

**LEMBAR PENGESAHAN
PANDUAN PRAKTIKUM
ANALISIS ZAT GIZI**

Mengesahkan,
Koordinator Program Studi S1 Gizi

Lailatul Muniroh, S.KM., M.Kes.
NIP 198005252005012004

Surabaya, Januari 2022

PJMK Analisis Zat Gizi

Dominikus Raditya Atmaka, S.Gz., M.PH.
NIP 199206182019031000

DAFTAR ISI

Daftar Isi	1
Tata tertib Praktikum	2
I. Penentuan Kadar Air	3
II. Penentuan Kadar Abu	4
III. Penentuan Kadar Karbohidrat	6
IV. Penentuan Kadar Protein	10
V. Penentuan Kadar Lipida	14
VI. Penentuan Kadar Vitamin C	17

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Peserta praktikum tidak diperkenankan masuk laboratorium sebelum praktikum dimulai.
2. Sebelum praktikum, peserta harus sudah menempuh test mengenai acara yang akan dikerjakan.
3. Peserta wajib hadir tepat pada waktunya. Peserta yang terlambat harus melapor dan mendapat ijin dari laboran pada hari tersebut.
4. Peserta wajib mengisi/ menandatangani daftar hadir sebelum mulai mengerjakan praktikum.
5. Selama praktikum, peserta wajib mengenakan jas praktikum.
6. Selama praktikum, peserta tidak dibenarkan makan, minum, merokok, dan bergurau serta hal-hal lain yang dapat mengganggu jalannya praktikum.
7. Peserta yang melakukan sesuatu hal yang dianggap dapat membahayakan peralatan laboratorium dapat dipersilahkan keluar dari laboratorium.
8. Limabelas menit sebelum waktu akhir praktikum, pekerjaan dihentikan dan waktu yang tersisa tersebut digunakan untuk membereskan peralatan dan membersihkan tempat praktikum yang digunakan.
9. Semua hasil/data pengamatan wajib disahkan oleh laboran jaga, dan data ini dibuat laporan yang kemudian disahkan lagi oleh laboran yang bersangkutan.
10. Setiap akhir praktikum, peserta bertanggungjawabkan semua peralatan yang dipinjamnya kepada petugas laboratorium.
11. Peserta praktikum yang merusakkan atau menghilangkan peralatan wajib mengganti peralatan tersebut sebelum hari praktikum berikutnya, atau sebelum mengikuti tes akhir/responsi.
12. Demi kelancaran jalannya praktikum, semua peserta wajib mentaati tata tertib ini.

I. PENENTUAN KADAR AIR

Penentuan kadar air merupakan analisis penting dan paling luas dilakukan dalam pengolahan dan pengujian pangan. Jumlah bahan kering (*dry matter*) sampel bahan berlawanan dengan jumlah air yang dikandungnya, maka kadar air secara langsung berkaitan dengan kepentingan ekonomis bahan. Kandungan air bahan juga berkaitan dengan kualitas dan stabilitas bahan. Biji yang berkadar air tinggi akan mudah rusak oleh jamur, pemanasan, serangga, dan risiko perkecambahan. Laju pencoklatan sayur dan buah yang dikeringkan serta absorpsi O₂ oleh bubuk telur makin meningkat dengan semakin tingginya kandungan air.

Kadar air perlu diketahui dalam penentuan nilai gizi pangan, untuk memenuhi standart komposisi dan peraturan-peraturan pangan. Kadar air diperlukan juga untuk menghitung komposisi bahan yang disajikan pada basis *dry matter*. Analisa kadar air bahan makanan dapat menggunakan beberapa metoda :

- Metode pengeringan (*thermogravimetri*)
- Metode destilasi (*thermovolumetri*)
- Metode kimiawi (*Fischer method*)
- Metode fisikawi

Cara Pengeringan/ Pemanasan (*thermogravimetri*) (AOAC, 1925)

Prinsip kerja : menguapkan air dari bahan dengan pemanasan sampai berat konstan, sampai semua air sudah menguap habis. Kelemahan metode ini : zat yang mudah menguap pada suhu 100°C ikut menguap dan dihitung sebagai air.

Cara Kerja :

1. Timbang sampel yang telah berbentuk serbuk atau bahan yang telah dihaluskan sebanyak 1-2 gram dalam botol timbang yang bersih dan kering dan diketahui bobot konstan.
2. Keringkan dalam oven suhu 100-105°C selama 3-5 jam tergantung bahannya. Semakin tinggi kandungan air bahan maka semakin lama waktu pengeringannya.
3. Dinginkan botol timbang + sampel dalam eksikator kemudian ditimbang. Panaskan lagi dalam oven selama 1 jam, dinginkan dalam eksikator dan ditimbang. Perlakuan ini diulang sampai tercapai bobot konstan (selisih penimbangan berturut-turut <0,2 mg).
4. Pengurangan bobot merupakan banyaknya air dalam bahan.
5. Hitung kadar air dalam % *wet basis*.

II. PENENTUAN KADAR ABU

Abu merupakan residu atau sisa zat anorganik dari pembakaran bahan organik. Isi dan komposisinya tergantung dari sifat bahan yang dibakar dan metode pengabuannya. Unsur-unsur mineral dalam pengabuan akan menghasilkan abu dalam bentuk garam atau oksida-nya.

