna menjadi merah bila dicelupkan dalam sampel yang mengandung $Na_2B_4O_7$ atau H_3BO_3 dan akan berubah warna menjadi hijau-biru gelap bila dicelupkan dalam larutan NH_4OH . Warna *tumeric paper* akan berubah kembali menjadi merah bila ditambahkan asam.

Penetapan Boraks secara Kualitatif

Pereaksi

1. *Tumeric papper*
2. *Tumeric powder*
3. Kertas saring
4. Larutan HCl
5. Larutan NH_4OH
6. Larutan standar Asam Borat : Larutkan 1 gram H_3BO_3 menjadi 100 ml dengan aquades
7. Alkohol 80%

Peralatan

1. Mortar
2. Tabung reaksi
3. Sudip
4. Gelas piala

Prosedur Kerja

Pembuatan *Tumeric papper*

1. Timbang 1.5 – 2.0 gram *tumeric powder* dalam gelas piala
2. Tambahkan 100 ml alkohol 80%
3. Aduk selama 5 menit dengan magnetic stirrer, kemudian saring
4. Ke dalam filtrate, celupkan kertas saring whatman No. 2 dan keringkan.
5. Setelah satu jam potong kertas ukuran 6 x 1 cm dan simpan. Kertas ini disebut *Tumeric papper*

Analisis Boraks

1. Sampel padat dihancurkan terlebih dahulu dengan mortar, dan ditambahkan air
2. Asamkan sampel dengan HCl (7 ml asam untuk 100 ml sampel)
3. Celupkan *Tumeric papper* dan biarkan kering.
4. *Tumeric papper* akan berwarna merah jika sampel mengandung $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ atau H_3BO_3 dan akan berubah warna menjadi hijau-

biru gelap bila dicelupkan dalam larutan NH_4OH . Warna *tumeric papper* akan berubah kembali jika ditambahkan asam.

Penetapan Boraks Secara Kuantitatif

Pereaksi

1. Larutan NaOH 10%
2. Larutan HCl 1 N
3. Kristal CaCl_2
4. Indikator Penolftalein 1%
5. Air Kapur : Timbang 150 gram CaO, masukkan ke dalam labu takar 1000 ml, tambahkan 500 ml aquades, campur sampai homogen, dinginkan, selanjutnya tambahkan aquades sampai dengan tanda tera.
6. Larutan H_2SO_4 1N
7. Indikator 1% methyl orange (methyl kuning) : Larutkan 1 gram methyl kuning dalam 100 ml aquades.
8. Larutan NaOH 0.2 N standar : 1 ml 0.2 N NaOH setara dengan 0.0124 g H_3BO_3

Peralatan.

1. Neraca analitik
2. Cawan abu porselin
3. Pengaduk gelas
4. Water bath
5. Tungku pengabuan
6. Corong
7. Kertas saring
8. Erlenmeyer 300 ml
9. Indikator Universal berskala pH 1
10. Pipet ukuran 50 ml
11. Buret 50 ml berskala 0.1 ml

Prosedur Kerja

1. Timbang 10 – 100 gram sampel (tergantung kadar boraks sampel) ke dalam cawan abu porselin 200 ml.
2. Tambahkan 100 ml larutan NaOH 10%, kemudian panaskan diatas penangas air sampai kering, selanjutnya dipanaskan dalam tungku pengabuan hingga suhu 400° C (menaikkan suhu secara bertahap).
3. Setelah cawan dingin tambahkan 20 ml aquades panas, diaduk dengan batang pengaduk gelas, semetara itu tambahkan beberapa tetes larutan HCl sampai larutan bersifat asam (uji dengan kertas indikator universal).
4. Saring larutan melalui kertas saring tidak berabu ke dalam Erlenmeyer 300 ml dan bilas kertas saring dengan aquades panas, sehingga filtrate bervolume tidak lebih dari 50 ml hingga 60 ml
5. Pindahkan kertas saring ke dalam cawan abu semula, basahi dengan air kapur sebanyak 80 ml, kemudian uapkan diatas penangas air. Setelah menjadi kering abukan dalam tungku pengabuan sehingga diperoleh abu yang berwarna putih (suhu tungku pengabuan 650 °C).
6. Larutkan abu dalam beberapa ml HCl (1 : 3) sambil dipindahkan ke dalam Erlenmeyer 300 ml (prosedur kerja No. 4), tambahkan 0.5 gram CaCl₂ dan beberapa tetes indikator phenolphthalein, tambahkan larutan NaOH 10% hingga larutan berwarna merah muda (pink)
7. Tambahkan air kapur sehingga volume larutan menjadi 100 ml, campur sampai homogen dan saring melalui kertas saring whatman No. 1
8. Ke dalam Erlenmeyer 300 ml masukkan 50 ml filtrat dan larutkan H₂SO₄ 1N sampai warna merah muda hilang, kemudian tambah beberapa tetes methyl orange dan selanjutnya penambahan H₂SO₄ 1N diteruskan sampai warna larutan berubah dari kuning menjadi merah muda. Didihkan larutan ini selama 1 menit mendidih.
9. Setelah dingin titrasi dengan larutan NaOH 0.2 N standar sampai warna berubah menjadi kuning (lemon yellow), hindari kelebihan NaOH dan baca buret.

10. Ke dalam larutan tersebut tambahkan 1 – 2 gram manitol dan beberapa tetes phenolphthalein, lanjutkan titrasi NaOH 0.2 N standar sampai larutan warna menjadi merah metal (pink)
11. Ke dalam larutan diatas tambahkan sedikit manitol dan jika warna merah muda hilang, lanjutkan titrasi dengan NaOH 0.2 N standar sampai larutan warna menjadi merah muda yang tetap.
12. Setelah diperoleh larutan warna merah muda (pink) yang tidak berubah apabila ditambahkan manitol, hitung volume NaOH 0.2 N standar yang dipakai pada titrasi (9, 10, 11).

Perhitungan

$$\text{Kadar Boraks (ppm)} = \frac{\text{ml NaOH 0.2N} \times 12.4 \times 1000}{\text{Berat sampel (g)}}$$

G. Pengujian Kualitatif Bahan Pengawet dan Bahan Pemanis Sintetik (SNI 01- 2891-1992)

Pendahuluan

Bahan pengawet organik yang banyak digunakan yaitu asam benzoate, ester asam P-hidroksi benzoat, asam salisilat dan lain-lain. Sedangkan bahan pemanis sintetik yang banyak digunakan yaitu sakarin, dulsin dan siklamat.

