

39

ACADEMIC CURRICULUM DEVELOPMENT

BUKU AJAR

ANALISIS PANGAN



Oleh:

Anang M. Legowo
Nurwantoro
Sutaryo

LPT-MUSTAK-UNWD	
No. Ref:	0173/BA/FP/C1
Tgl.	22-7-2009

Program Studi Teknologi Hasil Ternak
Fakultas Peternakan
Universitas Diponegoro
Semarang
2007

BAB I

PENDAHULUAN

Ilmu pengetahuan dan teknologi dibidang pangan kini telah berkembang cukup maju. Berbagai hasil pertanian terus diupayakan untuk ditangani dan diolah agar dapat dimanfaatkan secara optimal bagi kepentingan manusia. Bagian atau cabang dari ilmu pengetahuan tentang hal tersebut juga terus dikembangkan, yang salah satunya adalah ilmu analisis pangan.

Analisis berasal dari kata "analisis" dari bahasa Yunani. Istilah tersebut kemudian diserap ke dalam bahasa Latin yang mempunyai arti yaitu: *Ana* = kembali, dan *Luein* = melepas. Berdasarkan asal kata itulah analisis kini diartikan sebagai upaya pemisahan atau penguraian suatu kesatuan materi bahan menjadi komponen senyawa-senyawa penyusunnya, sehingga hasil (data) yang diperoleh dapat dikaji lebih lanjut. Dalam bahasa Inggris, "analysis" mempunyai pengertian analisis secara tunggal, sedangkan "analyses" mempunyai pengertian jamak

Pangan adalah makanan atau bahan hasil pertanian dan olahannya yang layak dikonsumsi manusia. Bahan pangan dikenal memiliki sifat fisik, kimiawi, biologis, serta mampu menimbulkan selera dan manfaat untuk dikonsumsi. Oleh sebab itu, analisis pangan dapat dilakukan dengan menggunakan kaidah-kaidah fisik, kimiawi, biologi, inderawi atau sensorik, dan nutrisi atau gizi.

Tujuan analisis pangan antara lain yaitu:

- 1). Menguraikan komponen-komponen bahan pangan (baik jenis maupun jumlahnya), sehingga dapat disusun komposisi bahan tersebut.
- 2). Menentukan suatu komponen bahan untuk menentukan kualitas bahan pangan tersebut.

- 3). Menentukan komponen bahan untuk menyusun menu.
- 4). Menentukan ada/tidaknya bahan ikutan/tambahan dalam makanan.
- 5). Mendeteksi adanya bahan metabolik senyawa beracun dalam makanan.
- 6). Mengikuti terjadinya perubahan selama penanganan/pengolahan.

Komponen bahan pangan adalah merupakan senyawa kimia yang memiliki karakteristik tertentu. Komponen utama bahan pangan terdiri dari air, protein, karbohidrat, vitamin, mineral dan beberapa senyawa minor lain. Akan tetapi, komponen bahan pangan tersebut sering dikelompokkan ke dalam tiga golongan, yaitu: air, makronutrien, dan mikronutrien. Menurut Sudarmadji *et al.*, (1996) komponen bahan pangan, selain air, dapat dikelompokkan lebih lengkap, yaitu:

- 1). Kelompok Makronutrien
 - a. Karbohidrat
 - b. Lemak
 - c. Protein
- 2). Kelompok Mikronutrien
 - a. Vitamin
 - b. Mineral
- 3). Kelompok Bahan Ikutan (Food adjunct)
 - a. Alkaloid (Kafein, nikotin, dll)
 - b. Anti gizi (Antitripsin, Fitat, dll)
 - c. Warna Alami
 - d. Aroma Alami
- 4). Kelompok Bahan Tambahan (Food Aditive)
 - a. Pengawet
 - b. Penstabil
 - c. Pengental
 - d. Pewarna
 - e. Penyedap rasa
 - f. dll.

5). Kelompok Bahan Metabolit

- a. Disengaja (Alkohol, Laktat)
- b. Tak disengaja (Aflatoksin, senyawa beracun yang lain)

BAB II

DASAR ANALISIS

Dalam persiapan analisis pangan perlu dipertimbangkan beberapa hal, antara lain berkaitan dengan pemilihan prosedur analisis, pengambilan sampel atau cuplikan, dan langkah-langkah analisis. Apabila persiapan analisis telah dilakukan dengan baik maka pelaksanaan analisis diharapkan dapat berjalan dengan baik, sehingga hasil yang diperoleh juga akan memuaskan.

2.1. Dasar Pemilihan Prosedur Analisis

Dalam memilih prosedur analisis, sedikitnya ada tiga hal yang harus diketahui, yaitu: (1) Pengetahuan dasar komposisi suatu bahan, (2) Tingkat ketelitian yang dikehendaki, dan (3) Jumlah atau banyaknya sampel yang tersedia.

Pengetahuan tentang komposisi suatu bahan diperlukan untuk mengkonfirmasi hasil analisis, sehingga dapat dipastikan apakah prosedur analisis telah dilakukan dengan baik atau tidak. Apabila analisis berjalan dengan baik, maka hasil yang diperoleh tidak banyak menyimpang. Sebaliknya apabila pelaksanaan analisis tidak baik, maka hasil yang diperoleh akan mengalami bias atau penyimpangan yang besar.

Tingkat ketelitian suatu analisis juga perlu dipertimbangkan. Banyak prosedur analisis yang ada, masing-masing mempunyai tingkat ketelitian yang tidak sama. Untuk memperoleh hasil dengan tingkat ketelitian yang tinggi, maka harus dipilih prosedur analisis yang juga memiliki ketelitian tinggi. Sedangkan untuk memperoleh data kasar dapat dipilih prosedur analisis yang sederhana dan simpel.

Prosedur analisis pada umumnya dilengkapi penggunaan alat-alat dengan spesifikasi dan ukuran tertentu. Oleh sebab itu, pemilihan prosedur analisis harus dipertimbangkan dengan banyak sedikitnya bahan atau sampel yang tersedia.

Disamping beberapa hal tersebut di atas, ada beberapa ciri yang menunjukkan suatu prosedur analisis dianggap baik. Sudarmadji (1996) dan Sudarmadji, *et al.*, (1996) menyebutkan bahwa prosedur analisis yang ideal sebaiknya memenuhi syarat: sah, tepat, cermat, cepat, hemat, selamat, dapat diulang, khusus, andal dan mantap. Berikut ini beberapa persyaratan prosedur analisis yang ideal.

- 1) Prosedur harus sah ("valid") untuk suatu pengukuran.
- 2) Prosedur memiliki ketepatan ("accuracy") tinggi.
- 3) Prosedur memiliki nilai kecermatan ("precision") tinggi
- 4) Prosedur singkat atau cepat.
- 5) Prosedur harus aman atau memiliki tingkat keselamatan tinggi.
- 6) Prosedur dapat diulang ("reproducibility") dengan hasil yang relatif sama, atau secara statistik tidak berbeda nyata.
- 7) Prosedur memiliki sifat khusus untuk suatu pengukuran.
- 8) Prosedur harus dapat diandalkan ("reliable") dalam berbagai kondisi tempat dan peralatan yang digunakan.
- 9) Prosedur harus mantap ("stable"), sehingga dapat dilaksanakan dalam batas waktu yang wajar dan tidak harus tergesa-gesa.

2.2. Dasar Pengambilan Sampel/Contoh/ Cuplikan.

Dalam "sampling" atau pengambilan sampel ada dua faktor penting yang harus diperhatikan, yaitu:

- 1). Pengambilan sampel harus bersifat "representatif". Artinya sampel yang diambil harus mewakili sifat keseluruhan bahan dan mewakili populasi bahan yang akan dianalisis. Untuk bahan yang berupa cairan, sebelum pengambilan sampel harus dilakukan pengadukan bahan hingga merata atau homogen. Untuk bahan yang berupa benda padat,

pengambilan sampel harus dilakukan dari beberapa bagian (tempat/ lokasi) bahan tersebut dan kemudian dicampur menjadi satu kesatuan. Untuk penyempurnaan proses pencampuran bahan padat, proses pencampuran bisa mempergunakan "blender".

- 2). Jumlah sampel yang diambil harus memenuhi persyaratan minimal. Jumlah sampel dapat diambil sebanyak 5-20% dari jumlah keseluruhan bahan. Pengambilan sampel dalam jumlah tersebut juga harus memperhatikan faktor pertama, yakni "representatif". Semakin homogen suatu bahan, persentase jumlah sampel yang diambil dapat semakin kecil (dalam kisaran 5-20%).

Pada saat pengambilan sampel perlu diperhatikan kemungkinan terjadinya perubahan sampel. Perubahan tersebut dapat disebabkan karena beberapa faktor berikut ini :

- 1) Perubahan kimiawi, misalnya karena proses oksidasi.
- 2) Perubahan biokimiawi/enzimatis
- 3) Perubahan akibat kontaminasi mikroorganisme.
- 4) Perubahan fisis
- 5) Perubahan mekanis

2.3. Langkah Analisis

Kegiatan analisis pangan pada dasarnya mencakup beberapa langkah berikut, yaitu: penetapan batasan masalah, "sampling", dan penetapan cara pengukuran.

1) Batasan Masalah Analisis

Batasan masalah analisis menyangkut penentuan tujuan dan target analisis yang nantinya berkaitan erat dengan pemilihan metode dan prosedur analisis.

2) "Sampling" dan Perlakuan Pendahuluan

Pada waktu "sampling" harus mengacu pada ketentuan bahwa sampel harus "representatif" dan dalam jumlah yang cukup (5-20%).

Disamping itu, kadang diperlukan perlakuan pendahuluan untuk sampel dan analisis tertentu, misalnya melarutkan, atau memisahkan komponen tertentu.

3) Pengukuran

Pengukuran bahan secara kuantitatif dapat dikelompokkan dalam beberapa cara, yaitu: kimiawi, elektronis, spektroskopi, fisikawi dan biologi. Secara ringkas beberapa cara tersebut diberikan ilustrasi seperti tersebut di bawah ini.

a. Kimiawi

Cara kimiawi merupakan cara paling banyak diterapkan. Dalam metoda ini digunakan senyawa atau reagensia kimia yang memungkinkan terjadi reaksi dan hasil/produk reaksi. Jumlah reagensia atau jumlah produk reaksi akhirnya dapat diukur.

b. Elektronis

Cara ini diterapkan dengan pengukuran tenaga potensial, aliran listrik, konduktivitas, dan sifat elektronis yang lain dari bahan, yang dapat diukur setelah direaksikan dengan reagensia.

c. Spektroskopi

Mencakup pengukuran jumlah radiasi gelombang elektromagnetis yang diserap atau ditimbulkan bahan. Pengukuran gelombang sinar tampak (visible) UV, IR, sinar lainnya.

d. Fisikawi

Pada cara fisikawai diterapkan metoda pengukuran berdasarkan sifat dan besaran fisik bahan. Cara ini mencakup pengukuran : BJ, index refraksi, pemutaran optimal sifat magnetis.

e. Biologi

Pada cara biologi didasarkan atas terjadinya reaksi dan proses yang terjadi pada mahluk hidup. Pengukurannya melalui penggunaan hewan percobaan, mikrobia, dan uji inderawi.

2.4. Kesalahan dalam Analisis

Dalam melaksanakan analisis pangan, kadang ditemui adanya kesalahan. Pada prinsipnya kesalahan tersebut dapat dikelompokkan ke dalam kesalahan yang sifatnya tetap dan kesalahan bersifat sistematis.

1) Kesalahan Tetap (“Constant Determinant Error”)

- Alat pengukur
- Kemurnian Bahan

2) Kesalahan Sistematis (“Systematic Error”)

- Kesalahan dalam prosedurnya
- Kesalahan dalam pengambilan & persiapan contoh
- Kesalahan dalam menerapkan metoda analisis
- Kesalahan pengerjaan

Untuk memperkecil kemungkinan kesalahan dalam analisis, kedua hal tersebut di atas harus diantisipasi. Disamping itu, ada beberapa saran penting yang harus diperhatikan dalam analisis bahan pangan, yaitu : cara pengambilan dan persiapan sampel, ketepatan analisis dan pemilihan metode yang tepat.