Bentuk komponen mineral dalam sampel dapat berbeda dengan bentuknya dalam abu. Misal Ca-oxalat akan berubah menjadi Ca-carbonat dan pada pengabuan lebih lanjut akan menjadi CaO. Beberapa "*trace mineral*" atau mineral runutan yang terikat ke sistem aktif biologis, diubah menjadi senyawa anorganik.

Abu yang larut dalam air kadangkala digunakan sebagai indeks kandungan buah dalam jelly atau awetan buah lain. Abu yang tak larut berguna sebagai indeks pengotoran debu pada rempah-rempah, talk pada kembang gula, adanya pasir pada gula, bijian dan sebagainya. Abu tidak larut ditentukan dengan mendidihkan abu bahan dalam HCl 10%.

Abu dari buahan bersifat alkalis yang merupakan hasil konversi garam-asam organik menjadi garam karbonat. Bahan makanan yang tinggi kadar asam buahan atau garamnya menghasilkan alkalinitas abu yang merupakan indeks porsi buah dalam bahan tersebut.

Pada penentuan abu total, metode yang memberikan hasil memuaskan adalah dengan pengabuan dalam krus porselin pada suhu 400-700°C (paling umum $\pm 550^\circ\text{C}$). Untuk analisa mineral individual perlu pengabuan dalam krus platina.

Bila pengabuan gagal mendapatkan abu bebas karbon, maka abu dibasahi, dikeringkan dan diabukan ulang sampai berwarna putih / abu-abu putih. Kadang perlu ditambahkan H_2O_2 atau asam nitrat untuk membantu reaksi pengabuan.

Pengabuan kering untuk mendestruksi bahan organik pada penentuan mineral runutan (*trace mineral*) jarang diterapkan karena mineralnya dapat hilang menguap. Thiers (1957) merekomendasikan pengabuan kering dengan alat khusus dengan bantuan *hot plate* & lampu *infrared* dengan suhu meningkat bertahap sampai 450°C.

Rumus perhitungan kadar abu adalah sebagai berikut :

$$\text{Kadar abu (wb)} = [(\text{bobot abu}) : (\text{bobot sampel})] \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar abu (db)} &= \frac{\text{bobot abu}}{\text{bobot sampel bebas air}} \times 100\% \\ &= \text{kadar abu (wb)} \times [100 / (100 - \% \text{ air})] \end{aligned}$$

Cara Kerja Pengabuan Kering (Metoda AOAC, 1925)

1. Pijarkan krus porselin dengan tutupnya dalam *muffle-furnace* (tungku pengabuan), dinginkan dalam oven dan kemudian pindahkan dalam eksikator dan ditimbang.
2. Timbang sampel dalam krus porselin yang telah diketahui bobotnya tadi (kira-kira 2-10 gram sampel), bakar pada kompor listrik sampai menjadi arang (tidak berasap lagi, lakukan dalam almari asam). Kemudian pijarkan dalam *muffle-furnace* sampai menjadi abu berwarna keputih-putihan.
3. Masukkan dalam oven 100°C untuk mendinginkan suhu dan lanjutkan pendinginan dalam eksikator dan ditimbang.
4. Ulangi pemijaran selama 30 menit diikuti dengan pendinginan dan penimbangan sampai diperoleh bobot konstan.
5. Hitung bobot abu dan tentukan kadar abu dalam % *wet-basis* dan % *dry-basis*.

Catatan :

- Apabila abu yang diperoleh masih berwarna gelap (abu-abu), basahi abu tersebut dengan larutan ammonia (NH_3) atau hidrogen peroksida (H_2O_2) kemudian diabukan lagi.
- Untuk analisa mineral khususnya mineral runtuhan (*trace mineral*), pengabuan tidak menggunakan cara 'kering' seperti metode di atas, melainkan dengan cara 'basah' yakni dilakukan proses destruksi atau digesti dengan mendidihkan dalam asam mineral kuat pekat (asam klorida, asam sulfat, asam perklorat, atau campurannya). Komponen senyawa organik akan teroksidasi sempurna sedangkan unsur-unsur mineral akan membentuk garam anorganik. Prosedurnya sama dengan prosedur digesti pada analisa total nitrogen untuk penentuan kadar protein (Lihat Bab IV). Larutan garam anorganik ini selanjutnya dapat dianalisa komponen mineral individual dengan metoda gravimetri (pengendapan dan penimbangan), titimetri, atau spektrofotometri (spektrofotometri Serapan Atom atau AAS).

III. PENENTUAN KADAR KARBOHIDRAT

Karbohidrat total kadangkala tidak ditentukan dengan analisa tersendiri tetapi dihitung dari hasil penentuan kadar air, abu, lipid, dan protein dengan asumsi bahwa zat-zat selain komponen tersebut adalah karohidrat. Dengan cara penentuan ini hasilnya dinyatakan sebagai **karbohidrat by difference.**

Jadi :

Karbohidrat '*by difference*' % (wb) = 100% - %wb (air + abu + lipida + protein)

Karbohidrat '*by diference*' % (db) = 100% - %db(abu + lipida + protein)

Dengan cara penentuan tersebut, hasilnya tidak dapat menggambarkan nilai gizi bahan makanan yang dianalisa. Karbohidrat terdiri atas karbohidrat yang dapat dicerna yang terdiri atas senyawa gula (monosakarida dan oligosakarida), dekstrin, dan pati, serta karbohidrat yang tidak dapat dicerna yang merupakan serat (terdiri dari selulosa, hemiselulosa, pectin, glukomannan, galaktomannan, lignin dan dari tanaman air laut : agar-agar, karaginan, furcellaran, hypnean, alginat).