Pereaksi

1. NaOH 10%
2. HCl (1 + 3)
3. Eter
4. BaCl₂
5. NaNO₂
6. NH₃
7. FeCl₃ 0.5%
8. HNO₃
9. Anisaldehyd
10. Petroleum eter

11. H_2SO_4 (1 + 3)
12. KMnO_4 5%
13. NaOH padat
14. KNO_2 10%
15. CuSO_4 1%

Peralatan

1. Labu Pemisah
2. Piringan porselin
3. Pipet Mohr dan Volumetrik 10 ml, dan 25 ml
4. Penangas air
5. Buret 50 ml
6. Gelas ukur 10 dan 100 ml
7. Waring blender

Persiapan sampel

a. Padatan atau semi padatan

1. Hancurkan 50 – 100 gram sampel dengan 300 – 400 ml air dalam waring blender
2. Tambahkan NaOH 10% sampai larutan menjadi alkalis (basa)
3. Biarkan selama 2 jam kemudian saring.

b. Cairan

1. Ambil 50 – 100 ml sampel, tambahkan NaOH 10% sampai alkalis.
2. Saring dengan kapas. Jika sampel berkadar gula tinggi, encerkan sampai total padatan terlarut 10 – 15%.

Pengujian Siklomat (Sikloheksilsulfamat)

1. Tambahkan 2 gram BaCl_2 ke dalam 100 ml filtrate dari persiapan sampel, biarkan 2 menit, kemudian saring.
2. Asamkan filtrate dengan 10 ml HCl dan tambahkan 0.2 gram NaNO_2 . Terbentuknya endapan putih BaSO_4 menunjukkan adanya sikloheksilsulfamat.

Persiapan Pengujian Benzoat, Salisilat, Sakarin, Dulsin

1. Pipet 100 ml atau lebih filtrate dari persiapan sampel, masukkan ke dalam labu pemisah.
 2. Tambahkan HCl (1+3) sampai asam (gunakan kertas lakmus sebagai indikator). Tambahkan lagi 5 - 10 ml HCl (1+3)
 3. Ekstrak dengan 75 - 100 ml eter. Jika perlu ekstrak kembali lapisan air dengan eter lagi.
 4. Cuci ekstrak eter sebanyak 3 kali, masing-masing dengan 5 ml air. Masukkan ekstrak eter ke dalam cawan porselin.
 5. Uapkan eter dalam penangas air. Residu yang dihasilkan mengandung asam benzoat atau eternya, asam salisilat, sakarin, dulsin dan atau bahan terekstrak lainnya.
 6. Larutkan residu yang diperoleh dalam air. Jika perlu panaskan sampai 80 - 85° C selama 10 menit.
 7. Larutan yang diperoleh dibagi 3 untuk pengujian selanjutnya (disebut larutan A, B, dan C).
- a. Pengujian Asam Benzoat
1. Ke dalam larutan A tambahkan beberapa tetes NH_3 sampai larutan menjadi basa
 2. Hilangkan kelebihan NH_3 dengan penguapan
 3. Larutkan kembali residu dengan air panas, saring jika perlu
 4. Tambahkan beberapa tetes, FeCl_3 netral 0.5%. Terbentuknya endapan Ferribenzoat yang berwarna salmon menunjukkan adanya asam benzoat.
- b. Pengujian Asam Salisilat
- Ke dalam larutan B tambahkan 1 tetes FeCl_3 netral 0.5%. Jika ada asam salisilat maka larutan akan berwarna ungu.
- c. Pengujian asam p-Hidroksibenzoat dan eternya, Sakarin, Dulsin
1. Tambahkan basa (NH_3 atau NaOH) ke dalam larutan C sampai menjadi alkali.
 2. Ekstrak larutan dengan menggunakan eter dalam labu pemisah. Dari hasil ekstraksi ini akan diperoleh 2 lapisan yaitu lapisan eter (D) dan lapisan air (E).

C 1. Pengujian Dulsin

1. Ekstrak eter (D) dibagi dua, tempatkan masing-masing ke dalam pinggan porselin. Uapkan eter diatas penangas air.
2. Pada pinggan porselin pertama, basahkan residu dengan HNO_3 , dan tambahkan 1 tetes air. Terbentuknya endapan jingga atau merah bata menunjukkan adanya Dulsin.
3. Kenakan gas HCl selama 5 menit ke dalam residu kering pada pinggan kedua, kemudian tambahkan 1 tetes anisaldehyd. Jika mengandung dulsin akan terbentuk warna merah jingga sampai merah darah.

C 2. Pengujian Sakarin dan asam p-Hidroksibenzoat

1. Lapisan air yang diperoleh (E) diasamkan dengan HCl, kemudian diekstrak dengan petroleum eter. Akan terbentuk 2 lapisan. Lapisan air digunakan untuk pengujian sakarin dan asam p-hidroksibenzoat.
2. Ekstrak lapisan air yang diperoleh dengan eter, uapkan eter dari ekstrak eter yang diperoleh.
3. Residu yang tinggal dirasakan manis atau tidak dengan indra pencipta, jika manis menunjukkan adanya sakarin (bila kadar sakarin yang ada 20 mg/kg sampel biasanya dapat diuji dengan cara ini).
4. Larutkan residu dalam 15 ml air. Larutan dibagi dua (kita sebut larutan F (10 ml) dan larutan G (5 ml).
5. Untuk menguji adanya sakarin :
 - ke dalam 10 ml larutan F tambahkan 2 ml H_2SO_4 encer (1+3), panaskan sampai mendidih.
 - tambahkan sedikit berlebih larutan KMnO_4 5% sampai terbentuk warna merah jambu yang persisten, dinginkan.
 - tambahkan kurang lebih 1g NaOH, saring dan masukkan filtrat ke dalam pinggan porselin. Uapkan sampai kering.
 - panaskan pada suhu 210 – 215^oC dalam tanur selama 20 menit, larutkan residu dalam air.
 - pindahkan larutan ke dalam labu pemisah, asamkan dan ekstrak dengan eter. Uapkan eter.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

- larutkan residu dalam air, tambahkan satu tetes FeCl_3 netral 0.5%. Terbentuknya warna violet menandakan adanya asam salisilat yang dibentuk dari sakarin.
- 6. Untuk menguji adanya asam p-Hidroksibenzoat :
 - netralkan 5 ml larutan G dengan NH_3
 - uji dengan pereaksi Million. Terbentuknya warna merah mawar menunjukkan adanya asam p-Hidroksibenzoat.