2.5. Unit dan Peralatan Dasar Pengukuran

Unit pengukuran dengan sistem internasional disingkat dengan SI didasarkan pada sistem MKS (meter-kilogram-seconds). Unit dasar dari SI dapat dilihat pada pada Tabel 1. Unit SI yang lain dapat diturunkan dari unit dasar tersebut, misalnya Newton (N) adalah $\text{kg} \times \text{m} \times \text{s}^{-2}$. Untuk kelipatan unit dapat digunakan “prefix” atau awalan sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 2. Unit dasar untuk pengukuran yang sering digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.

Dalam analisis pangan diperlukan berbagai jenis peralatan. Akan tetapi peralatan dasar yang lazim digunakan untuk pengukuran dalam analisis pangan, yaitu: alat ukur volume, alat ukur berat, alat ukur panjang, alat ukur waktu dan alat ukur suhu.

(1) Alat pengukur volume

Untuk mengukur volume larutan atau bahan cair dapat digunakan gelas ukur dan labu ukur. Kedua macam alat ini ada dalam berbagai ukuran, dari kecil 10 ml, 25 ml, 50 ml hingga yang berukuran 500 ml dan 1000 ml. Erlenmeyer dan beakerglass bukan merupakan alat ukur volume.

(2) Alat pengukur berat

Alat pengukur berat bahan adalah neraca. Kini ada banyak jenis neraca yang bervariasi tergantung pada tingkat kepekaannya. Neraca dapat dikelompokkan kedalam neraca dengan dua piring (disc) dan neraca dengan satu piring. Neraca dengan dua piring sekarang ini relatif tidak banyak dipakai, karena kurang praktis dan ketelitiannya terbatas. Sedangkan neraca dengan satu piring dan skala digital makin banyak digunakan, karena praktis dan mempunyai kepekaan tinggi.

(3) Alat pengukur panjang

Alat pengukur panjang bahan yang biasa digunakan adalah penggaris dengan skala berjarak 1 cm dan dilengkapi dengan tanda dalam mm.

(4) Alat pengukur waktu

Alat pengukur waktu adalah jam atau "stopwatch" yang sering digunakan untuk menentukan batas waktu berlangsungnya suatu reaksi kimia atau waktu untuk perlakuan tertentu.

(5) Alat pengukur suhu

Alat pengukur suhu adalah thermometer. Ada beberapa skala pada thermometer yaitu Celcius ($^{\circ}\text{C}$), Reamur ($^{\circ}\text{R}$), Kelvin ($^{\circ}\text{K}$) dan Fahrenheit ($^{\circ}\text{F}$). namun demikian yang biasa digunakan dalam analisis pangan adalah thermometer dengan skala suhu derajat celcius ($^{\circ}\text{C}$).

Gambar peralatan untuk pengukuran volume cairan (labu ukur dan gelas ukur) dapat dilihat pada Ilustrasi 1. Contoh alat untuk penimbangan berat bahan (neraca dengan satu piring) dan wadah untuk penimbangan bahan dapat dilihat pada Ilustrasi 2.

Tabel 1. Unit Dasar dari Sistem Internasional (SI)

Kuantitas	Unit	Singkatan
Panjang	Meter	m
Berat	Kilogram	kg
Waktu	Detik	s
Suhu	Kelvin	K
Arus listrik	Ampere	A
Jumlah bahan	Mole	mol
Radioaktivitas	Becquerel	Bq

Sumber: Robyt and White (1990)

Tabel 2. Awalan untuk kelipatan dan sub-kelipatan unit

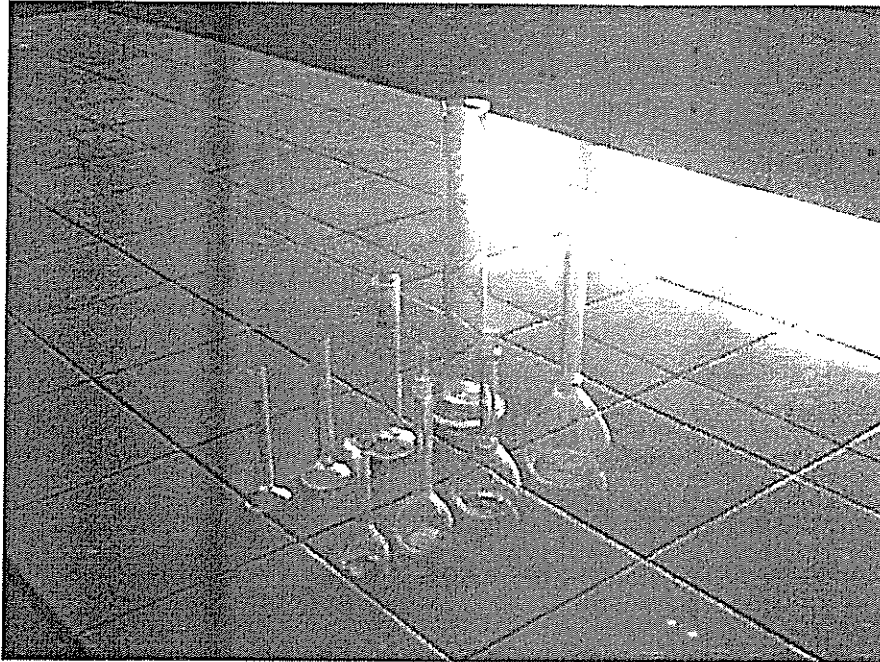
Jumlah	Kelipatan	Singkatan
10^{12}	tera	T
10^9	giga	G
10^6	mega	M
10^3	kilo	K
1	-	-
10^{-1}	deci	D
10^{-2}	centi	C
10^{-3}	milli	M
10^{-6}	micro	μ
10^{-9}	nano	N
10^{-12}	pico	P
10^{-15}	femto	F
10^{-18}	atto	A

Sumber: Robyt and White (1990)

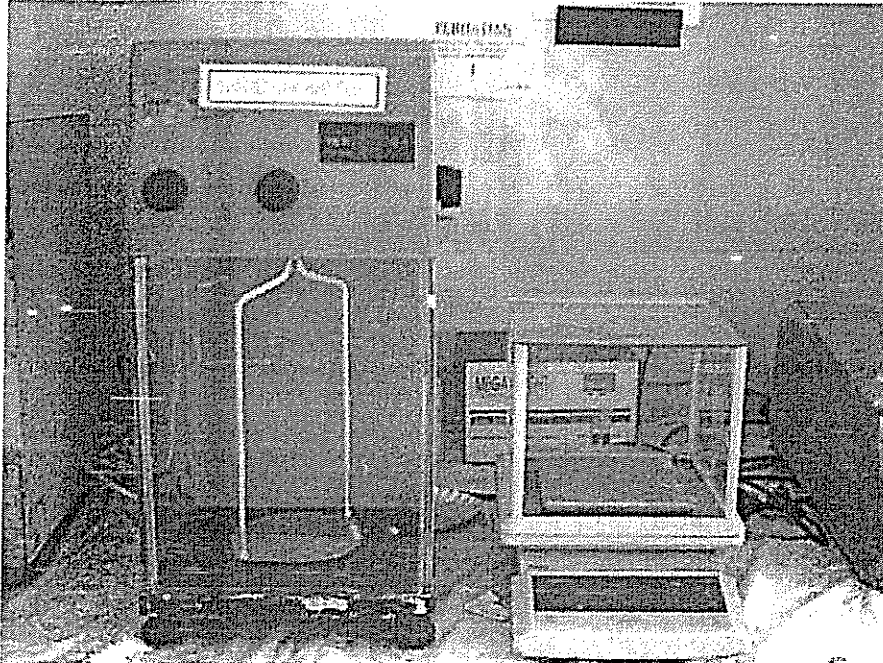
Tabel 3. Unit Dasar Pengukuran untuk Sistem SI

Nama	Simbol	Definisi
<i>Unit Panjang</i>		
Meter	m	Unit Dasar
Kilometer	km	10^3 meters
Centimeter	cm	10^{-2} meter
Milimeter	mm	10^{-3} meter
Micrometer	μm	10^{-6} meter
Nanometer	nm	10^{-9} meter
angstrom	Å	10^{-10} meter
<i>Unit Volume</i>		
Liter	L atau l	Unit Dasar
Deciliter	dL	10^{-1} liter
Mililiter	mL	10^{-3} liter
microliter	μL	10^{-6} liter
<i>Unit Berat</i>		
Kilogram	kg	Unit Dasar
Gram	g	10^{-3} kilogram
Milligram	mg	10^{-6} kilogram
Microgram	μg	10^{-9} kilogram
Nanogram	ng	10^{-12} kilogram
<i>Unit Waktu</i>		
Second	s	Unit Dasar
Millisecond	ms	10^{-3} second
Menit	mn	60 second
Jam	h	60 minutes
Hari	da	24 hours
Bulan	mo	28 –31 days
tahun	yr	12 months
<i>Unit Radioaktivitas</i>		
Becquerel	Bq	1 disintegrasi per detik (dps)
curie	Ci	$3,7 \times 10^{10}$ Bq

Sumber: Robyt and White (1990)



Ilustrasi 1. Alat Ukur Volume Cairan



Ilustrasi 2. Neraca dengan satu piring

BAB III

ANALISIS KADAR AIR

Air merupakan komponen penting dalam bahan pangan, karena air dapat mempengaruhi "acceptability", kenampakan, kesegaran, tekstur, serta cita rasa pangan. Di dalam beberapa bahan pangan, air ada dalam jumlah yang relatif besar, misalnya di dalam beberapa buah-buahan dan sayuran mencapai sekitar 90%, susu segar sekitar 87%, dan daging sapi sekitar 70%. Pada produk pangan yang kering seperti dendeng, kerupuk dan susu bubuk, adanya air perlu mendapat perhatian secara seksama. Kenaikan sedikit kandungan air pada bahan kering tersebut dapat mengakibatkan kerusakan, baik akibat reaksi kimiawi maupun pertumbuhan mikroba pembusuk.

3.1. Air Dalam Bahan Pangan

Air di dalam bahan pangan ada dalam tiga bentuk, yaitu: (1) air bebas, (2) air terikat lemah atau air teradsorpsi, dan (3) air terikat kuat. Pada umumnya air bentuk pertama dan kedua yang dominan, sedangkan air terikat jumlahnya sangat kecil.

1). Air Bebas.

Air bebas ada di dalam ruang antar sel, intergranular, pori-pori bahan, atau bahkan pada permukaan bahan. Air bebas sering disebut juga sebagai aktivitas air atau "water activity" yang diberi notasi A_w . Disebut aktivitas air, karena air bebas mampu membantu aktivitas pertumbuhan mikroba dan aktivitas reaksi-reaksi kimiawi pada bahan pangan. Di dalam air bebas terlarut beberapa nutrien yang dapat dimanfaatkan oleh mikroba

untuk tumbuh dan berkembang. Adanya nutrisi terlarut tersebut juga memungkinkan beberapa reaksi kimia dapat berlangsung. Oleh sebab itu, bahan yang mempunyai kandungan atau nilai A_w tinggi pada umumnya cepat mengalami kerusakan, baik akibat pertumbuhan mikroba pembusuk maupun akibat terjadinya reaksi kimia tertentu, seperti oksidasi dan reaksi enzimatik. Air bebas sangat mudah untuk dibekukan maupun diuapkan.

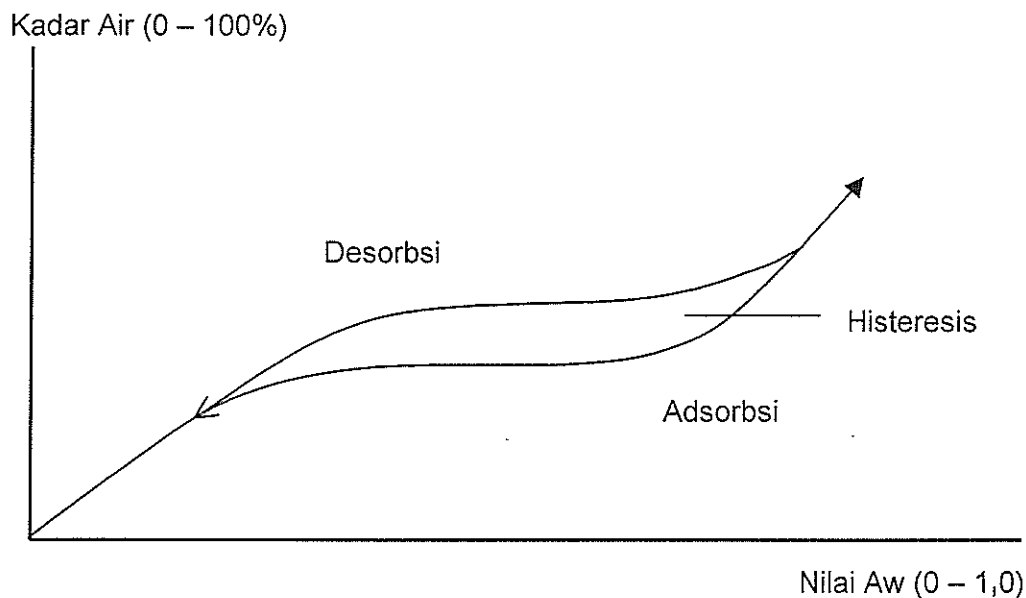
2). Air Teradsorpsi.