Karbohidrat yang dapat dicerna akan terserap oleh dinding usus halus, dibawa darah ke otot dan hati untuk dibakar menghasilkan energi guna keperluan/ aktivitas hidup sela atau aktivitas hidup kita. Analisa karbohidrat yang dapat dicerna sering mendasarkan pada metoda analisa gula reduksi.

1. Penentuan Gula Reduksi (cara spektrofotometri, metode *Nelson-Somogyi*)

Pembuatan kurva standar :

- Kurva standar dipersiapkan dari larutan glukosa murni berkadar 10 mg / 100 ml yang diisikan ke dalam tabung reaksi sejumlah sebagai berikut :

No. tabung reaksi	1	2	3	4	5	6
Larutan glukosa(ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Aquadest (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Volume total (ml)	1	1	1	1	1	1
Kadar glukosa (mg/ml)	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1

- Tambahkan ke dalam masing-masing tabung diatas 1 ml reagensia Nelson, panaskan semua tabung pada *waterbath* mendidih selama 20 menit.

- Ambil semua tabung, dinginkan bersama-sama dalam air sampai 25°C, kemudian masing-masing ditambahkan 1 ml reagensia Arseno-molybdat, gojog sampai semua endapan larut kembali, kemudian masing-masing tabung ditambah 7 ml aquadest, gojog sampai homogen.
- Ukurlah 'optical density' atau absorbansi-nya dengan spektrofotometer pada spektrum 540 nm dan tabulasikan hasil pembacaan sebagai berikut:

No	x(kadar gula)	y(absorbansi)	x ²	y ²	Xy
1	0 = x ₁	y ₁	x ₁ ²	y ₁ ²	x ₁ y ₁
2	2 = x ₂	y ₂	x ₂ ²	y ₂ ²	x ₂ y ₂
3	4 = x ₃	y ₃	x ₃ ²	y ₃ ²	x ₃ y ₃
4	6 = x ₄	y ₄	x ₄ ²	y ₄ ²	x ₄ y ₄
5	8 = x ₅	y ₅	x ₅ ²	y ₅ ²	x ₅ y ₅
6	10 = x ₆	y ₆	x ₆ ²	y ₆ ²	x ₆ y ₆
N	$\sum x$	$\sum y$	$\sum x^2$	$\sum y^2$	$\sum xy$

- Persamaan kurva standart linier: $y = a + bx$

dimana $b = [n \sum xy - \sum x \sum y] / [n \sum x^2 - (\sum x)^2]$

$$a = [\sum y - b \sum x] : n$$

dengan koefisien regresi $r = \frac{[n \sum xy - \sum x \sum y]}{[n \sum x^2 - (\sum x)^2]^{1/2} [n \sum y^2 - (\sum y)^2]^{1/2}}$

- Siapkan larutan sample yang dijernihkan dahulu secara kimiawi (misalkan dengan Pb-asetat atau Al-hidroksida) dan disaring atau disentrifugasi.
- Encerkan larutan sample sedemikian rupa sehingga mengandung gula reduksi dalam kisaran 2-8 mg/100ml.
- Pipetlah 1 ml larutan sampel jernih dan pindah ke tabung reaksi bersih, kemudian tambahkan 1 ml reagensia Nelson dan selanjutnya diproses seperti larutan gula pada penyiapan kurva standar di atas.
- Hasil pembacaan OD atau absorbansi dimasukkan pada nilai Y pada persamaan garis linear $Y = a + bX$. Maka akan didapatkan nilai X = kadar gula reduksi dalam satuan mg / 10 ml.

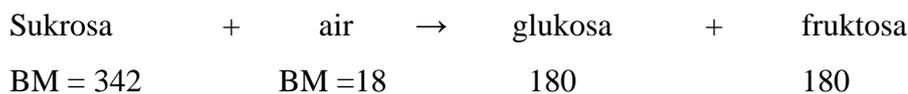
- Dengan menggunakan faktor pengenceran larutan dapat dihitung kadar gula reduksi pada sampel.

2. Penentuan Gula Total :

1. Pipet 25 ml filtrat bebas timbal (Pb) dari penentuan gula reduksi di atas, masukkan erlenmayer, tambah 15 ml aquadest dan 5 ml HCl 30%.
2. Panaskan di atas penangas air dengan suhu 80°C selama 10 menit kemudian dinginkan dengan cepat sampai 20°C, dan netralkan dengan penambahan NaOH 40% dan selanjutnya diencerkan sedemikian rupa sehingga mengandung gula reduksi antara 2-8 mg/100ml.
3. Dipipet 1 ml larutan encer tersebut dan tentukan gula reduksinya seperti pada prosedur pembuatan larutan standar di atas.

Catatan:

Diandaikan gula yang dihidrolisis adalah sukrosa (non-reduktif dihidrolisis menjadi reduktif) maka selisih gula reduksi sesudah hidrolisis dan sebelum hidrolisis adalah sama dengan gula reduksi hasil hidrolisis sukrosa.



$$\text{Sukrosa} = [(342) / (180+180)] \times \text{gula reduksi hasil hidrolisis sukrosa}$$

$$\text{Sukrosa} = 0,95 \times \text{gula reduksi hasil hidrolisis sukrosa}$$

3. Penentuan Pati Total

Pati (amilum = amilosa + amilopektin) dapat dihidrolisis menjadi monosakarida (glukosa) dengan cara menghidrolisis oligosakarida pada no.2 di atas. Akan tetapi diperlukan kadar asam yang sedikit lebih tinggi dan waktu \pm 3-4 jam. Larutan glukosa hasil hidrolisis dinetralkan dan diencerkan sampai kadar gula reduksi antara 2-8 mg/100ml, selanjutnya dilakukan analisa kadar gula dengan metode *Nelson-Somogyi* seperti pada no.1.