H. Pengujian Kuantitatif Natrium Benzoat Secara Kuantitatif (SNI 01-2891-1992)

Prinsip

Dalam sampel yang sudah dijenuhi dengan larutan NaCl, asam benzoate yang ada dalam sampel diubah menjadi Natrium benzoat yang larut air dengan penambahan NaOH.

Jika larutan natrium benzoat diasamkan dengan HCl berlebih, akan terbentuk asam benzoat yang tidak larut dalam air yang dapat diekstrak dengan kloroform. Kloroform dapat dihilangkan dengan penguapan, residu yang mengandung asam benzoate dilarutkan dengan alkohol dan dititrasi dengan NaOH standar.

Pereaksi

1. NaCl
2. NaOH 10%
3. HCl (1 + 3)
4. Kloroform
5. NaOH 0.05 N

Peralatan

1. Labu takar 500 ml, 250 ml
2. Labu pemisah 500 ml
3. Buret

Prosedur Kerja

Persiapan Sampel

Prosedur Umum

1. Homogenkan sampel, jika padatan atau semi padatan harus digiling, pindahkan 100 g sampel ke dalam labu takar 500 ml.
2. Tambahkan NaCl powder dalam jumlah yang cukup untuk menjenuhkan air yang ada dalam sampel, kemudian buat alkali dengan penambahan larutan NaOH 10% (periksa dengan kertas litmus).
3. Encerkan sampai tanda tera dengan larutan NaCl jenuh, kocok merata.
4. Biarkan sedikitnya 2 jam dengan pengocokan berkali-kali secara berkala. Lebih disukai jika dibiarkan semalam, saring dengan kertas whatman no.4
5. Jika sampel mengandung banyak lemak yang dapat mengkontaminasi filtrat, tambahkan beberapa ml larutan NaOH ke dalam filtrat, kemudian ekstrak dengan eter sebelum penetapan selanjutnya
6. Jika sampel mengandung alkohol, perlakuan seperti mempersiapkan sampel cider.

Persiapan sampel saus tomat

1. Ke dalam 100 g sampel tambahkan 15 g NaCl dan pindahkan campuran ke dalam labu takar 500 ml, cuci wadah semula dengan lebih kurang 150 ml larutan NaCl jenuh.
2. Tambahkan NaOH 10% sampai alkali kemudian tepatkan sampai tanda tera dengan larutan NaCl jenuh.
3. Biarkan selama sedikitnya 2 jam, kocok setiap selang waktu tertentu, sentrifusa jika perlu, kemudian saring.

Persiapan sampel "Cider" yang mengandung alkohol dan produk sejenisnya.

1. Ke dalam 250 ml sampel tambahkan NaOH 10% sampai alkalisuapkan pada penangas uap sampai volume larutan menjadi 100 ml.
2. Pindahkan sampel ke dalam labu takar 250 ml, tambahkan 30 g NaCl, kocok sampai larut.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

3. Tepatkan sampai tanda tera dengan larutan NaCl jenuh, biarkan selama sedikitnya 2 jam, kocok secara teratur, kemudian saring.

Persiapan sampel "Jellies, jam, preserves dan marmalades"

1. Campurkan 100 – 150 g sampel dengan 300 ml larutan NaCl jenuh. Tambahkan 15 g NaCl dan buat larutan menjadi alkali dengan NaOH 10%.
2. Pindahkan ke dalam labu takar 500 ml dan encerkan sampai tanda tera dengan larutan NaCl jenuh.
3. Biarkan selama sedikitnya 2 jam, kocok teratur, sentrifusa bila perlu, kemudian saring.

Penetapan sampel

1. Pipet 100 ml atau secukupnya filtrate sampel, masukkan ke dalam labu pemisah. Netralkan dengan penambahan HCl encer (1 + 3) dan tambahkan lagi 5 ml HCl sesudah netral.
2. Ekstrak dengan menggunakan kloroform beberapa kali dengan volume kloroform berturut-turut 70, 50, 40, dan 30 ml. Untuk mencegah pembentukan emulsi, goyang-goyang secara kontinyu setiap kali ekstraksi dengan gerakan rotasi. Lapisan kloroform biasanya memisah dengan mudah sesudah dibiarkan beberapa menit.
3. Jika terbentuk emulsi, hilangkan dengan mengocok lapisan kloroform menggunakan gelas pengaduk atau dengan memindahkan dan memisahkan emulsi dengan menggunakan labu pemisah lain atau dengan sentrifuse beberapa menit.
4. Setiap kali ekstraksi selesai, ambil bagian jernih lapisan kloroform sebanyak mungkin, usahakan jangan tercampur dengan emulsi. Jika lapisan kloroform yang diperoleh kurang jernih maka perlu dicuci dengan aquades sampai jernih.
5. Pindahkan seluruh ekstrak kloroform yang diperoleh ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang kering, cuci labu pemisah (tempat ekstrak kloroform) dengan 5 – 10 ml kloroform.
6. Distilasi dengan lambat pada suhu rendah sampai volume ekstrak seperempat dari volume semula, kemudian uapkan

sampai kering pada suhu kamar diatas penangas air sampai tinggal beberapa tetes cairan saja yang tinggal.

7. Keringkan residu semalaman (atau sampai bau asam asetat hilang jika sampelnya adalah saus tomat) dalam desikator yang berisi H_2SO_4 pekat.
8. Larutan residu asam benzoat dalam 50 ml alkohol netral (cek dengan phenoftalein), tambahkan 12 - 15 ml air dan 1 atau 2 tetes indikator phenolftalein dan titrasi dengan NaOH 0.05 N.