Air yang terikat lemah atau air teradsorpsi terserap pada permukaan koloid makromolekul (protein, pati, dll) bahan. Air teradsorpsi juga terdispersi diantara koloid tersebut dan merupakan pelarut zat-zat yang ada dalam sel. Ikatan antara air dengan koloid merupakan ikatan hidrogen. Air teradsorpsi relatif bebas bergerak dan relatif mudah dibekukan ataupun diuapkan.

3). Air Terikat Kuat.

Air terikat kuat sering juga disebut air hidrat, karena air tersebut membentuk hidrat dengan beberapa molekul lain dengan ikatan bersifat ionik. Air terikat kuat jumlahnya sangat kecil dan sangat sulit diuapkan dan dibekukan.

Pada pengukuran kadar air bahan pangan, air yang terukur adalah air bebas dan air teradsorpsi. Jadi kadar air suatu bahan pangan merupakan gabungan dari air bebas dan air teradsorpsi didalam bahan tersebut. Hubungan kadar air dan air bebas atau aktivitas air (A_w) ditunjukkan dengan kecenderungan bahwa makin tinggi kadar air makin tinggi pula nilai A_w . Akan tetapi, hubungan tersebut tidak linier melainkan berbentuk kurva sigmoid. Kadar air dinyatakan dalam persen (%) dalam skala 0-100, sedangkan nilai A_w dinyatakan dalam angka desimal pada kisaran skala 0 – 1,0. Kurva hubungan antara kadar air dan A_w bahan disebut juga sebagai kurva Isoterm Sorpsi Lembab (ISL). Kurva ISL dapat dilihat pada Ilustrasi 3.



Ilustrasi 3. Kurva ISL Bahan Pangan.

1.2. Metode Analisis Kadar Air

Ada beberapa metode untuk analisis kadar air, antara lain yaitu: metode pengeringan, metode destilasi, dan metode kimiawi. Metode pengeringan menggunakan prinsip “thermogravimetri” dengan alat pengering berupa oven. Secara ringkas prinsip beberapa metode analisis kadar air dijelaskan di bawah ini.

1) Metode Pengeringan/Oven (Thermogravimetri)

Metode pengeringan dengan oven didasarkan atas prinsip penghitungan selisih bobot bahan (sampel) sebelum dan sesudah pengeringan. Selisih bobot tersebut merupakan air yang teruapkan dan dihitung sebagai kadar air bahan.

a. Metode Oven

Metode ini dapat digunakan untuk semua produk pangan, kecuali produk yang mengandung komponen senyawa “volatil” (mudah menguap) atau produk yang terdekomposisi/rusak pada pemanasan 100°C.

Prinsip metode ini adalah mengeringkan sampel dalam oven 100 – 105°C sampai bobot konstan dan selisih bobot awal dengan bobot akhir dihitung sebagai kadar air.

Prosedur dan perhitungan kadar air metode pengeringan oven adalah sebagai berikut :

1. Siapkan cawan porselin yang telah diberi kode sesuai kode sampel, panaskan dalam oven dengan suhu 100 – 105°C selama ± 1 jam.
2. Ambil cawan porselin, masukkan dalam desikator ± 15 menit, kemudian cawan ditimbang.
3. Timbang sampel sebanyak 1 – 2 gram (W₁) dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya.
4. Keringkan dalam oven pada suhu 100 – 105°C selama 4 – 6 jam. ditimbang, dioven kembali, dan ditimbang hingga konstan (W₂). Bobot dianggap konstan apabila selisih penimbangan tidak melebihi 0,2 mg.
5. Masukkan dalam desikator ± 15 menit, dilanjutkan dengan penimbangan.
6. Kadar air dapat dihitung, baik berdasarkan bobot kering atau “dry basis” (DB) ataupun berdasarkan bobot basah atau “wet basis” (WB).

$$\text{Kadar air (\% DB)} = \frac{W_3}{W_2} \times 100$$

$$\text{Kadar air (\% WB)} = \frac{W_3}{W_1} \times 100$$

$$\text{Total Bahan Padat (\%)} = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

W_1 = Bobot sampel awal (g)

W_2 = Bobot sampel kering (g)

W_3 = Kehilangan Berat/ Selisih bobot (g)

b. Metode Oven-Vakum

Metode ini digunakan untuk produk yang mengandung komponen yang dapat terdekomposisi pada 100°C , atau relatif banyak mengandung senyawa "volatil".

Prinsip metode oven-vakum adalah mengeringkan produk yang mudah terdekomposisi pada 100°C didalam suatu tempat yang dapat dikurangi tekanan udaranya atau di "vakum" kan. Dengan demikian proses pengeringan dapat berlangsung pada suhu dan tekanan rendah.

Prosedur dan perhitungan kadar air metode oven-vakum adalah sama dengan metode oven seperti tersebut di atas. Namun demikian penggunaan oven-vakum relatif sedikit dibandingkan dengan oven biasa, karena harganya relatif mahal.

2) Metode Destilasi (Thermovolumetri)

Metode destilasi digunakan untuk bahan yang banyak mengandung lemak dan kompcnen mudah menguap disamping air. Jadi metode ini menggunakan sampel dengan sifat yang sama dengan sampel yang digunakan pada metode oven-vakum.

Prinsip pengukuran kadar air dengan metode destilasi adalah menguapkan air bahan dengan cara destilasi menggunakan pelarut "immicible", kemudian air ditampung dalam tabung yang diketahui volumenya. Pelarut yang digunakan mempunyai titik didih lebih besar dari air, tetapi mempunyai berat jenis (BJ) lebih kecil dari air. Dengan demikian air dan pelarut akan terpisah, air ada dibagian bawah. Contoh senyawa yang dapat dijadikan pelarut yaitu: toluen, xylen, dan benzen.

Prosedur penentuan kadar air dengan metode destilasi adalah sebagai berikut (Apriyantono, *et al.*, 1989):

1. Persiapkan alat distilasi dan pereaksi.
2. Persiapkan labu didih atau erlenmeyer yang sudah dikeringkan lebih dulu dalam oven dengan suhu $105^{\circ}\text{C} \pm 1$ jam.
3. Timbang sampel secukupnya sedemikian rupa, sehingga air yang terkandung di dalamnya sekitar 3 – 4 ml air.
4. Masukkan sampel ke dalam labu didih/erlenmeyer yang telah dikeringkan dan tambahkan 75 – 100 ml pelarut sampel.
5. Panaskan campuran tersebut dengan pemanas listrik (jangan menggunakan api) dan refluks perlahan-lahan dengan suhu rendah, selama 45 menit, dan teruskan dalam keadaan panas yang tinggi selama 1 - 1 $\frac{1}{2}$ jam.
6. Baca volume air yang terdistilasi.
7. Pereaksi dapat digunakan lagi setelah didestilasi.

PERHITUNGAN

Jumlah sampel yang diambil (gram) = W

Volume air yang terdistilasi (ml) = V

Persen kadar air = $V/W \times 100$

CATATAN

1. Peralatan harus benar-benar bersih dan bebas dari lemak.
2. Labu didih harus dalam keadaan kering.
3. Jumlah air yang terkandung dalam sampel harus dibawah 10 ml.
4. Uap air yang ada pada bagian bawah kondensor dikumpulkan dengan menggunakan kawat atau "thin glass rod" sebelum dilakukan pembacaan jumlah air yang terkumpul.
5. Agar penetapan air dengan metode ini lebih teliti, maka perlu ditetapkan faktor distilasi dengan cara berikut :
 - keringkan labu didih dan tabung Bidwell-Sterling dalam oven, setelah kering dinginkan

- masukkan 3 – 4 gram akuades ke dalam labu, tambahkan 60 – 100 ml toluena
- lakukan refluks sampai seluruh air terdistilasi
- baca volume air yang terdistilasi (V_a)
- faktor distilasi = $\frac{\text{berat air yang didistilasi}}{V_a}$

V_a

Kadar air = $V/W \times \text{faktor distilasi} \times 100 \%$

Metode destilasi mempunyai keuntungan, antara lain:

- (1) Dapat untuk menentukan kadar air bahan yang memiliki kandungan air relatif kecil.
- (2) Penentuan kadar air memerlukan waktu yang relatif singkat, yaitu sekitar 1 jam.
- (3) Terjadinya oksidasi senyawa lipida dan dekomposisi senyawa gula dapat dihindari, sehingga penentuan kadar air cukup akurat.

3) Metode Kimiawi

Ada beberapa cara penentuan kadar air dengan metode kimiawi, yaitu: metode titrasi Karl Fischer, metode kalsium karbida, metode asetil klorida.

a. Metode Titrasi Karl Fischer

Metode ini dapat diterapkan untuk pengukuran kadar air pada bahan berupa cairan, tepung, madu, dan beberapa produk kering. Sesuai dengan namanya, metode ini menggunakan reagensia Karl Fischer yang terdiri dari SO_2 , piridin, dan iodin. Prinsip metode ini adalah melakukan titrasi sampel dengan larutan iodin dalam metanol dan piridin. Jika masih ada air di dalam bahan maka iodin akan bereaksi, tetapi bila air habis maka iodin akan bebas. Perhitungan kadar air dengan menggunakan rumus di bawah ini:

$$\text{Kadar Air} = \frac{0,4 (V_1 - V_2)}{W_1}$$

- W₁ = Berat sampel (g)
- V₁ = Volume pereaksi Karl Fischer untuk titrasi sampel (ml)
- V₂ = Volume pereaksi untuk titrasi blangko
- F = Faktor standarisasi pereaksi
- 0,4 = Ekuivalen air pereaksi

b. Metode Kalsium Karbida

Metode ini didasarkan atas reaksi antara kalsium karbida dengan air menghasilkan gas asetilin. Cara ini cukup cepat dan tidak memerlukan alat yang rumit. Jumlah asetilin yang terbentuk dapat diukur dengan beberapa cara, antara lain :

- 1) Selisih bobot campuran bahan sebelum dan sesudah reaksi.
- 2) Menampung dan mengukur volume gas asetilin dalam tabung tertutup.
- 3) Mengukur tekanan gas asetilin jika reaksi dilakukan pada ruang tertutup.

c. Metode Asetil Klorida

Metode ini didasarkan atas reaksi antara asetil klorida dengan air akan menghasilkan asam yang dapat dititrasi dengan basa. Cara ini dapat digunakan untuk menentukan kadar air bahan berupa minyak, mentega, margarin, rempah-rempah dan beberapa bahan berkadar air rendah.

4) Metode Fisis

Penentuan kadar air dengan metode fisis didasarkan atas beberapa cara, yaitu :

- (1) Berdasar tetapan dielektrik.
- (2) Berdasarkan daya hantar dan resistensi listrik.
- (3) Berdasarkan resonansi nuklir magnetik ("nuclear magnetic resonance"/NMR).

3.3 Pengukuran Nilai Aw Bahan

Pengukuran nilai Aw bahan pangan dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu : berdasarkan keseimbangan air bahan dengan kelembaban relatif udara, berdasarkan hukum Raoult dan berdasarkan pengukuran secara tidak langsung.