Pati merupakan polimer glukosa sehingga persamaan hidrolisisnya :



$$\text{Pati (BM} = n \times 162) \quad (n \times 8) \quad (n \times 180)$$

$$\text{Bobot pati} = (\text{BM pati}) / (n \times \text{BM glukosa}) \times \text{bobot glukosa (gula reduksi)}$$

$$= (162 n) / (180 n) \times \text{bobot gula reduksi} = 0,9 \times \text{bobot gula reduksi}$$

$$\text{Kadar Pati} = 0,90 \times \text{kadar gula reduksi}$$

4. Analisa Kualitatif Karbohidrat

Analisa kualitatif bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan karbohidrat di dalam suatu sampel. Salah satu metode yang dapat digunakan dalam uji kualitatif karbohidrat adalah dengan uji *Benedict*. Reagen Benedict terdiri dari campuran garam kuprisulfat, natrium sitrat, natrium karbonat. Prinsip uji *Benedict* adalah pemanasan karbohidrat yang diberi larutan Benedict akan memberikan perubahan warna hingga membentuk endapan merah bata dari kuprooksida.

Cara Kerja:

1. Ambil 1 ml reagen Benedict, masukkan dalam tabung reaksi 10 ml.
2. Menambahkan 0,5 ml sampel yang akan diuji, kemudian di-vortex.
3. Amati perubahan warna yang terjadi.
4. Panaskan dalam waterbath selama 5 menit.
5. Amati perubahan warna yang terjadi.

IV. PENENTUAN KADAR PROTEIN

1. Penentuan Protein dengan Metode *Kjeldahl*

Penentuan kadar protein kasar dari suatu sampel bahan makanan dapat menggunakan pendekatan melalui penentuan **kadar Nitrogen total**. Hal ini disebabkan karena selain protein, ada senyawa lain yang mengandung unsur Nitrogen misalnya urea, nitrat, nitrit, ammonia, asam nukleat, purin, pirimidin dan amida. Seharusnya yang dihitung hanya Nitrogen yang menyusun protein, namun secara teknis hal ini sangat sulit untuk dilakukan. Nitrogen yang menyusun senyawa selain protein biasanya sangat rendah kadarnya sehingga untuk tujuan ini dapat diabaikan.

Penentuan protein dengan penentuan kadar nitrogen total yang paling terkenal adalah metode Kjeldahl makro yang meliputi tahap-tahap sebagai berikut :

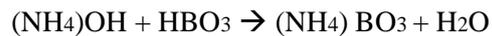
- (a) **Digesti atau destruksi.** Pada tahapan ini sampel bahan (± 2 gram) dididihkan dalam H_2SO_4 pekat sampai semua unsur C dan H terbakar habis yang ditandai cairannya telah jernih. Digesti ini dapat dipercepat dengan menambahkan katalis logam Zink atau Selenium, dan garam K_2SO_4 atau Na_2SO_4 untuk meningkatkan titik didih campuran, dan beberapa butiran porselin guna memperluas kontak pemanasan. Dalam proses ini unsur N akan membentuk garam ammonium-sulfat $(NH_4)_2SO_4$.
- (b) **Destilasi.** Cairan hasil digesti bersifat sangat asam, bila ditambah NaOH pekat sampai alkalis, senyawa Ammonium sulfat akan berubah menjadi ammonium hidroksida (NH_4OH yaitu bentuk larutan ammonia (NH_3) di dalam air). Bila larutan ini didestilasi dengan pengaliran uap air panas, gas NH_3 akan menguap kemudian mengembun di pipa pendingin dan menetes ke labu penampung yang sebelumnya diisi dengan larutan HCl kadar 0,1 N dalam volume tertentu (mgrek HCl harus lebih besar dari mgrek ammonia yang didistilasi).
- (c) **Titrisi.** Ammonia yang terdestilasi akan bereaksi dengan sebagian HCl di dalam labu penampung, dan selanjutnya sisa HCl ditera dengan titrasi menggunakan larutan standart NaOH 0,1 N. Lakukan analisis blanko yang berarti total mgrek HCl \approx mgrek NaOH untuk titrasi.

Metode makro Kjeldahl ini termasuk lambat dan menggunakan reagensia (bahan kimia) relatif banyak sehingga mahal. Kemudian dikembangkan metode mikro Kjeldahl yang hanya menggunakan jumlah sampel dan jumlah reagensia kimia sekitar 10-15% x kebutuhan pada makro Kjeldahl, juga waktu kerjanya lebih singkat. Pada mikro Kjeldahl, larutan penampung destilasi adalah asam borat (H_3BO_3) dan larutan untuk titrasi adalah HCl standar.