Perhitungan

(1 ml NaOH 0.05 N = 0.0072 gram sodium benzoat anhidrat)

$$\text{Sodium benzoat anhidrat (ppm)} = \frac{\text{Titer} \times N \text{ NaOH} \times 144 \times \text{Vol. Larutan} \times 10^6}{\text{Vol. yang diambil} \times \text{berat sampel} \times 1000}$$

I. Penetapan Zat warna Sintetis (Andarwulan, 2011)

Prinsip

Penetapan disini menggunakan serat Wool. Serat wool digunakan untuk analisis zat warna karena sifatnya yang dapat mengabsorpsi zat warna baik yang asam maupun yang basa. Serat wool dan sutra mengandung protein amfoter yang mempunyai afinitas terhadap asam maupun basa dengan membentuk garam. Dengan mengamati perubahan warna dari benang wool yang telah dicelup dalam berbagai pereaksi , jenis zat warna dapat ditentukan.

Pereaksi

1. HCl encer (1 + 9)
2. NaOH 10%
3. HCl pekat
4. H_2SO_4 pekat
5. NH_4OH 12%

Peralatan

1. Gelas Piala
2. Lempeng tetes
3. Pipet tetes

Prosedur kerja

1. 30 – 50 ml sampel cairan diasamkan sedikit dengan larutan HCl encer. Jika padatan, campur 25 g sampel dengan air kemudian homogenkan, baru diambil 30 – 50 ml seperti diatas.
2. Masukkan benang wool (20 cm) kedalam larutan, didihkan selama 30 menit.
3. Benang wool diangkat, cuci dengan air dingin.
4. Keringkan, dipotong menjadi empat bagian.
5. Tempatkan keempat potongan benang wool diatas lempeng tetes (atau masing-masing potongan dalam satu gelas piala kecil), kemudian masing-masing potongan ditetesi dengan NaOH 10% atau NH_4OH 12%, H_2SO_4 pekat, HCl pekat.
6. Amati perubahan warna yang terjadi, bandingkan dengan standar daftar warna.

Tabel 2. Beberapa Bahan Pewarna Sintetis yang Dapat diidentifikasi dari Perubahan Warna Serat Bulu Biri-Biri oleh Perlakuan Berbagai Pereaksi

Pewarna	HCl pekat	H ₂ SO ₄ pekat	NaOH 10%	NH ₄ OH 12%
Rhodamin B	Orange	Kuning	Lebih biru	Lebih kebiruan
Amaranth	Lebih gelap	Ungu kecoklatan	Coklat keruh kemerahan	Sedikit berubah
Erythrosine	Orange kuning	Orange kuning	Tidak berubah	Tidak berubah
Tartazine	Lebih gelap	Lebih gelap	Sedikit berubah	Sedikit berubah
Fast green FCF	Orange	Hijau coklat	Biru	Biru
Aniline yellow	Violet merah	Orange kuning	Sedikit berubah	Tidak berubah
Orange G	Sedikit berubah	Orange	Coklat kusam merah	Tidak Berubah
Acid violet 6B	Kuning kecoklatan	Kuning kecoklatan gelap	Kuning	Lebih kebiruan

Sumber: Andarwulan, *et al.*, (2011)

XII.

PENETAPAN INDEKS GLIKEMIK PANGAN (Rimbawan, 2004)

Pendahuluan

Indeks glikemik (IG) pangan adalah merupakan tingkatan pangan menurut efeknya terhadap gula darah. Pangan yang menaikkan kadar gula darah dengan cepat memiliki IG tinggi dan pangan yang menaikkan kadar gula darah dengan lambat memiliki IG rendah.

Karbohidrat dalam pangan yang dikonsumsi dipecah dengan cepat selama proses pencernaan memiliki IG tinggi. Respon gula darah terhadap karbohidrat ini cepat dan tinggi dengan kata lain glukosa dalam aliran darah meningkat dengan cepat. Karbohidrat yang dipecah dengan lambat memiliki IG rendah sehingga melepaskan glukosa ke dalam darah dengan perlahan. Indeks glikemik glukosa murni ditetapkan 100 dan digunakan sebagai acuan untuk penentuan IG pangan lain. Berikut dapat dilihat kategori pangan menurut rentang IG

Kategori Pangan	Rentang Indeks Glikemik*
IG rendah	< 55
IG sedang	55-70
IG tinggi	>70

*Pangan acuan adalah glukosa murni

Prosedur Kerja penetapan IG

a. Pangan Tunggal

1. Pangan yang akan ditentukan IG nya mengandung 50 g karbohidrat dan diberikan kepada relawan yang telah menjalani puasa penuh kecuali air selama semalam (sekitar pukul 20.00-08.00).
2. Selama 2 jam pasca pemberian (atau 3 jam bila relawan penderita diabetes), sampel darah sebanyak 50 μ L diambil setiap 15 menit pada jam pertama, kemudian setiap 30 menit pada jam kedua untuk diukur kadar glukosanya.

3. Pada waktu berlainan hal yang sama dilakukan dengan memberikan 50 g (glukosa murni) sebagai acuan kepada relawan. Hal ini dilakukan sebanyak dua kali (dilakukan pada hari lain, minimal 3 hari setelah perlakuan pertama) untuk mengurangi efek keragaman respon gula darah dari hari ke hari.
4. Kadar gula darah (pada setiap waktu pengambilan sampel ditebar pada dua sumbu yaitu sumbu waktu dan kadar gula darah.
5. IG ditentukan dengan membandingkan luas daerah dibawah kurva antara pangan yang di ukur IG nya dengan pangan acuan.

b. Pangan Campuran

IG pangan campuran mencerminkan bobot karbohidrat dari tiap pangan penyusunnya. IG pangan campuran berada di antara IG pangan tertinggi dan IG pangan terendah diantara komponen penyusun pangan tersebut. Contoh perhitungan IG pangan campuran dapat dilihat pada tabel berikut:

Jenis Pangan	Kandungan KH (g)	% KH Total	IG	Sumbangan terhadap IG
1 gelas susu (150 ml)	7	13,20	27	$13,20\% \times 27 = 3,56$
5 keping biscuit (40 g)	32	60,37	69	$60,37\% \times 69 = 41,65$
1 potong papaya (140 g)	14	26,41	56	$26,41\% \times 56 = 14,79$
Total	53	100,00		IG Campuran 60