1) Keseimbangan air

Berdasarkan keseimbangan kadar air bahan dengan kelembaban relatif udara disekitarnya.

$$Aw = \frac{ERH}{100}$$

ERH = Equilibrium Relative Humidity (Keseimbangan relatif seimbang)

2) Dengan Hukum Raoult :

$$Aw = \frac{Mw}{Mw + Ms}$$

Mw = Jumlah mol air

Ms = Jumlah mol zat terlarut

3) Cara Tidak Langsung

Berdasarkan air yang terserap dalam kertas saring kering dalam suatu wadah atau ruang yang berisi bahan yang diukur Aw -nya

3.4. Analisis Kadar Total Padatan Terlarut

Apabila suatu bahan dihilangkan kandungannya maka yang tersisa adalah padatan yang terdiri dari berbagai komponen bahan tersebut. Didalam suatu bahan, sebagian padatan ada dalam bentuk terlarut dan sebagian yang lain tidak terlarut.

Kadar total padatan terlarut dapat diukur dengan menggunakan metode yang dilakukan oleh Pomeranz dan Meloan (1980). Alat yang digunakan adalah refraktometer Abbe.

Prosedur penentuan total padatan terlarut adalah sebagai berikut :

- (1) Sebanyak 10 g contoh yang telah dihomogenkan ditambah 75 ml air, diaduk dengan pengaduk magnetik selama 3 menit.
- (2) Kemudian disaring dengan kertas saring, filtratnya ditampung dalam labu ukur 100 ml, dan sisa padatan pada kertas saring dicuci dengan air sampai volume filtrat mencapai 100 ml.
- (3) Contoh dipipet dan diletakkan pada permukaan prisma refraktometer, kemudian permukaan prisma refraktometer ditutup dan kadar total padatan terlarut dapat dibaca pada skala. Hasil perkalian yang terbaca pada skala dengan faktor pengencerannya merupakan kadar total padatan terlarut dalam contoh.

BAB IV

ANALISIS PROTEIN

Protein adalah zat makanan yang penting bagi tubuh, karena mempunyai fungsi antara lain sebagai zat pembangun dan zat pengatur, serta sebagai sumber tenaga. Protein merupakan makromolekul yang tersusun oleh asam-asam amino yang mengandung unsur-unsur utama C, O, H dan N. Molekul protein juga mengandung belerang, posfor, besi dan tembaga. Molekul protein mempunyai sifat atau ciri yang spesifik yang berguna dalam kegiatan analisis. Sifat atau ciri khas molekul protein tersebut antara lain yaitu:

- (1) Mempunyai ukuran berat molekul (BM) besar, sehingga mudah mengalami perubahan bentuk fisik dan aktivitas biologi. Hal ini dapat bermanfaat untuk mengenali dan memisahkan dari komponen bahan pangan yang lain.
- (2) Struktur molekul protein mengandung unsur nitrogen (N) relatif banyak, sehingga keberadaan protein di dalam bahan dapat ditentukan berdasarkan kandungan unsur N. Jumlah unsur N dan unsur lain dalam molekul protein dapat dilihat pada Tabel 5.
- (3) Protein merupakan polimer yang tersusun oleh banyak monomer asam-asam amino (lebih dari 20 jenis), sehingga protein di dalam bahan pangan juga banyak jenisnya.

Pada garis besarnya, tujuan analisis protein mencakup beberapa hal berikut ini:

- (1) Mengetahui jumlah atau kandungan protein dalam bahan pangan.
- (2) Menentukan tingkat kualitas protein dari sudut gizi.
- (3) Menelaah protein sebagai suatu bahan kimia, misalnya secara biokimiawi, fisiologis, reologis dan lain sebagainya.

Tabel 4. Jumlah Unsur di dalam Molekul Protein

No	Jenis Unsur	Jumlah (%)
1	Karbon (C)	50-55
2	Oksigen (O)	20-25
3	Nitrogen (N)	15-18
4	Hidrogen (H)	5-7%
5	Belerang (S)	0,4-2,5
6	Posfor (P)	sedikit
7	Besi (Fe)	sedikit
8	Tembaga (Cu)	sedikit

Sumber: Sudarmadji *et al.* (1996)

Pengukuran kadar protein yang paling banyak dilakukan adalah penetapan protein kasar. Penetapan protein kasar bertujuan untuk menera jumlah protein total di dalam bahan pangan. Metode pengukuran jumlah protein tersebut ada beberapa cara, antara lain yaitu: metode Kjeldhal, metode Biuret, metode Lowry, dan metode pengikatan zat warna. Disamping itu, ada beberapa metoda lain untuk analisis asam amino dan komponen protein lainnya.

4.1. Metoda Kjeldahl.

Prinsip metode Kjeldhal yaitu peneraan jumlah protein secara empiris berdasarkan jumlah N di dalam bahan. Setelah bahan dioksidasi, amonia (hasil konversi senyawa N) bereaksi dengan asam menjadi amonium sulfat. Dalam kondisi basa, amonia diuapkan dan kemudian ditangkap dengan larutan asam. Jumlah N ditentukan dengan titrasi HCl atau NaOH.

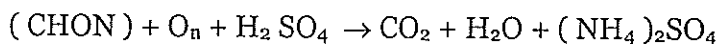
Berdasarkan prinsip tersebut di atas, prosedur analisis dengan metode Kjeldhal dapat dibagi dalam 3 (tiga) tahap, yaitu destruksi, destilasi, dan titrasi.

a. Tahap Destruksi

Sampel dipanaskan dalam asam sulfat pekat sehingga bahan terdestruksi menjadi unsur-unsurnya. Hasil akhir pada tahap destruksi ini adalah terbentuknya amonium sulfat. Untuk mempercepat destruksi perlu ditambah katalisator :

- Campuran $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ & HgO (20 : 1)
- $\text{K}_2 \text{SO}_4$
- Cu SO_4
- Selain campuran di atas bisa juga digunakan katalisator siap pakai, misalnya : 'selenium reagent mixture' produksi Merck.

Reaksi pada saat destruksi adalah sebagai berikut :



b. Tahap Destilasi

Amonium Sulfat hasil destruksi dipecah menjadi amonia (NH_3) dengan cara penambahan NaOH dan pemanasan. Selanjutnya NH_3 ditangkap dengan larutan asam standar, sampai destilat tidak bereaksi basis. Larutan asam standar yang dapat digunakan yaitu: HCl , atau asam borat 4%.

c. Tahap Titrasi

Apabila digunakan HCl (sebagai penampung destilat), maka sisa HCl yang tidak bereaksi dengan NH_3 dititrasi dengan NaOH (0,1 N).

Persentase N dapat dihitung dengan rumus di bawah ini.

$$\% \text{ N} = \frac{\text{ml NaOH (blangko - sampel)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000}$$

$$\text{dimana A} = \text{Normalitas Na OH} \times 14.008 \times 100\%$$

Apabila digunakan asam borat sebagai penampung destilat, maka jumlah asam borat yang bereaksi dengan NH_3 dititrasi dengan HCl (0,02 - 0,1 N). Persentase N dapat dihitung dengan rumus di bawah ini.

$$\% N = \frac{\text{HCl (sampel - blangko)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000} \times B$$

dimana B = Normalitas HCl x 14.008 x 100 %

Setelah diperoleh persentase N maka kadar protein sampel dapat dihitung dengan cara mengalikannya dengan faktor konversi N.

Faktor konversi (perkalian) N tergantung pada persentase/ jumlah unsur N yang menyusun molekul protein dalam suatu bahan. Beberapa bahan telah ditetapkan besarnya faktor konversi N (lihat Tabel 5). Sedangkan untuk bahan-bahan yang belum ditetapkan, besarnya faktor konversi N ditentukan melalui pendekatan empiris jenis bahannya, atau dihitung berdasarkan kadar N sebesar 16% sehingga faktor konversi N = 6,25.

Tabel 5. Faktor Konversi N Beberapa Jenis bahan Pangan

No	Jenis Bahan	Faktor Konversi N
1	Biji-bijian, bir, ragi	6,25
2	Buah-buahan, teh, anggur	6,25
3	Makanan pada umumnya	6,25
4	Makanan ternak	6,25
5	Beras	5,95
6	Roti, makaroni, mie	5,70
7	Kedele	5,75
8	Susu	6,38
9	Kacang tanah	5,46
10	Gelatin	5,55

Sumber: Winarno (1986); Sudarmadji *et al.* (1996)

Penentuan Kadar Protein dengan Metode Mikro-Kjeldahl

1. Siapkan label sesuai kode sampel. Tempelkan pada dinding labu destruksi, untuk lebih amannya tulis sekali lagi kode sampel pada

dinding labu destruksi dengan spidol permanen pada bagian tengah labu destruksi.

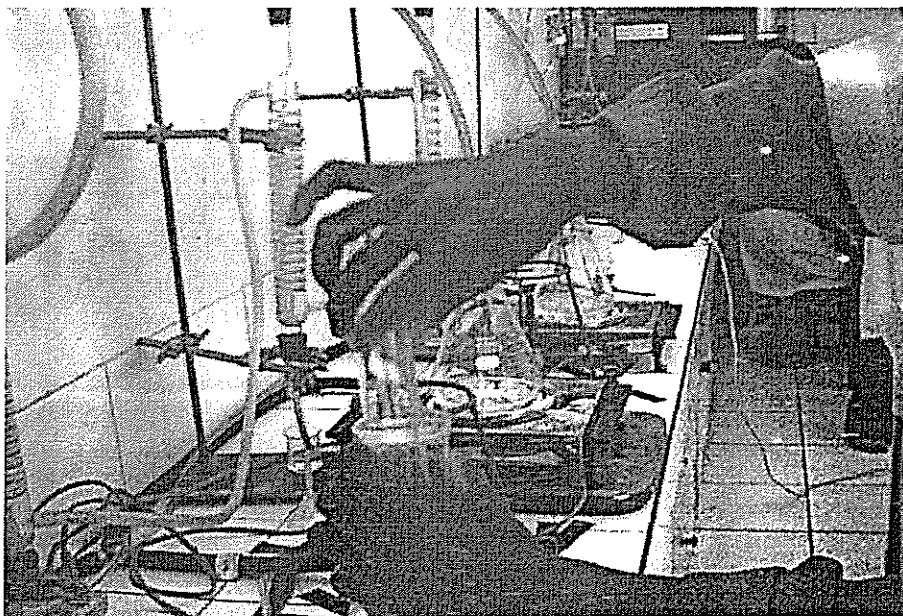
2. Timbang 0,3 g sampel kering atau 0,5 g sampel basah, masukkan ke dalam labu destruksi.
3. Tambahkan 0,3 g katalisator (selenium reagent mixture) untuk sampel kering dan 0,5 gr katalisator untuk sampel basah.
4. Masukkan 10 ml H_2SO_4 pekat bebas N, berat jenis 1,84 ke dalam labu destruksi.
5. Destruksi sampel dalam ruang asam selama 1 sampai 1,5 jam (sampai warna cairan menjadi jernih). Gunakan api kecil. Sebelum menyalakan pemanas (kompor gas), ex-haust fan harus sudah dinyalakan terlebih dahulu.
6. Matikan pemanas (kompor gas) tunggu \pm 15 menit sampai labu dingin.
7. Pindahkan isi labu destruksi ke dalam labu destilasi (erlenmeyer volume 1 Lt). Tutup erlenmeyer dengan penyumbat karet.
8. Bilas labu destruksi dengan aquades. Pembilasan dilakukan 3 kali, masukkan aquades bilasan dengan bantuan corong ke dalam labu destilasi lewat saluran (tabung reaksi bertutup yang telah dimodifikasi) pada penyumbat labu destilasi. Total aquades yang digunakan untuk membilas 100 ml.
9. Masukkan 40 ml NaOH 45 % ke dalam labu destilasi. Tutup saluran kaca, kencangkan penutupnya dengan baik.
10. Siapkan erlenmeyer 100 ml yang berisi 5 ml asam borat 4% (jenuh) yang telah ditetesi 2 tetes indikator MR-MB (campuran 2 bagian metil merah 0,2% dalam alkohol dan 1 bagian metilen blue 0,2% dalam alkohol) sebagai penangkap. Celupkan ujung kondensor ke dalam asam borat.
11. Setelah kondensor siap, buka kran air pendingin.
12. Nyalakan sumber pemanas pada alat destilasi (kompor listrik pada posisi 300 watt).