Persamaan reaksi distilasi dan titrasi :



Kjeldahl mikro : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2 \text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2 (\text{NH}_4)\text{OH}$



titrasi : $(\text{NH}_4) \text{BO}_3 + \text{HCl standar} \rightarrow (\text{NH}_4)\text{Cl} + \text{HBO}_3$

Perhitungan hasil kerja analisis:

Kjeldahl makro : mgrek N = mgrek NH_4OH = mgrek (HCl-NaOH)

$$\text{mgram N} = \text{mgrek N} \times 14 (\approx \text{BA Nitrogen})$$

Kjeldahl mikro : mgrek N = mgrek NH_4OH = mgrek HCl = (ml x Normal) HCl

$$\text{mgram N} = \text{mgrek N} \times 14 (\approx \text{BA Nitrogen})$$

Dari banyak penelitian diperoleh data bahwa kebanyakan protein mengandung unsur Nitrogen rata-rata sekitar 16% (dalam protein murni), sehingga jumlah bobot Protein dapat dihitung = $(100 / 16) \times$ bobot Nitrogen.

Bobot Protein = 6,25 x Bobot Nitrogen

Faktor konversi = 6,25 dipergunakan secara umum termasuk pada jenis bahan yang komposisi asam amino penyusun proteinnya belum diketahui pasti. Namun ada bahan-bahan yang menggunakan faktor konversi / perkalian berbeda.

Faktor Konversi N ke protein pada beberapa bahan

Jenis Bahan	Faktor Perkalian
Bir, sirup, bijian, ragi, buah-buahan, teh, anggur, malt, pakan ternak	6,25
Beras	5,95
roti, gandum, makaroni, mie	5,70
kacang tanah	5,46
Kedele	5,75
Susu	6,38
Gelatin	5,55

Prosedur Kerja Mikro Kjeldahl :

- Timbang bahan kering 50-60 mg atau 0,2 – 0,5 g bahan basah dan masukkan ke dalam labu Kjeldahl (50ml) dan tambahkan 2 ml asam sulfat pekat. Tambahkan 0,5 – 2 g campuran Na_2SO_4 : HgO (20:1) sebagai katalisator.
- Didihkan di ruang asap sampai jernih dan lanjutkan pendidihan 30 menit lagi. Setelah dingin cucilah dinding dalam labu dengan sedikit aquadest dan didihkan lagi selama 30 menit.
- Setelah dingin pindahkan ke dalam labu distilasi mikro Kjeldahl dan tambahkan 5-10 ml aquadest dan 6-15 ml larutan NaOH- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (40:5 g dan larutkan dengan aquadest sampai 100 ml).
- Segera lakukan destilasi uap, destilat ditampung dalam erlenmayer 100 ml yang telah berisi 5 ml larutan asam borat 4 % (larutan jenuh) dan tambahkan 1 ml indikator campuran (metil merah-metilen biru) atau (metil merah-brom cresol green). Destilasi diakhiri bila semua N telah terdistilasi yaitu bila tetesan distilat tidak bersifat basis lagi.
- Titration destilat dengan HCl 0,02 N.

(f) Hitunglah total N atau % protein dalam bahan dengan menggunakan rumus :

$$\% N = \frac{(N \times ml) HCl \times 14,008}{mg \text{ bahan}} \times 100\%$$

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

2. Penentuan Protein dengan Cara *Lowry-Folin*

Metode *Lowry-Folin* disebut juga *Folin-Ciocalteu test*, yang dapat digunakan untuk penentuan protein. Metode ini dapat mengukur kandungan protein cuplikan hingga 5µg. Warna biru yang terjadi oleh pereaksi Folin Ciocalteau disebabkan reaksi antara protein dengan Cupri (Cu) dalam larutan alkalis dan terjadi reduksi garam fosfomolibdat-fosfotungstat oleh tirosin dan triptofan yang ada pada protein, karena kandungan kedua macam asam amino tersebut bervariasi luas antar jenis protein, maka intensitas warna yang ditimbulkan per miligram protein pun berbeda.

Untuk mengukur banyaknya protein dalam suatu larutan diperlukan kurva, standar yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi protein dengan absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.

Bahan:

1. Reagen A : larutkan 100 g Na₂CO₃ dalam NaOH 0,5 N hingga mencapai volume 1000 ml.
2. Reagen B : larutkan 1 g CuSO₄.5H₂O dalam aquadest hingga mencapai volume 100 ml.
3. Reagen C : larutkan 2 g K-tartrat dalam aquadest hingga mencapai volume 100 ml (Larutan A, B, dan C dapat disimpan).
4. Larutkan standart serum bovin albumin 20mg / 100ml. Siapkan seri konsentrasi untuk pembuatan kurva standart sebagai berikut :

No. tabung reaksi	1	2	3	4	5	6
Larutan BSA (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Aquadest (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Volume total (ml)	1	1	1	1	1	1
Kadar protein (mg/ml)	0	0,04	0,08	0,12	0,16	0,2

5. Reagen D : campur 15 ml larutan A ; 0,75 ml larutan B ; dan 0,75 ml larutan C kemudian digojog homogen.
6. Reagen E : encerkan 5 ml reagen Folin Ciocalteau 2 N menjadi volume 50 ml lalu digojog dengan baik.

Cara Kerja :

1. Masukkan cuplikan sebanyak 1 ml dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 1 ml reagen D, segera digojog dengan vortex dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 15 menit.
2. Tambahkan 3 ml reagen E ke dalam tabung cuplikan dan harus segera digojog vortex secepatnya, kemudian inkubasikan pada suhu ruang selama 45 menit dan segera ukur absorbansinya pada 540 nm. Warna biru yang terbentuk tetap stabil selama 45-80 menit sesudah inkubasi.
3. Buat kurva standart bovin serum albumin dengan konsentrasi 0; 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 mg/ml sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi protein. Berdasarkan garis regresi ini kandungan protein cuplikan dapat diketahui.