DAFTAR PUSTAKA

- Andarwulan, N., Kusnandar, F., dan Herawati. 2011. Analisis Pangan. Dian Rakyat: Jakarta
- AOAC International. 1999. *Official Method of Analysis*.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, S. Yasni dan S. Budiyanto. 1989. Petunjuk Praktikum Analisis Pangan. IPB Press, Bogor.
- Bintang, M. 2010. Biokimia Teknik Penelitian. Erlangga: Jakarta
- Huang, Yu-Ching, Chang, Yung-Ho., dan Shao, Yi-Yuan. 2005. *Effects of Genotype and Treatment on the Antioxidant Activity of Sweet Potato in Taiwan. Food Chemistry* 98 (2006) 529-538.
- Muchtadi, D. 1989. Evaluasi Nilai Gizi Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor
- Muchtadi, T.R., Sugiyono. 1989. Petunjuk Laboratorium Ilmu Bahan Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor
- Rimbawan dan Siagian Albiner. 2004. Indeks Glikemik Pangan Cara Mudah Memilih Makanan Yang Menyehatkan. Penebar Swadaya. Jakarta
- Sibarani, S., F. Anwar, Rimbawan, V. Julita, T. Riani. 1991. Penuntun Praktikum Analisis Zat Gizi. Jurusan Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga, Fakultas Pertanian IPB, Bogor.
- SNI 01-2358-1991. Penentuan Kadar Borax dalam Makanan. Badan Standarisasi Nasional.
- SNI 01-2891-1992. Cara Uji Makanan dan Minuman. Badan Standarisasi Nasional.
- SNI 01-2894-1992. Cara Uji Bahan Tambahan Makanan / Bahan Pengawet. Badan Standarisasi Nasional.
- SNI 01-3555-1998. Cara Uji Minyak dan Lemak. Badan Standarisasi Nasional.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, Suhardi. 1984. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Minuman. Liberty, Yogyakarta.
- Sulaeman, A., F. Anwar, Rimbawan, S.A. Marliyati. 1994. Metode Penetapan Zat Gizi. Jurusan Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga, Fakultas Pertanian IPB, Bogor.

Lampiran 1. Percobaan Penetapan Keasaman

Prinsip

Susu segar tidak banyak mengandung asam laktat, oleh karena itu kenaikan keasaman susu menunjukkan adanya aktifitas bakteri yang dapat merubahnya menjadi asam dan dapat dikatakan bahwa umur susu dinyatakan sudah lama. Keasaman susu biasanya dinyatakan sebagai asam laktat.

Metode Titrimetri

Prosedur Kerja :

1. Timbang dengan teliti 10 gram contoh dalam erlenmeyer.
2. Tambahkan 10 ml air bebas CO₂
3. Titrasi dengan larutan NaOH 0.1 N dengan Phenophtalein (PP) sebagai indikator sampai timbul warna kemerah-merahan (pink).

Perhitungan :

Kadar asam dihitung sebagai asam laktat

$$\text{Kadar asam} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N. NaOH} \times 90}{\text{Bobot contoh (mg)}} \times 100\%$$

Catatan : bobot equivalent asam laktat = 90

Lampiran 2. Percobaan Penetapan Kadar Gula

Prinsip

Sukrosa (gula pasir) merupakan disakarida yang bukan merupakan gula pereduksi, sedangkan disakarida lainnya seperti laktosa mempunyai sifat pereduksi, sehingga dapat ditetapkan kadarnya secara langsung (tanpa dihidrolisa terlebih dahulu).

Kadar gula setelah dihidrolisa disebut kadar gula sesudah inverse dan kadar gula sebelum hidrolisis disebut kadar gula sebelum inverse.

Kadar sukrosa adalah kadar gula menyusut setelah inverse dikurangi kadar gula sebelum inverse dan dikalikan dengan factor 0.95 yang didapat dari BM sukrosa dibagi BM glukosa dan fruktosa, yaitu $342 : 360 = 0.95$.

Metode Titrimetri (Luff Schoorl)

Prinsip kerja :

a. Persiapan contoh

1. Pipet 5 ml contoh dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml
2. Tambahkan 10 ml Pb-asetat setengah basa, dikocok (tambahkan dengan pipet tetes larutan Na_2HPO_4 1 %, tetes demi tetes), bila timbul endapan putih berarti Pb-asetat sudah cukup.
3. Tambahkan lagi Na_2HPO_4 1 % sampai tidak terbentuk endapan putih lagi (berarti kelebihan Pb-asetat telah diendapkan semuanya).
4. Tera dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
5. Biarkan selama 30 menit kemudian saring.

b. Penetapan sebelum inversi

1. Pipet 10 ml filtrat larutan contoh dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml.
2. Tambahkan 15 ml air dan 25 ml larutan Luff serta beberapa batu didih.
3. Panaskan selama 2 menit sampai mendidih dan didihkan terus sampai 10 menit dengan api kecil.

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

4. Dinginkan dan tambahkan 10 ml KI 30%, 25 ml H₂SO₄ 25% (hati-hati karena terbentuknya CO₂).
 5. Titrasi dengan larutan thio 0.1 N dengan indikator kanji 0.5%, misalnya memerlukan A ml thio 0.1 N.
 6. Kerjakan pula penetapan blanko dengan 25 ml air suling dan 25 ml Luff (tanpa contoh), misalnya memerlukan B ml larutan thio 0.1 N.
- c. Penetapan sesudah inverse
1. Pipet 10 ml saringan dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
 2. Tambahkan 5 ml larutan HCl 25%
 3. Panaskan dalam penangas air pada suhu 70°C selama 10 menit (gunakan stopwatch).
 4. Setelah dingin, netralkan dengan NaOH 30% dengan indicator PP sampai warna berubah menjadi merah jambu muda.
 5. Tepatkan sampai tanda tera dengan air suling.
 6. Pipet 10 ml dan masukkan ke dalam erlenmeyer.
 7. Tambahkan 15 ml air suling dan 25 ml larutan Luff serta batu didih.
 8. Panaskan selama 2 menit sampai mendidih dan didihkan selama 10 menit dengan api kecil.
 9. Dinginkan segera dalam es.
 10. Tambahkan 10 ml KI 30% dan 25 ml H₂SO₄ 25%.
 11. Titrasi dengan larutan thio 0.1 N dengan kanji sebagai indikator.
 12. Kerjakan juga untuk blanko.