13. Destilasi dilakukan sampai volume destilat pada erlenmeyer mencapai 40 ml. Pada saat volume destilat mencapai \pm 35 ml angkat kondensor sehingga ujung kondensor tidak lagi menyentuh cairan penangkap.
14. Cairan hasil proses destilasi dititrasi dengan HCl 0,1 N, sampai terjadi perubahan warna cairan.
15. Buat blangko dengan jalan destilasi 100 ml aquades yang telah ditambah 40 ml NaOH 45 %. Tangkap hasil destilasi dengan 5 ml asam borat selanjutnya proses sama dengan langkah no. 12 dan seterusnya.

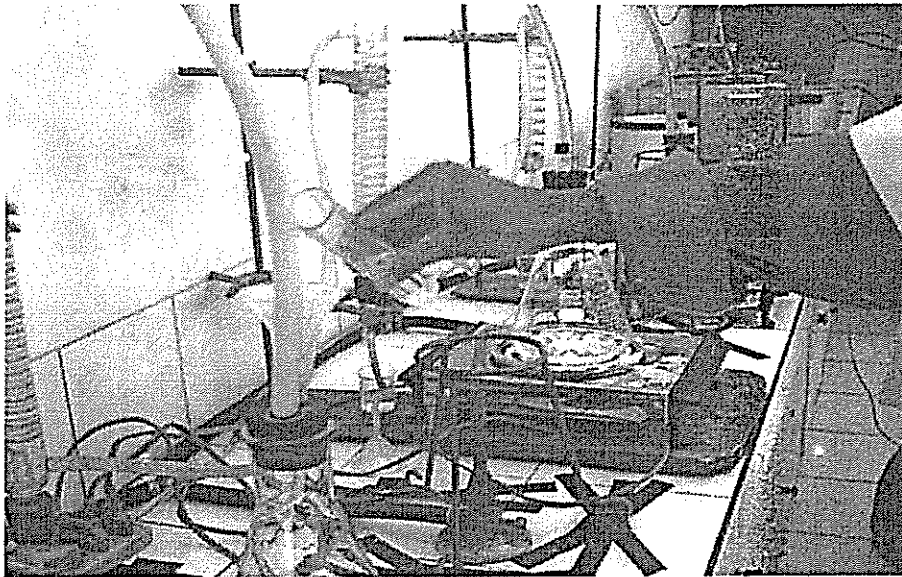
PERHITUNGAN KADAR PROTEIN KASAR :

$$\% N = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml Blangko}) \times \text{Normalitas HCl} \times 14,008 \times 100}{\text{mg sampel}}$$

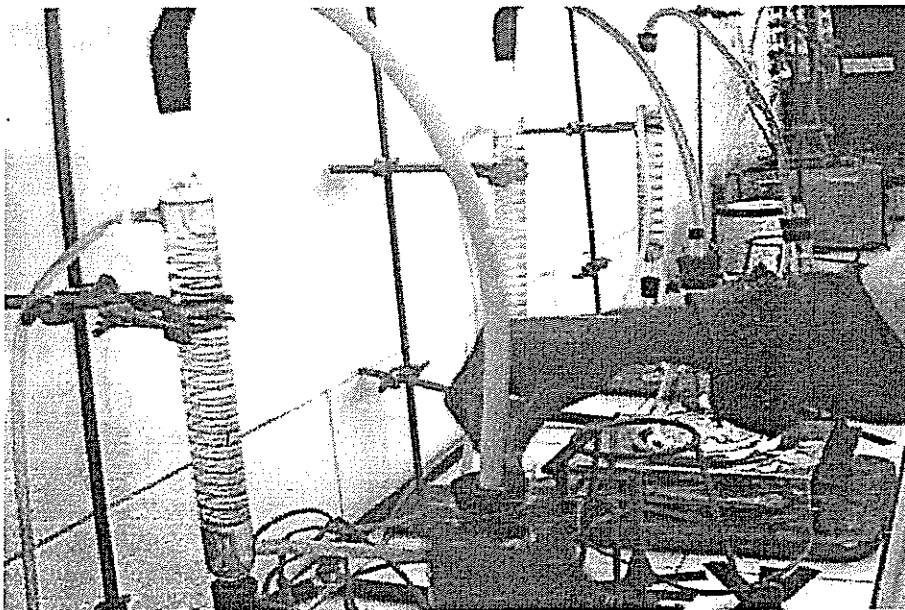
% Protein Total = % N X Faktor konversi (Tabel 5)



Ilustrasi 4. Cara memindahkan cairan hasil destruksi. Pindahkan cairan ke dalam labu destilasi setelah dan selesai tutup labu destilasi dengan penyumbat karet.



Ilustrasi 5. Pembilasan labu destruksi. Bilas labu destruksi dengan aquades, masukkan aquades bilasan lewat tabung reaksi bertutup yang telah dimodifikasi ujungnya, sehingga aquades bilasan tetap lewat dinding erlenmeyer.



Ilustrasi 6. Proses Penutupan Tabung Reaksi. Tutup rapat tabung reaksi, proses destilasi siap dilaksanakan

4.2. Metode Biuret

Prinsip metode Biuret adalah dalam larutan basa, Cu^{2+} membentuk kompleks dengan ikatan peptida ($-\text{CO}-\text{NH}-$) dari suatu protein yang membentuk warna ungu dengan absorbansi 540 nm. Besarnya absorbansi tersebut berbanding langsung dengan konsentrasi protein dan tidak tergantung pada jenis protein, karena semua protein pada dasarnya mempunyai jumlah ikatan peptida yang sama per satuan berat.

Dalam prosedur analisis dengan metode Biuret ada beberapa hal yang patut dicatat, antara lain yaitu :

- (1) Jumlah sampel harus mengandung protein sekitar 1 – 10 mg/ ml.
- (2) Ada senyawa pengganggu yang perlu diantisipasi, yaitu:
 - a). Urea, karena mengandung gugus $-\text{CO}-\text{NH}-$.
 - b). Gula pereduksi, yang akan bereaksi dengan ion Cu^{2+}
- (3) Metode Biuret mempunyai ketepatan lebih besar dibanding Kjeldhal.

Garis besar prosedur metode Biuret adalah sebagai berikut:

- (1) Sebanyak 4 ml larutan protein ditambah 6 ml pereaksi (reagen Biuret) ,kemudian didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C , atau didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar (30°C).
- (2) Selanjutnya intensitas warna ungu larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.
- (3) Kurva standar menggunakan larutan protein serum albumin (BSA, bovine serum albumin) secara seri, misalnya dari 0,1-1,0% (lihat Ilustrasi 7).

Kadar protein dihitung berdasarkan persamaan regresi kurva standar :

$$Y = a + bX$$

Y = nilai absorbansi

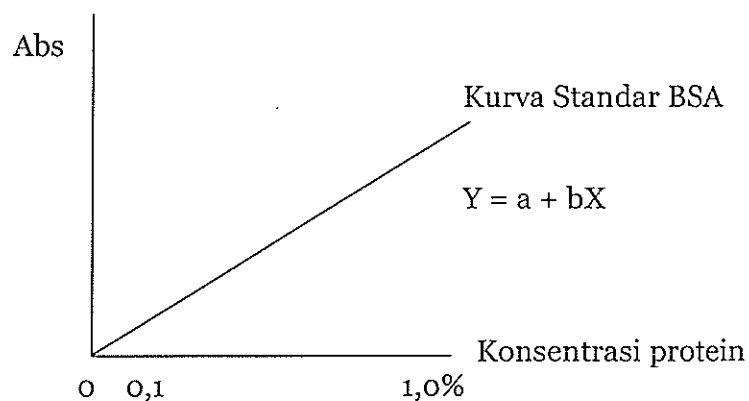
X = konsentrasi protein

4.3. Metode Lowry

Prinsip metode Lowry adalah protein dengan asam posfatungstat & posfomolibdat pada suasana alkalis dapat membentuk warna biru yang intensitasnya tergantung pada konsentrasi protein. Asam amino yang bereaksi dengan reagen Lowry adalah tirosin dan triptofan.

Prosedur analisis dengan metode Lowry hampir sama dengan prosedur dari metode Biuret. Perbedaannya adalah pada reagen yang digunakan. Dalam analisis ini digunakan reagen Lowry dan perlu disiapkan larutan protein BSA untuk pembuatan kurva standar (lihat Ilustrasi 7).

Sensitifitas analisis dengan metode Lowry jauh lebih tinggi (10 – 20 kali) dibanding metode Biuret. Namun perlu diperhatikan pula bahwa ada senyawa pengganggu dalam analisis dengan metode Lowry, yaitu: senyawa phenol, karena dapat membentuk warna biru. Akan tetapi dapat dihilangkan dengan cara pengendapan menggunakan TCA (Tri Chloro Acetic-acid).



BSA = Bovine Serum Albumin (protein serum albumin)

Ilustrasi 7. Kurva Standar untuk Analisis Kadar Protein

4.4. Metode Pengikatan Zat Warna/ Pengecatan (" Dye Binding ")

Prinsip analisis protein dengan pengikatan zat warna, yaitu: zat warna dapat bereaksi dengan gugus polar protein membentuk kompleks tak larut. Kompleks dipisahkan (dengan sentrifus dan penyaringan) dan diukur densitas optiknya.

Bahan pewarna yang digunakan adalah : orange G, orange 12, Amido Black. Sisa bahan pewarna yang tidak bereaksi diukur dengan kolorimeter. Dalam analisis ini diperlukan kurva standar hubungan antara densitas optik dengan kadar protein.

4.5. Penetapan Alfa-Amino Nitrogen

Pada prinsipnya gugus alfa-amino dari suatu protein dapat direaksikan dengan Trinitrobenzen sulfonat pada pH & membentuk senyawa berwarna yang dapat diukur absorban- nya (pada 340 nm).

Metode ini banyak diterapkan untuk bahan hewani, atau bahan nabati yang sedikit karbohidrat. Metode ini dapat juga diterapkan untuk bahan ekstrak lipid.

4.6. Penentuan Asam Amino dengan HPLC

Protein dapat dihidrolisis dengan Asam Kuat (HCl 6N) sehingga asam-asam amino penyusun-nya dapat saling terpisah. Melalui kolom penukar kation dari alat HPLC (High Performance Liquid Chromatography), asam-asam amino tersebut dapat ditentukan jenis dan jumlahnya. Hasil kromatografi ini adalah berupa pola elusi atau kromatogram.

Pola (kurva) elusi kromatografi dibandingkan dengan pola elusi asam-asam amino standar. Untuk mengetahui jenis asam amino dapat dengan membandingkan waktu retensinya dengan standar. Untuk

mengetahui jumlah asam amino dapat membandingkan luasan kurva sampel dengan standar.

4.7. Penentuan N-non protein

Metode ini dapat diterapkan pada semua jenis bahan pangan. Protein sampel diekstrak dengan air dan diendapkan dengan tembaga asetat. Komponen nitrogen (N)-non protein tinggal dalam larutan. Setelah penyaringan, N dalam filtrat ditetapkan dengan metode Kjeldhal.

4.8. Penentuan TVBN dan TMA

Senyawa TVBN (Total Volatile Base Nitrogen) dan TMA (Tri Methyl Amine) merupakan senyawa nitrogen volatil yang dihasilkan dari dekomposisi bahan yang kaya protein oleh mikroba.

Pada prinsipnya analisis TVBN dan TMA dilakukan dengan cara ekstraksi sampel dengan Tri Chloro Acetic-acid (TCA) 5% sehingga protein mengendap dan komponen N volatile larut dalam TCA. Ekstrak TCA didistilasi dan komponen N ditangkap HCl. Distilat dititrasi dengan NaOH sehingga TVBN diketahui.

ANALISIS KARBOHIDRAT

Karbohidrat adalah senyawa polihidroksi aldehyd atau polihidroksi keton yang mempunyai rumus empiris $C_nH_{2n}O_n$. Pada umumnya karbohidrat dapat dikelompokkan menjadi monosakarida, oligosakarida, dan polisakarida. Monosakarida merupakan suatu molekul sakarida/ gula yang mempunyai lima atau enam atom C. Oligosakarida terdiri dari 2-10 unit monosakarida. Polisakarida merupakan makromolekul yang tersusun oleh banyak unit monosakarida. Golongan karbohidrat yang banyak dijumpai di alam adalah monosakarida seperti glukosa dan fruktosa, oligosakarida yang terdiri dari 2 unit monosakarida seperti laktosa dan sukrosa, serta polisakarida seperti pati, dekstrin dan berbagai serat pangan.