V. PENENTUAN KADAR LIPIDA (LEMAK & MINYAK)

Secara definitif, lipida adalah semua senyawa organik yang dapat larut dalam pelarut-pelarut organik yang tidak polar. Sebagian besar (> 90%) senyawa lipida dalam bahan pangan merupakan senyawaan trigliserida (lemak & minyak) dan lainnya dapat berupa asam lemak, bebas, fosfolipida (misalnya lesithin), lilin (wax), steroida (sterol & steron), karotenoid, vitamin (A, D, E, K), terpenoid, atau isoprenoid (antara lain minyak esensial).

Trigliserida dan wax disebut lipida netral yang bersifat sangat tidak polar sehingga sangat sulit larut dalam air namun sebaliknya sangat mudah larut dalam solvent tidak polar/ pelarut organik (benzen, petroleum ether, dietil ether, hexan, kloroform, dsb). Karenanya untuk penentuan kadar lemak & minyak bahan pangan dapat dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan solven nonpolar, menguapkan solven dari ekstrak dan dilanjutkan dengan penimbangan residunya. Solven yang biasa digunakan adalah heksan, dan petroleum ether.

Sebagian lipida dalam bahan pangan terikat (tidak erat) dengan komponen bahan pangan lain (protein, karbohidrat) yang bersifat polar dan hidrofilik (suka mengikat air). Karenanya agar ekstraksi dapat berjalan sempurna, bahan harus dalam keadaan kering dan dalam bentuk tepung halus. Untuk bahan yang kandungan lemak / minyaknya tinggi, bila digiling akan cenderung menggumpal dan sulit dijadikan tepung halus. Bahan seperti itu sebelum diekstraksi lipidanya, dapat ditambah pasir halus dan dicampur hingga homogen / merata. Alat ekstraksi untuk penentuan lipida yang terkenal adalah alat ekstraksi *Soxhlet*, alat ekstraksi *Goldfish*, dan hasil pengembangannya seperti *Soxhlet mikro* serta *Soxhtec*.

Prosedur Kerja Ekstraksi Soxhlet Mikro :

1. Timbang 1-2 g bahan yang sudah kering dan sudah ditepung (lolos 40 mesh), masukkan dalam tabung ekstraksi Soxhlet.
2. Pasang tabung ekstraksi tersebut pada alat destilasi Soxhlet mikro dengan solven petroleum ether secukupnya (± 10 ml), selama 4 jam destilasi.
3. Petroleum ether yang telah mengandung lemak / minyak dipindahkan ke dalam botol timbang bersih yang telah diketahui bobotnya, kemudian solven diuapkan di atas waterbath, dan selanjutnya dikeringkan dalam oven 100°C sampai bobot konstan.
4. Bobot residu dalam botol timbang dinyatakan sebagai bobot lemak & minyak.

Kualitas Lemak & Minyak Pangan

Kualitas lipida dalam jaringan bahan pangan ataupun yang sudah terekstrak sebagai lemak dan minyak dipengaruhi sifat-sifat fisik, kimiawi, serta sifat organoleptik (inderawi). Trigliserida atau nama lengkapnya tri-asil-gliserol merupakan senyawa yang tersusun oleh satu molekul gliserol yang membentuk ikatan ester dengan tiga molekul asam lemak. Tinggi rendahnya titik lebur lemak serta

viskositas / kekentalan minyak merupakan sifat fisik lemak dan minyak yang dipengaruhi oleh bobot molekulnya (BM) atau oleh panjang pendeknya rantai karbon dan oleh tingkat kejenuhan dan ketidakjenuhan asam lemak penyusun trigliseridanya. Lemak padat dalam bahan (misalnya biji kakao) menyebabkan perlu pemanasan bila akan dilakukan ekstraksi dengan cara pengepresan, berbeda bila berupa minyak cair (misal pada biji kacang tanah, kopra, biji bunga matahari, dan sebagainya).

Trigliserida dalam jaringan bahan biologis yang basah / lembab ataupun sebagai lemak / minyak yang lembab akan mudah mengalami hidrolisis menghasilkan asam lemak bebas. Kadar asam lemak bebas yang relatif tinggi dianggap menurunkan kualitasnya karena selain akan memacu reaksi kerusakan lebih lanjut, juga bila ada asam lemak bebas rantai pendek akan menimbulkan cita rasa kurang enak.

Tinggi rendahnya BM relatif dapat diperkirakan dengan penentuan angka penyabunan (*Saponification number*). Sabun (sapon) adalah garam yang merupakan hasil reaksi antara alkali (NaOH, KOH, LiOH) dengan asam lemak (RCOONa, RCOOK atau RCOOLi). Angka Penyabunan dinyatakan sebagai jumlah miligram KOH yang diperlukan untuk menyabunkan 1 gram lemak / minyak. Lemak / minyak dengan BM relatif rendah berarti disusun oleh asam-asam lemak rantai C relatif pendek sehingga jumlah asam lemak per 1 gram relatif lebih banyak dibandingkan pada lemak / minyak yang BM nya relatif tinggi.

Titik lebur lemak dan viskositas minyak juga dipengaruhi oleh ketidakjenuhan asam lemak penyusun trigliserida. Semakin tidak jenuh asam lemak penyusun trigliserida akan semakin rendah titik lebur lemak serta viskositas minyak. Ketidakjenuhan asam lemak dapat diukur dengan Penentuan Bilangan Iodin (*Iodium Number*), yang mendasarkan pada fakta bahwa tiap ikatan rangkap pada rantai C asam lemak dapat diadisi (bereaksi) dengan 2 atom iodium. Semakin tidak jenuh trigliserida, maka semakin tinggi bilangan Iodiumnya.