Perhitungan

$$\text{Kadar gula sebelum inverse (\%)} = \frac{Y \times \text{faktor pengenceran} \times 100\%}{\text{Bobot contoh}}$$

$$\text{Kadar gula sesudah inverse (\%)} = \frac{Y \times \text{faktor pengenceran} \times 100\%}{\text{Bobot contoh}}$$
$$\frac{Y \times (100/10) \times 100\%}{5}$$

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif

Kadar sukrosa = (kadar gula sesudah inverse – kadar gula sebelum inverse) x 0.95

Keterangan : cara perhitungan nilai sama dengan cara yang dilakukan untuk penetapan kadar karbohidrat (pati)

Lampiran 3. Larutan Pereaksi

Larutan-larutan pereaksi yang digunakan dalam kimia analisis dapat dibagi menjadi 2 golongan :

1. larutan pereaksi yang digunakan untuk analisis kuantitatif, sehingga konsentrasi dari volume larutan pereaksi yang digunakan harus diketahui dengan tepat.
2. larutan pereaksi yang digunakan untuk analisis kualitatif. Larutan-larutan seperti ini konsentrasi dan volumenya tidak perlu tepat sekali.

Dalam ilmu kimia, konsentrasi suatu larutan dapat dinyatakan dengan beberapa cara :

1. gram per satuan volume.
misalnya, 2 g/l larutan NaCl, artinya 2 gram NaCl kristal dilarutkan dengan air dan diencerkan sampai volumenya menjadi 1 liter. Satuan ini merupakan berat jenis larutan.
2. persen (%) berat.
misalnya, 5% berat larutan HCl, berarti terdapat 5 gram HCl yang diencerkan dengan air sampai volumenya 100 ml.
3. perbandingan volume.
misalnya, HCl (1:4), artinya 1 bagian HCl pekat dicampurkan dengan 4 bagian volume air.
4. molal (m).
misalnya, kelarutan NaOH 1 molal, artinya larutan dari 1 mol dalam 1000 gram pelarut.
5. molar (M).
misalnya, larutan NaOH 2 M, artinya 2 mol NaOH dalam 1 liter larutan yaitu (2 x 40) gram NaOH dilarutkan dalam air kemudian diencerkan sampai volumenya menjadi 1 liter.
6. normal (N).
misalnya, larutan 1 normal berarti larutan dari 1 gram ekuivalen/ bobot setara zat terlarut dalam 1 liter larutan.

7. ppm (part per million).

Misalnya, 1 ppm larutan Na, artinya dalam 1 liter larutan mengandung 1 mg Na. Bila 1 kg tanah mengandung 1 mg Na, maka dalam tanah terkandung Na sebanyak 1 ppm. 1 ppm Na dapat dibuat dengan

melarutkan 0.0025 gram NaCl per liter, artinya kalau dihitung banyaknya Na : (B.A. Na / B.M. NaCl) x 0.0025 gram NaCl = 1 mg Na

contoh

- berapa gram NaOH harus ditimbang untuk membuat 500 ml larutan NaOH 0.1 M ? (berat molekul NaOH = 40)

$$\begin{aligned}\text{NaOH } 0.1 \text{ M} &= \frac{0.1 \text{ mol}}{\text{liter}} \\ &= \frac{0.1 \times 40 \text{ gram}}{\text{liter}} \\ &= 4 \text{ gram/liter}\end{aligned}$$

- H_2SO_4 5 N sebanyak 25 ml diencerkan dengan air suling sehingga volumenya menjadi 250 ml, berapa normalitas H_2SO_4 tersebut?

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 25 \text{ ml} \times 5 \text{ N} &= 250 \text{ ml} \times N_2 \\ N_2 &= 125 / 250 \\ &= 0.5 \text{ N}\end{aligned}$$

jadi normalitas larutan H_2SO_4 tersebut adalah 0.5 N.

Lampiran 4. Pembuatan Larutan Pereaksi

A. Pembuatan larutan Sorensen dan larutan NaOH 0.1 N

Larutan NaOH tidak dapat dibuat langsung dengan menimbang hablur NaOH dalam jumlah tertentu yang dihitung lebih dahulu sesuai dengan kepekatan yang diinginkan, sehingga titarnya dapat diketahui dengan tepat. Hal ini disebabkan karena padatan NaOH sangat mudah bereaksi dengan CO_2 membentuk karbonat. Oleh karena itu untuk membentuk larutan NaOH encer terlebih dahulu secara kasar dibuat Sorensen (larutan NaOH 50%) yang mempunyai normalitas 19 N.

Dalam hidrosida sepekat ini Na_2CO_3 tak dapat larut, maka sesudah 2 sampai 3 hari segala kotoran terendapkan. Untuk menetapkan titar larutan encer NaOH yang diperoleh, dipakai larutan asam sebagai bahan baku. Salah satu bahan baku yang dipakai adalah asam oksalat.

Prosedur

1. Pembuatan larutan Sorensen.

Ke dalam 50 ml air suling dalam gelas piala 100 ml ditambahkan sedikit demi sedikit 50 gram hablur NaOH sambil diaduk. Hati-hati, campuran menjadi panas, kalau perlu dinginkan dengan air. Biarkan larutan selama lebih kurang 2 hari.

2. Pembuatan larutan NaOH 0.1 N.

Dari larutan Sorensen yang lebih jernih diambil (dengan gelas ukur) kurang lebih 1.3 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 250 ml, lalu diencerkan dengan air suling yang sudah dipanaskan terlebih dahulu kemudian ditera sampai tanda garis.

B. Penetapan titar larutan NaOH 0.1 N

Prosedur kerja

1. Timbang dengan teliti lebih kurang 636 mg asam oksalat murni (dengan kaca arloji).
2. Larutkan ke dalam sebuah labu ukur 100 ml dengan akuades dan tepatkan sampai tanda garis, kemudian larutan dikocok hingga homogen.
3. Pipet 25 ml larutan asam oksalat tersebut dan tempatkan ke dalam erlenmeyer.

4. Tambahkan 2 – 3 tetes indikator PP, kemudian titrasi dengan larutan NaOH 0.1 N sampai memberi warna merah jambu muda.
5. Penetapan dilakukan 3 kali.