Dalam analisis kadar karbohidrat seringkali ditujukan untuk menentukan jumlah golongan karbohidrat tertentu, misalnya kadar laktosa, kadar gula pereduksi, kadar dekstrin, dan kadar pati. Kadar karbohidrat suatu bahan pangan sering ditentukan dengan cara menghitung selisih dari angka 100 dengan jumlah komponen bahan yang lain (kadar air, kadar protein, kadar lemak dan kadar abu). Cara penentuan kadar karbohidrat semacam ini disebut sebagai metode "carbohydrate by difference".

5.1. Analisis Kadar Gula Pereduksi dan Total Gula

Kadar gula dianalisis dengan menggunakan metode Lane-Eynon. Penetapan kadar gula pereduksi dengan metode ini didasarkan atas pengukuran volume larutan gula pereduksi standar yang dibutuhkan untuk

mereduksi pereaksi tembaga basa yang diketahui volumenya (Apriyantono *et al.*, 1989).

Persiapan contoh untuk analisis kadar gula adalah sebagai berikut :

- (1) Timbang sebanyak 10 g contoh yang telah dihomogenkan dalam gelas piala 100 ml, ditambah 10 – 20 ml alkohol 80% dan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 3 – 5 menit.
- (3) Campuran ini disaring dengan kapas, dan sisa padatan pada kapas dicuci dengan alkohol 80 %, kemudian pH filtrat diukur. Jika pH-nya asam ditambahkan CaCO_3 sampai cukup basa.
- (4) Campuran ini kemudian dipanaskan di atas penangas air 100°C selama 30 menit, dan disaring dengan kertas saring Whatman nomor 40.
- (5) Kelebihan alkohol dihilangkan dengan memanaskan filtrat di atas penangas air bersuhu $\pm 85^\circ\text{C}$, sambil terus menambahkan air secukupnya jika terlihat akan kering. Jika masih ada endapan, maka penyaringan diulangi lagi.
- (6) Selanjutnya ditambahkan larutan Pb-asetat jenuh netral setetes demi setetes sampai tidak menimbulkan kekeruhan. Kelebihan Pb dihilangkan dengan menambahkan satu gram Na-oksalat anhidrat, dan disaring kembali.
- (7) Volume larutan ditepatkan sampai volume 250 ml dalam labu ukur. Setelah dikocok merata, larutan ini siap dianalisis atau disimpan dalam lemari es yang bersuhu $5 - 10^\circ\text{C}$.

Pereaksi-pereaksi yang digunakan untuk penetapan kadar gula pereduksi dan total gula adalah :

- (a). Larutan tembaga sulfat, dibuat dengan melarutkan sebanyak 34,639 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam air, diencerkan sampai volume 500 ml, dan disaring melalui kertas saring.
- (b). Larutan tartrat basa, dibuat dengan melarutkan 173 g garam Rochele (KNa-tartrat) dan 50 g NaOH dalam air, diencerkan sampai

volume 500 ml, didiamkan selama dua hari, kemudian disaring melalui kertas saring,.

- (c). Larutan Fehling modifikasi Soxhlet, dibuat dengan mencampurkan dalam volume yang sama larutan (a) dan (b) segera sebelum digunakan.
- (d). Larutan glukosa standar, dibuat dengan melarutkan sebanyak 1,5 g asam benzoat dalam 800 ml air mendidih, didinginkan sampai suhunya mencapai 25 – 30 °C, kemudian ditambahkan ke dalamnya 5,000 g (dengan ketelitian 0,1 mg) glukosa dan diencerkan sampai volume 1000 ml, dan (e). larutan biru metilena 0,2% dalam air (larutan dibuat baru).

Sebelum melakukan penetapan gula, terlebih dahulu dilakukan standarisasi larutan Fehling.

- (1) Mula-mula disiapkan larutan Fehling modifikasi Soxhlet dengan cara memindahkan ke dalam labu erlenmeyer 250 ml masing-masing sebanyak 100 ml pereaksi (a) dan (b).
- (2) Kemudian sebanyak 10 ml larutan Fehling dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml dan ditambah dengan 20 ml air.
- (3) Labu erlenmeyer ini diletakkan di atas hot plate dan setelah mendidih dibubuhi 3 – 4 tetes larutan biru metilena 0.2%.
- (4) Selanjutnya larutan ini dititrasi dengan larutan glukosa standar sampai biru metilena berubah warna, dan titik akhir titrasi dicapai apabila telah timbul warna merah bata. Selama berlangsungnya titrasi, larutan dalam labu erlenmeyer terus diaduk dengan pengaduk magnetik, dan kecepatan kerja diatur sedemikian rupa sehingga titrasi dapat diselesaikan dalam waktu kira-kira dua menit. Standarisasi di atas dilakukan triplo.

Penentuan kadar gula pereduksi adalah sebagai berikut :

- (1) Pipet 10 ml filtrat bebas Pb (dari persiapan contoh) dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml, kemudian ditambah 10 ml larutan Fehling.

- (2) Campuran ini selanjutnya dititrasi dengan larutan glukosa standar seperti pada standarisasi larutan Fehling di atas dalam waktu dua menit. Titrasi dilakukan triplo. Kadar gula pereduksi dihitung sebagai glukosa dari titer penetapan larutan standar (blanko) dan contoh, yaitu dengan rumus :

$$\text{Kadar gula pereduksi} = \frac{c (b - a)p}{g} \times 100 \%$$

c = konsentrasi glukosa standar (5 mg/ml).

b = titer penetapan blanko (ml).

a = titer penetapan contoh (ml).

p = faktor pengenceran (250ml/10ml).

g = bobot contoh (mg).

Prosedur penentuan kadar total gula adalah sebagai berikut :

- (1) Mula-mula 50 ml filtrat bebas Pb (dari persiapan contoh) dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml, kemudian ditambah 20 ml air dan 10 ml HCl 36%.
- (2) Labu erlenmeyer tersebut diletakkan di atas penangas air bersuhu 60°C selama 10 menit sambil digoyang-goyang, kemudian segera didinginkan dalam air mengalir.
- (3) Setelah dingin, isi labu erlenmeyer dinetralkan dengan NaOH 45% dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditetapkan volumenya dengan air sampai tanda tera.
- (4) Jika terbentuk endapan, maka disaring dengan kertas saring. Selanjutnya penetapan kadar total gula dalam contoh ini dilakukan seperti penetapan kadar gula pereduksi.

5.2. Analisis Jenis-jenis Gula

Analisis kualitatif dan kuantitatif gula yang terdapat di dalam contoh dilakukan dengan menggunakan alat High Performance Liquid Chromatography (HPLC) merk ICI. Alat ini terdiri dari empat bagian, yaitu : (a) alat pengatur suhu HPLC tipe TC-1900, (b) alat pengatur gradien HPLC merk Kortec tipe K-45, (c) alat penyuntik otomatis tipe AS -2000, dan (d) alat pencatat kurva (chromotopac) merk Shimadzu tipe C-R6A. Kolom yang digunakan jenis ICI Fermentation Colum dengan air bebas ion (high pure) sebagai eluen (fase mobil). Kolom dioperasikan pada suhu 85 – 90°C. Kecepatan aliran alat adalah 0,5 ml/ menit. Detektor yang digunakan adalah Refractive Index Detector (RID) merk Shimadzu.

Persiapan contoh untuk analisis kualitatif dan kuantitatif jenis-jenis gula menggunakan metode yang dilakukan oleh Picha (1985) :

- (1) Sebanyak 10 g contoh yang telah dihomogenkan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml, ditambah 75 ml alkohol 80%, diaduk dengan pengaduk magnetik selama lima menit,
- (2) Kemudian disaring dengan kertas saring Whatman nomor 41, dan filtratnya ditampung dalam labu ukur 100 ml.
- (3) Residu pada kertas saring dan sisa padatan pada labu erlenmeyer dicuci dengan alkohol 80%, dan filtratnya ditampung pada labu ukur yang sama seperti tersebut di atas sampai volume filtrat mencapai 100 ml.
- (4) Diambil sebanyak lima milimeter filtrat untuk disaring dengan saringan millipore dengan diameter pori-pori 0,45 μm , kemudian sebanyak 10 μl disuntikkan ke dalam HPLC.
- (5) Dalam penyiapan gula standar (sukrosa, glukosa, dan fruktosa), masing-masing gula ditimbang sebanyak 1,000 g, dihomogenkan dengan alkohol 80%, disaring dengan kertas saring Whatman nomor 41 dan filtratnya ditampung dalam labu ukur 100 ml.

- (6) Selanjutnya sisa padatan pada kertas saring dicuci dengan alkohol 80% sampai volume filtrat mencapai 100 ml. Diambil sebanyak lima milimeter filtrat untuk disring dengan saringan millipore dengan diameter 0.45 μm , kemudian disuntikkan ke dalam HPLC sebanyak 10 μl .

Kadar masing-masing jenis gula dalam contoh diperoleh dengan mengalikan masing-masing jenis gula yang terbaca pada detektor dengan faktor pengencerannya, atau menggunakan rumus :

$$\text{Kadar gula (Misal Glukosa)} = \frac{a}{b} \times c \times p$$

- a = luas area glukosa pada contoh
b = luas area glukosa standar
c = konsentrasi glukosa standar (0,1 %)
p = faktor pengenceran (100ml/10ml)

5.3. Analisis Kadar Pati

Kadar pati pada contoh dianalisis dengan metode hidrolisis asam. Prinsip analisis ini adalah pati dalam contoh dihidrolisis dengan asam sehingga menghasilkan gula-gula (glukosa), kemudian glukosa yang terbentuk ditetapkan kadarnya. Dengan demikian kadar pati dapat ditentukan (Apriyantono *et al.*, 1989) :

- (1) Sebanyak lima gram contoh yang telah dihomogenkan dimasukkan ke dalam gelas piala 250 ml, ditambah 50 ml air, dan diaduk dengan pengaduk magnetik selama satu jam.
- (2) Suspensi disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan air sampai volume filtrat mencapai 250 ml. Filtrat ini mengandung karbohidrat terlarut selanjutnya dibuang.
- (3) Residu dipindahkan secara kuantitatif dari kertas saring ke dalam gelas piala 500 ml disertai pencucian dengan 200 ml air, dan

ditambah 20 ml HCl \pm 25 %, ditutup dengan pendingin balik, dan dipanaskan selama 2,5 jam.

- (4) Setelah dingin, larutan dinetralkan dengan NaOH 45 %, dan diencerkan dengan air hingga mencapai mencapai volume 500 ml.
- (5) Campuran tersebut disaring lagi dengan kertas saring. Kadar gula dalam filtrat ditentukan sebagai glukosa. Penentuan glukosa dilakukan seperti penetapan/penentuan kadar gula pereduksi. Hasil perkalian bobot dengan faktor 0.9 merupakan bobot pati.

5.4. Analisis Kadar Dekstrin

Kadar dekstrin dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer Shimadzu UV 160. Analisis ini didasarkan pada kenyataan bahwa dekstrin dapat larut dalam air dingin, dan antara dekstrin yang larut tersebut dengan larutan iod dapat terbentuk ikatan dekstrin – iod yang berwarna merah atau coklat – ungu. Absorbsinya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 555 nm (Armelia, 1990) :

- (1) Kurva standar dekstrin dibuat dengan cara menimbang sebanyak 0,1 g dekstrin murni dan diencerkan dengan air sampai volume 100 ml seraya diaduk dengan pengaduk magnetik selama 15 menit.
- (2) Larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit.
- (3) Larutan yang jernih dipipet ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 0,1,2,3,4,5 dan 6 ml, selanjutnya masing-masing diencerkan dengan air hingga volumenya mencapai 10 ml.
- (4) Masing-masing tabung dibubuhi larutan iod 0,2% (0,2 g I₂ + 2,0 g KI + 100 ml air) sebanyak 0,2 ml, kemudian dicari absorbansi maksimumnya dengan spektrofotometer UV vis.
- (5) Pada percobaan ini diperoleh absorbansi maksimum pada panjang gelombang 550 nm. Selanjutnya dibuat kurva standar yang

menyatakan hubungan antara konsentrasi dekstrin standar (absisa) terhadap absorbansi (ordinat).