Lipida tidak jenuh memiliki kelemahan yaitu mudah dan cepat mengalami oksidasi oleh Oksigen udara, dan hal ini akan berakibat pada penurunan kualitas. Hasil oksidasi awal akan memunculkan peroksida asam lemak, sedangkan oksidasi lanjutannya akan menghasilkan senyawa - senyawa yang berbau tidak enak (= bau tengik / 'rancid').

Prosedur Kerja:

1. Penentuan Asam Lemak Bebas (ALB / FFA) (Mechlenbecker, 1960) :

- Timbang sebanyak $28,2 \pm 0,2$ g sampel dalam erlenmayer (bahan harus dalam keadaan cair dan homogen pada saat diambil). Tambahkan 50 ml alkohol netral yang panas dan 1 ml indikator phenol-phthalein (PP).
- Gojog beberapa menit kemudian titrasilah dengan larutan 0,1 N NaOH sampai tercapai warna merah jambu (pink) yang tidak hilang selama 30 menit.
- Persen asam lemak bebas dinyatakan sebagai asam oleat (C_{18:1} BM=282) pada kebanyakan minyak, sebagai asam palmitat (C_{16:0} BM=256) pada minyak sawit dan sebagai asam laurat (C_{12:0} BM=200)

pada minyak kelapa dan minyak inti sawit, serta sebagai asam linoleat (C_{18:2} BM=278) pada minyak kedelai.

- Angka Asam atau % FFA dihitung sebagai berikut:

$$\text{Angka asam} = \frac{(\text{ml} \times \text{N})\text{NaOH} \times \text{BM KOH}}{\text{gram sampel}} = \frac{\text{mg KOH}}{\text{gram sampel}}$$

$$\% \text{ FFA} = \frac{(\text{ml} \times \text{N})\text{NaOH} \times \text{BM asam lemak dominan}}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

2. Penentuan Angka Penyabunan (AOAC, 1926) :

- Timbang 1,5 - 5 g lemak / minyak dalam erlenmayer 200 ml, kemudian tambah dengan 25 ml KOH-alkoholis (larutkan 40 g KOH dalam 1 liter alkohol).
- Tutuplah erlenmayer dengan pendingin balik, didihkan dengan hati-hati selama 30 detik, dinginkan dan tambah beberapa tetes indikator PP.
- Titrasi kelebihan KOH dengan larutan standar 0,5 N HCl. Lakukan juga titrasi blanko yaitu pekerjaan yang sama tetapi tanpa sampel minyak.

$$\text{Angka Penyabunan} = \frac{\text{ml titrasi (blanko-sampel)} \times \text{BM KOH}}{\text{gram sampel}}$$

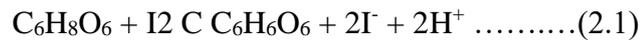
3. Penentuan Ketengikan dengan Angka Peroksida (Cara Titrimetri Iodometri) :

- Timbang $5 \pm 0,005$ g sampel dalam 250 ml erlenmayer kering tertutup dan tambah 30 ml larutan asam asetat - kloroform (3 : 2). Goyangkan sampai bahan larut semua, kemudian tambah 0,5 ml larutan KI jenuh bebas I₂.
- Diamkan selama 1 menit dengan kadang digoyang kemudian tambah 30 ml aquadest.
- Titrasi dengan 0,1 N Na₂S₂O₃ (Na-thiodisulfat) sampai warna kuning hilang. Tambah 0,5 ml larutan amilum 1% dan lanjutkan titrasinya sampai warna biru tepat hilang.
- Angka peroksida dinyatakan sebagai miliekuivalen peroksida dalam 1000 gram sampel.

$$\text{Angka Peroksida} = \frac{(\text{ml} \times \text{N})\text{Na-thiosulfat}}{\text{gram sampel}} \times 1000$$

VI. ANALISA VITAMIN CARA IODOMETRI

Metode pengukuran konsentrasi larutan menggunakan metode titrasi yaitu suatu penambahan indikator warna pada larutan yang diuji, kemudian ditetesi dengan larutan yang merupakan kebalikan sifat larutan yang diuji. Pengukuran kadar Vitamin C dengan reaksi redoks yaitu menggunakan larutan iodin (I₂) sebagai titran dan larutan kanji sebagai indikator. Pada proses titrasi, setelah semua vitamin C bereaksi dengan Iodin, maka kelebihan iodine akan dideteksi oleh kanji yang menjadikan larutan berwarna biru gelap. Reaksi Vitamin C dengan iodine adalah sebagai berikut :



Prosedur analisa vitamin C :

1. menimbang 10 g sampel.
2. memasukkan dalam labu ukur dan mengencerkan dengan aquadest sampai tanda batas.
3. pipet 10 ml filtrat kemudian masukkan dalam erlenmayer 25 ml.
4. tambah 2 ml amilum 1% dan bila perlu tambah dengan aquadest 20 ml.
5. titrasi dengan larutan I₂ 0,01 N sampai terbentuk larutan berwarna biru.