Perhitungan :

$$N \text{ NaOH} = \frac{\text{mg asam oksalat}}{(100/25) \times \text{ml NaOH} \times 63}$$

C. Pembuatan dan penetapan titar HCl 0.1 N dengan boraks sebagai bahan baku

Boraks digunakan sebagai bahan baku karena mudah diperoleh dalam keadaan murni, cukup stabil dan memiliki berat ekuivalen yang tinggi.

Prosedur

1. Pipet 2.23 ml HCl pekat (tidak dengan mulut), masukkan ke dalam labu ukur 250 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda tera.
2. Untuk menetapkan titarnya (HCl), timbang dengan teliti lebih kurang 500 mg boraks murni (menggunakan kaca arloji kering).
3. Masukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling kemudian tepatkan sampai tanda garis.
4. Pipet 25 ml larutan boraks ke dalam erlenmeyer, bubuhi 3 – 5 tetes indikator MM, lalu titrasi dengan larutan HCl 0.1 N hingga berwarna merah jingga.
5. Penetapan dilakukan 3 kali.

Perhitungan :

$$N \text{ HCl} = \frac{\text{mg boraks}}{(100/25) \times \text{ml HCl} \times 124}$$

D. Pembuatan dan penetapan titar larutan KMnO_4 0.1 N dengan asam oksalat sebagai bahan baku

Prinsip

Kalium permanganat merupakan salah satu bahan penitar yang sering dipergunakan dalam titrasi oksidisimetri. Dalam proses pembuatan dan penyimpanan larutannya ada sebagian dari KMnO_4 mengalami reduksi menjadi MnO_2 . MnO_2 ini merupakan katalis untuk penguraian KMnO_4 selanjutnya, karena itu titar larutan KMnO_4 tidak dapat ditentukan secara langsung dari penimbangan. Asam oksalat dapat digunakan sebagai bahan baku primer untuk menetapkan titar larutan KMnO_4 . Larutan asam oksalat yang tertentu normalitasnya dititar dengan larutan KMnO_4 . Penitaran dilakukan dalam suasana asam dan suhu diatur 70°C . Pada penitaran ini tidak dipakai indicator lagi, karena larutan KMnO_4 yang encer sekali sudah memberikan warna merah jambu dalam larutan.

Prosedur kerja

1. Pembuatan larutan KMnO_4 0.1 N
timbang kurang lebih 790 mg hablur KMnO_4 , masukkan ke dalam labu ukur 250 ml.
larutkan dengan air suling dan tepatkan sampai tanda tera.
larutan disimpan selama 1 minggu kemudian disaring dengan kaca masir. (untuk proses lebih cepat, didihkan terlebih dulu 25 menit dan disaring setelah larutan dingin).
2. Penetapan titar larutan KMnO_4 0.1 N
 - 2.1 timbang dengan teliti kurang lebih 630 mg hablur asam oksalat, masukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
 - 2.2 larutkan dengan air suling dan tepatkan sampai tanda tera.
 - 2.3 pipet larutan tersebut sebanyak 25 ml dan tempatkan dalam erlenmeyer 300 ml.
 - 2.4 tambahkan 25 ml H_2SO_4 4 N (dengan gelas ukur).
 - 2.5 panaskan hingga 70°C .
 - 2.6 titrasi dengan larutan KMnO_4 sampai berwarna merah jambu.
 - 2.7 penetapan dilakukan 3 kali

E. Pembuatan dan penetapan titar thio 0.1 N

Prinsip

Natrium thiosulfat (thio) banyak digunakan dalam titrasi iodometri. Karena thio sukar diperoleh dalam keadaan murni, maka normalitasnya tidak dapat ditentukan langsung dari penimbangan dan perlu ditetapkan dengan bahan baku lain. Penetapan titar thio diantaranya dapat dilakukan dengan kalium dichromat dan kalium iodida. Kemudian iod yang dibebaskan dititar dengan larutan thio yang akan ditetapkan titarnya, dengan menggunakan larutan kanji sebagai indikator.

Prosedur kerja

1. timbang dengan teliti kurang lebih 6.2 gram $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, masukkan ke dalam labu ukur 500 ml,
2. larutkan dengan air suling yang telah dipanaskan terlebih dulu,
3. tambahkan 0.1 gram NaCO_3 , kemudian tepatkan sampai tanda tera dan biarkan selama seminggu,
4. untuk menetapkan titar thio, timbang dengan teliti kurang lebih 500 mg kalium dichromat, masukkan ke dalam labu ukur 500 ml,
5. larutkan dengan air suling dan encerkan sampai tanda tera.
6. masukkan 7.5 ml larutan KI 20% dan 20 ml HCl 4 N ke dalam erlenmeyer 300 ml,
7. tambahkan 25 ml larutan kalium dichromat kemudian tambahkan indikator kanji,
8. titrasi dengan larutan thio yang sudah didiamkan selama seminggu, perubahan warna dari biru tua menjadi hijau muda/krem susu,
9. penetapan dilakukan 3 kali.

F. Pembuatan larutan Luff

1. timbang 50 gram asam sitrat dan larutkan dalam 50 ml air,
2. timbang 388 gram $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ dan larutkan dalam 400 ml air,
3. timbang 25 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ dan larutkan dalam 100 ml air,

4. tempatkan larutan soda (Na_2CO_3) dalam labu ukur 1 liter,
5. tambahkan sedikit demi sedikit larutan asam sitrat ke dalam larutan soda,
6. kemudian tambahkan larutan terusi (CuSO_4) dan encerkan sampai 1 liter.

G. Pembuatan larutan Pb-asetat setengah basa

1. timbang 430 gram $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dan 130 gram PbO , dimasukkan ke dalam erlenmeyer besar,
2. tambahkan 1 liter air dan didihkan selama 30 menit kemudian dinginkan dan biarkan mengendap,
3. dekantasi dan encerkan dengan air suling yang baru dididihkan, sampai mencapai bobot jenis 1.25,

Bila larutan ini akan digunakan, encerkan satu bagian larutan tersebut dengan empat bagian air panas, bila keruh harus disaring.

H. Pembuatan larutan dye

1. Timbang dengan teliti 0.1250 gram natrium 2,6 dichlorophenol indophenol dan larutkan dalam 500 ml air suling yang mengandung 0.1050 gram natrium hydrogen carbonat (dalam gelas piala).
2. Panaskan sampai mendidih dan saring bila larutan telah dingin.