Prosedur penentuan kadar dekstrin adalah sebagai berikut :

- (1) Timbang tiga gram contoh yang telah dihomogenkan. Contoh tersebut dimasukkan ke dalam gelas piala 100 ml, ditambah 75 ml air, diaduk dengan pengaduk magnetik selama 15 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit.
- (2) Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml, sedangkan endapan dalam tabung sentrifugasi ditambah 25 ml air, diaduk dengan spatula, dan disentrifugasi kembali.
- (3) Supernatan dipipet dan dipindahkan ke dalam labu ukur yang sama seperti tersebut di atas hingga volumenya mencapai 100 ml.
- (4) Setelah dicampur dengan baik, sebanyak 10 ml filtrat dibubuhi 0,2 ml larutan iod 0,2% dan absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 550 nm dengan spektrofotometer UV vis. Selanjutnya persen dekstrin dalam contoh ditetapkan dengan memanfaatkan kurva standar dekstrin.

BAB VI

ANALISIS LEMAK

Lemak adalah senyawa ester dari gliserol dan asam lemak. Namun lemak yang ada di dalam jaringan, baik hewan maupun tanaman, juga disertai dengan senyawa lain seperti posfolipida, sterol, dan beberapa pigmen. Dalam analisis kadar lemak, seringkali disebut sebagai analisis “lemak kasar”, karena selain asam lemak terikut pula senyawa-senyawa lain.

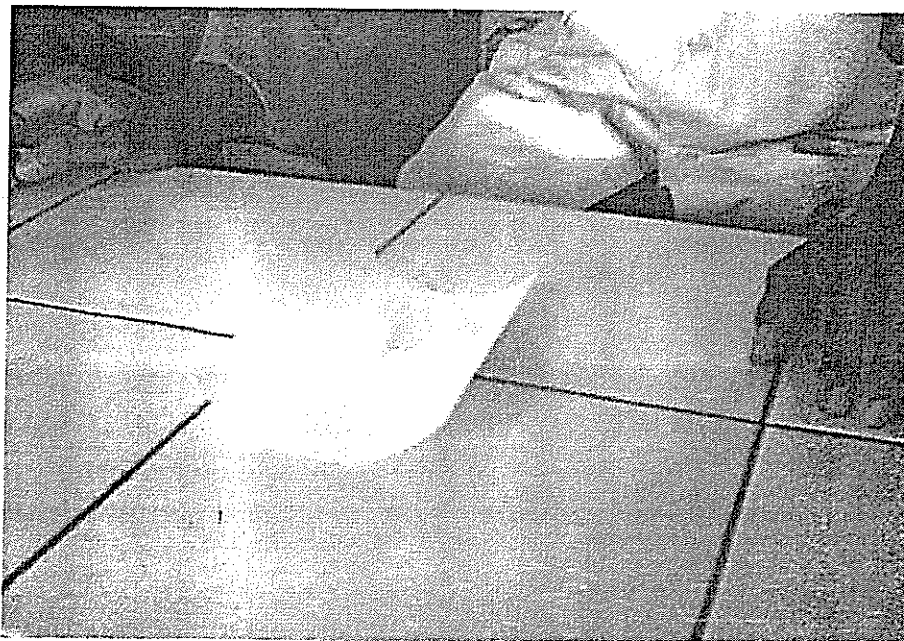
6.1. Penentuan Kadar Lemak dengan Extraksi Soxhlet

1. Buatlah potongan kertas saring halus dengan ukuran 11,7 X 14,5 cm.
2. Timbang ± 1 g sampel kering atau $\pm 1,5$ g sampel basah (Berat A). Letakkan sampel di tengah-tengah kertas saring. Pada samping kanan dan samping kiri sampel letakkan sedikit kapas bebas lemak. Lipat kertas saring (lihat gambar). Sampel yang telah dibungkus, bila perlu dibungkus ulang sekali lagi.
3. Panaskan sampel yang telah terbungkus kertas saring ke dalam oven dengan suhu 100 – 105°C sampai beratnya konstan seperti pada penentuan kadar air.
4. Ambil sampel, masukkan ke dalam desikator ± 15 menit, selanjutnya timbang (Berat B).
5. Masukkan sampel ke dalam alat ekstraksi soxhlet. Masukkan cairan pelarut lemak ke dalam alat ekstraksi sebanyak $\pm 2,5 - 3$ kali volume labu ekstraksi yang telah diisi sampel.
6. Pasang kondensor dengan baik. Labu pemanas di hubungkan dengan sumber pemanas (masukkan ke dalam penangas air dengan suhu

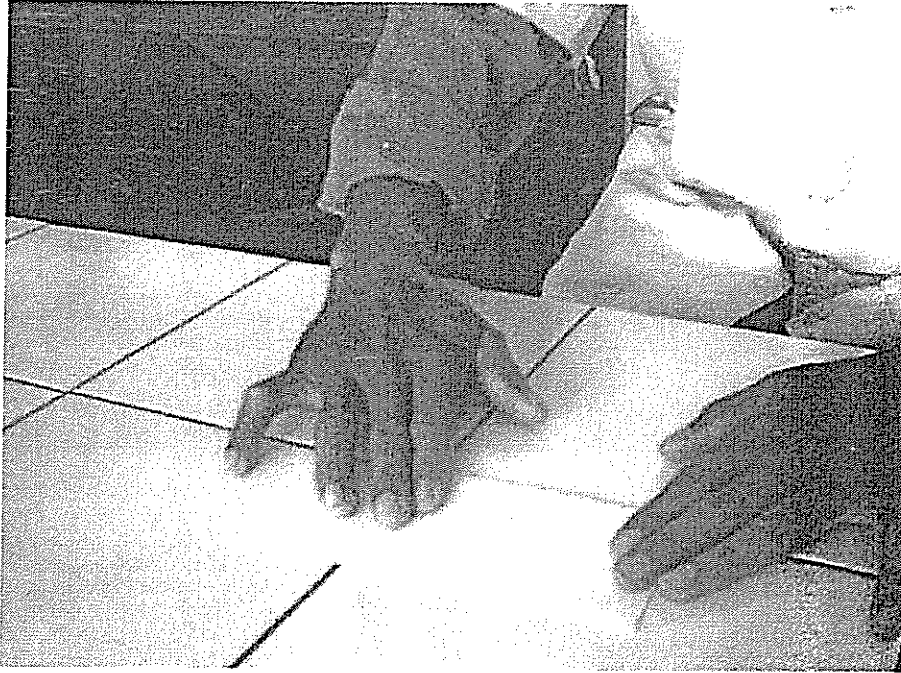
- ± 60° C). Buka kran air, lakukan proses ekstraksi selama minimal 6 jam.
8. Setelah 6 jam proses ekstraksi matikan sumber pemanas, keluarkan sampel dari kondensor. Angin-anginkan ± 30 menit di udara terbuka.
 9. Keringkan sampel dengan oven ± 1 jam. Masukkan ke dalam desikator ± 15 menit, dilanjutkan dengan penimbangan (Berat C).

$$\text{Kadar Lemak Kasar} = \frac{\text{Berat B} - \text{Berat C}}{\text{Berat A}} \times 100 \%$$

Pengukuran kadar lemak metode ini bisa juga menggunakan sampel sisa pengukuran kadar air. Langkah selanjutnya sama dengan langkah no.3 karena sampel sudah dalam keadaan berat kering, pengovenan hanya ± 1 jam, dengan tujuan untuk mengeringkan kertas saring saja.



Ilustrasi 8. Penimbangan Sampel. Pada waktu menimbang letakkan sampel di tengah kertas saring. Pada samping kiri dan kanan sampel letakkan sedikit kapas bebas lemak.



Ilustrasi 9. Pelipatan kertas saring. Lipat kertas saring menjadi dua bagian



Ilustrasi 10. Lanjutan Pelipatan kertas saring. Kertas saring dilipat lagi dengan lebar lipatan $\pm 1,5$ cm.



Ilustrasi 11. Bentuk akhir lipatan



Ilustrasi 12. Pembentukan ujung runcing pada salah satu ujung kertas saring. Pada salah satu ujung lipatan buatlah sedikit lipatan meruncing



Ilustrasi 13. Pemasukan ujung runcing dari kertas saring ke ujung yang lain. Lipatlah dan masukkan ujung yang runcing ke dalam ujung yang lainnya



Ilustrasi 14. Sampel yang telah siap dipanaskan dalam oven. Sebelumnya bungkus sampel di beri kode, gunakan pensil 2B untuk menulis kode sampel. Bila perlu pembungkusan diulang sekali lagi.

6.2. Penentuan Kadar Lemak dengan Metode Goldfish (Sudarmadji, *et al.*, 1996)

Ekstraksi dengan alat Goldfish sangat praktis dan mudah pemakaiannya. Sampel yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam thimble dan dipasang dalam tabung penyangga yang pada bagian bawahnya berlubang. Bahan pelarut yang digunakan ditempatkan dalam bekglas di bawah tabung penyangga. Bila bekglas dipanaskan uap pelarut akan naik dan didinginkan oleh kondensor sehingga akan mengembun dan menetes pada sampel demikian terus-menerus sehingga bahan akan dibasahi oleh pelarut dan lipida akan terekstraksi dan selanjutnya akan tertampung ke dalam bekglas kembali. Setelah ekstraksi selesai (3 - 4 jam), pemanas dimatikan dan sampel berikut penyangganya diambil dan diganti dengan bekglas yang ukurannya sama dengan tabung penyangga. Pemanas dihidupkan kembali sehingga pelarut akan diuapkan lagi dan diembunkan serta tertampung ke dalam bekglas yang terpasang di bagian bawah kondensor. Dengan demikian pelarut yang tertampung ini dapat dimanfaatkan untuk ekstraksi yang lain. Residu yang ada dalam bekglas yang dipasang pada pemanas selanjutnya dikeringkan dalam oven 100°C sampai berat konstan. Berat residu ini dinyatakan sebagai minyak atau lemak yang ada dalam bahan. Seperti halnya cara Soxhlet, penentuan banyaknya lemak/minyak dapat pula dengan menimbang residu dalam thimble sesudah ekstraksi berakhir dan sudah dikeringkan sampai berat konstan. Selisih bobot sample sebelum dan bobot residu sesudah ekstraksi dan sudah dikeringkan merupakan lemak yang ada dalam bahan. Keuntungan cara ekstraksi Goldfish dan Soxhlet adalah pelarut yang sudah dipakai dapat digunakan kembali setelah didestilasi.

6.3. Penentuan Kadar Lemak dengan Babcock (Sudarmadji, *et al.*, 1996)

Penentuan lemak dengan botol Babcock sangatlah sederhana. Sample yang telah ditimbang dengan teliti dimasukkan ke dalam botol Babcock. Pada leher botol Babcock ini telah dilengkapi dengan skala ukuran volume. Sample yang dianalisa ditambah asam sulfat pekat (95%) untuk merusak emulsi lemak sehingga lemak akan terkumpul menjadi satu pada bagian atas cairan. Pemisahan lemak dari cairannya dapat lebih sempurna bila dilakukan sentrifugasi. Rusaknya emulsi lemak dikarenakan asam sulfat dapat merusak lapisan film yang menyelimuti globula lemak yang biasanya terdiri dari senyawa protein. Dengan rusaknya protein (denaturasi ataupun koagulasi) maka memungkinkan globula lemak yang satu akan bergabung dengan globula lemak yang lain dan akhirnya menjadi kumpulan lemak yang lebih besar dan akan mengapung di atas cairan. Setelah disentrifugasi lemak akan semakin jelas terpisah dengan cairannya dan agar dapat dibaca banyaknya lemak maka ke dalam botol ditambahkan aquades panas sampai lemak atau minyak tepat pada tanda skala bagian atas, dengan demikian banyaknya lemak atau minyak dapat secara langsung dibaca/diketahui. Asam sulfat yang berfungsi untuk merusak emulsi minyak dapat diganti dengan senyawa lain misalnya detergent yang bersifat anion yaitu Dioktil sodiumfosfat atau memakai detergent tidak mengion tetapi hidrofil yaitu polioxiethilen sorbitan monolaurat.

6.4. Penentuan Kadar Lemak Metode Gerber (Apriyantono, *et al.*, 1989)

- (1) Masukkan 10 ml H₂SO₄ ke dalam tabung butirometer dengan tanpa membasahi leher tabung.
- (2) Pipet 10,75 ml susu, masukkan ke dalam tabung butirometer dengan tanpa membasahi leher tabung.