I. Pembuatan larutan $\text{NH}_2\text{OH} - \text{HCl}$ 2% (Hydroksilamin chlorrid)

Timbang 2 gram $\text{NH}_2\text{OH} - \text{HCl}$, kemudian masukkan dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda tera.

J. Pembuatan larutan buffer asetat

Timbang 8.3 gram Natrium asetat anhidrat, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan tambahkan 12 ml asam asetat glacial dan encerkan dengan air suling sampai tanda tera.

K. Pembuatan larutan pereaksi ammonium molibdat

1. Timbang 50 gram ammonium molibdat kemudian tambahkan 140 ml air suling (larutan 1),
2. Timbang 50 gram asam tartrat kemudian tambahkan 140 ml air suling (larutan 2),
3. HNO_3 (p) sebanyak 295 ml ditambah dengan 400 ml air suling (larutan 3),
4. Masukkan ketiga larutan diatas ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda tera.

L. Pembuatan larutan dipiridil 0.1 %

Timbang dengan teliti 0.1 gram dipiridil, lalu masukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda tera.

M. Pembuatan larutan KOH dalam etanol 10%

Timbang 10 gram kalium hidroksida, kemudian dilarutkan dalam 100 ml etanol absolute dan aduk sampai homogen (dalam gelas piala 250 ml).

N. Pembuatan ammonium nitrat 50%

Timbang 50 gram NH_4NO_3 , lalu masukkan dalam gelas piala 350 ml dan encerkan dengan air suling sampai 100 ml.

Lampiran 5. Pembuatan Indikator - indikator

A. Sindur metil (SM)

Larutkan 0.5 gram indikator SM dalam 1 liter air suling dan saring bila timbul endapan.

B. Merah metil (MM)

Larutkan 1gram indikator ini dalam 1 liter air panas atau dilarutkan dalam 600 ml alkohol (70 – 90%) , kemudian encerkan dengan 400 ml air.

C. Phenolphthalein (PP)

Ada dua cara untuk membuat indikator PP, yaitu :

1. larutkan 5 gram indikator dalam 500 ml alkohol (70 – 90%) dan tambahkan 900 ml air. Selama melarutkan, harus diaduk terus menerus. Bila terdapat endapan maka larutan harus disaring.
2. larutkan 1 gram indikator dalam 60 ml ethylene glycol monoetil – eter (t.d. 135^oC) dan encerkan sampai 100 ml dengan air suling. Dengan cara ini, berkurangnya larutan indikator sebagai akibat dari penguapan dapat dikurangi.

D. Kanji

Kanji sebanyak 1 gram dibuat pasta dengan sedikit air, dituangkan ke dalam 100 ml air mendidih, selama penambahan campuran diaduk terus, kemudian dididihkan lagi selama 1 menit. Setelah dingin ditambahkan 2 – 3 gram KI. Larutan ini disimpan dalam botol yang tertutup.

E. Hijau bromokresol 1%

Timbang 1 gram indikator hijau bromokresol, masukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan larutkan sampai tanda tera dengan air suling.

Lampiran 6. Tabel Luff School (Sulaeman, 1994)

ml Thiosulfat 0.1 N	Glukosa	Galaktosa	Laktosa	Maltosa
1	2.4 2.4	2.7 2.8	3.6 3.7	3.9 3.9
2	4.8 2.4	5.5 2.8	7.8 3.7	7.8 3.9
3	7.2 2.5	8.3 2.9	11.0 3.7	11.7 3.9
4	9.7 2.5	11.2 2.9	14.7 3.7	15.6 4.0
5	12.2 2.5	14.1 2.9	18.4 3.7	19.6 3.9
6	14.7 2.5	17.0 3.0	22.1 3.7	23.5 4.0
7	17.2 2.6	20.0 3.0	25.8 3.7	27.5 4.0
8	19.8 2.6	23.0 3.0	29.5 3.7	31.5 4.0
9	22.4 2.6	26.0 3.0	33.2 3.8	35.5 4.0
10	25.0 2.6	29.0 3.0	37.0 3.8	39.5 4.0
11	27.7 2.7	32.0 3.0	40.8 3.8	43.5 4.0
12	30.3 2.7	35.0 3.1	44.6 3.8	47.5 4.1
13	33.0 2.7	38.1 3.1	48.4 3.8	51.6 4.1
14	35.7 2.8	41.2 3.2	52.2 3.8	55.7 4.1
15	38.5 2.8	44.4 3.2	56.0 3.9	59.8 4.1
16	41.3 2.9	47.6 3.2	59.9 3.9	63.9 4.1
17	44.4 2.9	50.8 3.2	63.8 3.9	68.0 4.2
18	47.1 2.9	54.0 3.3	67.7 4.0	72.2 4.3
19	50.0 3.0	57.3 3.4	71.7 4.0	76.5 4.4
20	53.0 3.0	60.7 3.5	75.7 4.1	80.9 4.5
21	56.0 3.1	64.2 3.5	79.8 4.1	85.4 4.6
22	59.1 3.1	67.7 3.6	83.9 4.1	90.0 4.6
23	62.2	71.3	88.0	94.6

Lampiran 7. Alat – alat



a. labu kjeldahl



b. labu lemak



c. cawan porselin dan tutup



d. cawan aluminium



e. gegap



f. pipet mohr

Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif



g. gelas piala



h. gelas ukur



i. labu takar 1000 ml, 500 ml, 250 ml



j. labu takar 100 ml, 50 ml



k. corong pemisah



l. erlenmeyer

SEKILAS TENTANG PENULIS



RINA YENRINA, dilahirkan di Bukittinggi, 25 Januari 1962. Pendidikan SMA-nya diselesaikan di SMA N I Bukittinggi pada tahun 1981, kemudian melanjutkan pendidikan di Institut Pertanian Bogor, Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi lulus pada tahun 1985. Pada Tahun 1995 memperoleh gelar Magister Sains dalam bidang ilmu Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga dari Program

Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Pada Tahun 2001 memperoleh gelar Doktor pada Jurusan yang sama. Sejak tahun 1988 sampai sekarang bekerja sebagai dosen tetap di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Andalas Padang.