- (3) Tambahkan 1 ml amil alkohol. Tutup dengan penutupnya, kocok merata, sentrifuse selama 4 menit pada 1100 rpm.
- (4) Tempatkan tabung dalam penangas air 65°C, selama 3 menit.
- (5) Baca persentase kadar lemak (w/w), sesuai dengan panjang kolom tabung yang telah dikalibrasi.

6.5. Penentuan Kadar Kolesterol Berdasar Reaksi Leibermann-Burchard (Hardini, 2002)

- (1) Sebanyak 1 g sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 25 ml aseton-alkoho (1 : 1).
- (2) Panaskan dalam air mendidih sambil digoyang-goyangkan sampai campuran sampel mendidih.
- (3) Ambil sampel dari penangas air, gojok selama 5 menit, dinginkan pada suhu kamar. Sentrifuse pada putaran cukup tinggi.
- (4) Cairan supernatan dipisahkan ke dalam tabung reaksi lain dan pelarut organiknya diuapkan di atas penangas air mendidih sampai kering, kemudian didinginkan.
- (5) Pada residu ditambahkan 2 ml khloroform, 2 ml asam asetat anhidrat-asam sulfat pekat (30 : 1), simpan ditempat gelap selama beberapa menit (campuran asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat harus segar/dibuat pada waktu akan melakukan analisis).
- (6) Dengan menggunakan spektrofotometer, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 680 nm.
- (7) Kurva standar dibuat dengan menggunakan larutan standar kolesterol murni dengan prosedur yang sama.
- (8) Kadar kolesterol bahan ditentukan dengan mencocokkan absorbansinya dengan kurva standar.

Pembuatan Kurva Standar :

- (1) Timbang 20 mg kolesterol murni, tambahkan 50 ml aseton-alkohol (1 : 1) sehingga konsentrasi larutan tersebut adalah 0,4 mg/ml

(Larutan A). Ke dalam 10 seri tabung reaksi dipipet larutan A masing-masing 0 ml; 0,25 ml; 0,50 ml; 0,75 ml; 1,00 ml; 1,25 ml; 1,50 ml; 1,75 ml; 2,00 ml dan 2,25 ml. Dengan demikian akan diperoleh larutan dengan konsentrasi : 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 dan 0,9 mg/ml.

- (2) Dalam masing-masing tabung tersebut ditambahkan 2 ml asam asetat anhidrat-asam sulfat pekat (30 : 1), ditempatkan dalam ruang gelap selama beberapa menit (\pm 5 menit) hingga larutan menjadi hijau, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 680 nm. Persamaan garis regresi dibuat berdasarkan absorbansi larutan kolesterol standar.
- (3) Kandungan kolesterol sampel = mg/g sampel.

BAB VII

ANALISIS VITAMIN

Vitamin merupakan senyawa organik yang jumlahnya relatif sangat sedikit di dalam suatu bahan pangan. Ada banyak jenis vitamin, tetapi pada umumnya dikelompokkan menjadi dua, yaitu: (1) vitamin yang larut air dan (2) vitamin yang larut dalam lemak. Kelompok vitamin yang larut dalam air yaitu vitamin C (asam askorbat) dan beberapa vitamin B (vitamin B₁, B₂, B₆ dan B₁₂) yang sering disebut sebagai vitamin B kompleks. Sedangkan kelompok vitamin yang larut dalam lemak yaitu vitamin A, D, E dan K.

7.1. Penentuan Kadar Asam Askorbat Total

Prinsip penentuan kadar asam askorbat total adalah asam askorbat dioksidasi seluruhnya menjadi asam dihidroaskorbat oleh arang aktif dengan bantuan asam asetat. Selanjutnya bila direaksikan dengan 2,4-difenilhidrazin dan ditambahkan asam sulfat akan terbentuk warna merah yang intensitasnya dapat diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

Muchtadi (1989) menjelaskan bahan dan prosedur yang digunakan untuk penentuan kadar asam askorbat total berikut ini :

- (1) Terlebih dahulu disiapkan larutan asam metaposfat 5%, asam asetat 10%, larutan Tiourea 10% dan larutan 2-4-dinitrofenilhidrazin.
- (2) Selanjutnya bahan dihancurkan dan dihomogenkan dalam "waring blender" atau mortar dengan menggunakan larutan metaposfat-asam asetat.

- (3) Hancuran tersebut disaring dan ke dalam 15 ml filtrat ditambahkan 0,75 g arang aktif, serta dikocok merata dan kemudian disaring.
- (4) Ke dalam 4 ml hasil saringan ditambahkan 1 tetes Tiourea 10% dan 1 ml larutan dinitrofenilhidrazin (dalam tabung reaksi).
- (5) Blanko dibuat seperti prosedur tersebut di atas tanpa penambahan dinitrofenilhidrazin (diganti dengan akuades). Selanjutnya tabung reaksi ditempatkan dalam penangas 37°C selama 3 jam, kemudian tabung didinginkan dalam air es.
- (6) Ditambahkan 5 ml asam sulfat 85% ke dalam sampel dan blanko, dikocok merata.
- (7) Setelah 30 menit dilakukan pembacaan absorban pada 540 nm. Dibuat konsentrasi asam askorbat dari 0,25-15 µg per ml. Akhirnya dapat ditentukan kadar asam askorbat total.

7.2. Penentuan Kadar Vitamin A dalam Lemak/ Minyak.

Vitamin A di dalam lemak atau minyak dapat ditentukan dengan beberapa metode. Salah satu metode penentuan kadar vitamin A secara cepat adalah dengan metode Carr Price (Apriyantono *et al.*, 1989). Prinsip metode ini adalah vitamin A bereaksi dengan antimon triklorida membentuk warna biru yang dapat diukur intensitasnya dengan spektrofotometer.

Reagensia antimon triklorida dibuat dengan cara sebagai berikut

- (1) Kloroform dicuci dengan air dalam volume yang sama atau 2-3 kalinya, kemudian dibebaskan airnya dengan potasium karbonat anhidrat.
- (2) Dilakukan destilasi dan dibuang sedikit destilat awalnya (sekitar 10%). Larutan antimon triklorida yang terbentuk dicuci dengan kloroform murni (bebas air) hingga jernih.
- (3) Untuk sampel yang diduga banyak mengandung vitamin A dapat langsung digunakan, yaitu terlebih dahulu dilarutkan dalam

kloroform hingga mencapai konsentrasi 20% (w/v). Untuk sampel yang sedikit mengandung vitamin A perlu dilakukan saponifikasi terlebih dahulu. Cara saponifikasinya yaitu: 10 g sampel ditambah 75 ml alkohol 95% dan 25 ml larutan KOH 50%, kemudian dididihkan selama 20 menit. Bagian yang tidak tersabunkan diekstrak dengan kloroform.

- (4) Disiapkan blanko dengan cara mencampur 4 ml reagen antimon triklorida dan 1 ml kloroform hingga merata. Disamping itu, disiapkan 0,5 ml larutan sampel/ bahan yang mengandung vitamin A, kemudian dicampur dengan 2 ml reagensia antimon triklorida hingga merata. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 620 nm.
- (5) Kadar vitamin A ditentukan berdasarkan kurva standar (konsentrasi vitamin A asetat 0-15 IU per ml).

BAB VIII

ANALISIS ABU DAN MINERAL

Abu adalah zat anorganik sisa hasil pembakaran suatu bahan. Kadar abu suatu bahan erat kaitannya dengan kandungan mineral bahan tersebut. Berbagai mineral di dalam bahan ada di dalam abu pada saat bahan dibakar.

8.1. Penentuan Kadar Abu

Prinsip penentuan kadar abu di dalam bahan pangan adalah menimbang berat sisa mineral hasil pembakaran bahan organik pada suhu sekitar 550°C. Penentuan kadar abu dapat dilakukan secara langsung yaitu dengan cara :

- (1) Timbang sampel sebanyak 2-5 g untuk bahan yang banyak mengandung mineral (misalnya: ikan, daging, susu, biji-bijian), atau sekitar 10 g untuk bahan seperti "jelly", "jam", sirup dan buah kering, atau lebih besar lagi (25-50 g) untuk bahan yang mengandung sedikit mineral seperti buah segar, jus dan anggur.
- (2) Membakar bahan pada suhu tinggi (500-600°C) selama beberapa jam (2-8) jam
- (3) Kemudian menimbang sisa pembakaran yang tertinggal sebagai abu.

Penentuan kadar abu juga dapat dilakukan secara tidak langsung, yaitu dengan cara melarutkan sampel kedalam cairan yang ditambahkan oksidator. Setelah itu baru dilakukan pembakaran sampel. Cara pengabuan ini disebut pengabuan cara basah dan keuntungannya adalah suhu pembakaran tidak terlalu tinggi.

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100$$

Untuk menganalisis masing-masing jenis mineral dapat dilakukan dengan alat AAS (Atomic Absorption Spectrophotometer). Menggunakan AAS kandungan beberapa jenis mineral di dalam bahan pangan dapat ditentukan.

8.2. Penentuan Kadar Kalsium

Penentuan kadar kalsium suatu bahan didasarkan pada prinsip bahwa kalsium dapat diendapkan sebagai kalsium oksalat. Endapan dilarutkan dalam asam sulfat encer panas dan dititrasi dengan KMnO_4 . Berikut ini reagensia dan prosedur analisis kadar kalsium sebagaimana dijelaskan oleh Muchtadi (1989).

(1) Reagensia

- a. Amonium oksalat jenuh.
- b. Indikator merah metil. Indikator ini dibuat dengan cara melarutkan 0,5 g merah metil dalam 100 ml alkohol 95%.
- c. Asam asetat encer (1:4).
- d. Asam sulfat encer (1:4).
- e. Amonium hidroksida encer (1:4)
- f. KMnO_4 0,1 dan 0,01 N. Larutan KMnO_4 dibuat pada saat akan digunakan.

(2) Prosedur

- (1) Sebanyak 20-100 ml larutan abu hasil pengabuan kering dimasukkan ke dalam gelas piala 250 ml. Bila perlu ditambahkan 25-50 ml akuades.
- (2) Selanjutnya ditambahkan 10 ml larutan amonium oksalat jenuh dan 2 tetes indikator merah metil. Larutan ditambah amonia encer hingga

menjadi sedikit basa, kemudian ditambah beberapa tetes asam asetat sampai terbentuk warna merah muda (pH 5,0).

- (3) Larutan dididihkan dan didiamkan sekitar 4 jam atau 1 malam pada suhu kamar. Larutan disaring dengan kertas saring Whatman No. 42 dan dibilas dengan akuades hingga filtrat bebas oksalat.
- (4) Endapan dibilas dan dipindahkan dengan asam sulfat encer panas dan dimasukkan kedalam gelas piala. Dibilas sekali lagi dengan air panas.
- (5) Larutan dalam keadaan agak panas (70-80°C) dititrasikan dengan larutan KMnO_4 0,01 N sampai berwarna merah jambu. Dimasukkan kertas saring dan dilanjutkan titrasi hingga terbentuk warna merah jambu permanen kedua. Perhitungan jumlah kalsium adalah sebagai berikut:

Ca (mg/100 g sampel) =

Hasil titrasi x 0,2 x total volume larutan abu x 100

Volume larutan abu yang digunakan x Berat sampel yang diabukan

- menjadi sedikit basa, kemudian ditambah beberapa tetes asam asetat sampai terbentuk warna merah muda (pH 5,0).
- (3) Larutan dididihkan dan didiamkan sekitar 4 jam atau 1 malam pada suhu kamar. Larutan disaring dengan kertas saring Whatman No. 42 dan dibilas dengan akuades hingga filtrat bebas oksalat.
 - (4) Endapan dibilas dan dipindahkan dengan asam sulfat encer panas dan dimasukkan kedalam gelas piala. Dibilas sekali lagi dengan air panas.
 - (5) Larutan dalam keadaan agak panas (70-80°C) dititrasi dengan larutan KMnO_4 0,01 N sampai berwarna merah jambu. Dimasukkan kertas saring dan dilanjutkan titrasi hingga terbentuk warna merah jambu permanen kedua. Perhitungan jumlah kalsium adalah sebagai berikut:

Ca (mg/100 g sampel) =

Hasil titrasi x 0,2 x total volume larutan abu x 100

Volume larutan abu yang digunakan x Berat sampel yang diabukan