PUSTAKA

1. F.G. Winarno. 1989. *Kimia Pangan dan Gizi*. Penerbit PT Gramedia. Jakarta.
2. Slamet Sudarmadji, Bambang Haryono dan Suhardi. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Penerbit Liberty. Yogyakarta.
3. Slamet Sudarmadji, Bambang Haryono dan Suhardi. 1989. *Prosedur Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Penerbit Liberty. Yogyakarta

Uji Karbohidrat

1. Uji Kuantitatif (Metode Nelson Somogyi)

A. Pembuatan kurva standar

Glukosa anhidrat 0,01 g + 100 ml aquades

	1	2	3	4	5	6
Larutan gula standar (ml)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Aquades (ml)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0
Total volume (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Kadar glukosa (ml)	0,00	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1

Membuat larutan glukosa dengan kadar 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 1

Mengambil masing-masing 1 ml, dimasukkan ke dalam

Menambah 1 ml larutan Nelson (A:B=25:1)

Memvortex

Memanaskan dalam gelas beker yang berisi air mendidih selama 20

Mendinginkan sampai suhu tabung 25°C

Menambahkan 1 ml Arsenomolibdat

Memvortex

Menambahkan 7 ml Aquades

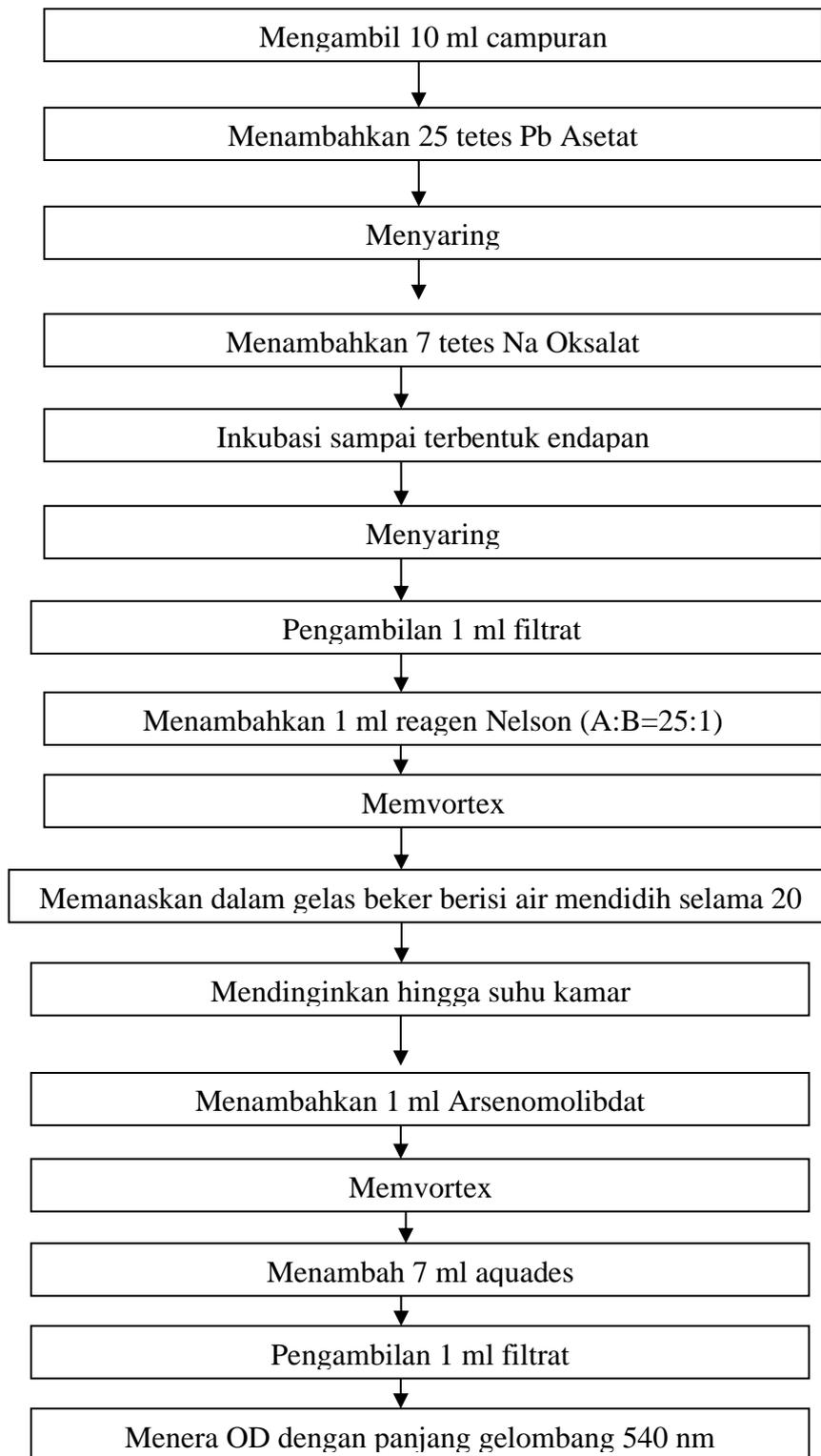
Memvortex

Menera OD dengan panjang gelombang 540 nm

B. Analisa Gula Reduksi

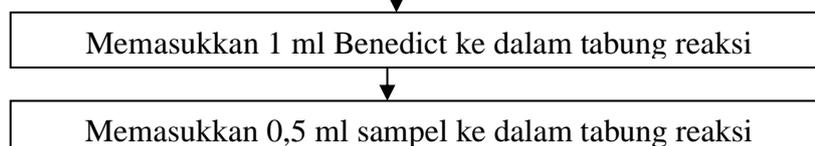
Sampel 1 g + 100 ml aquades

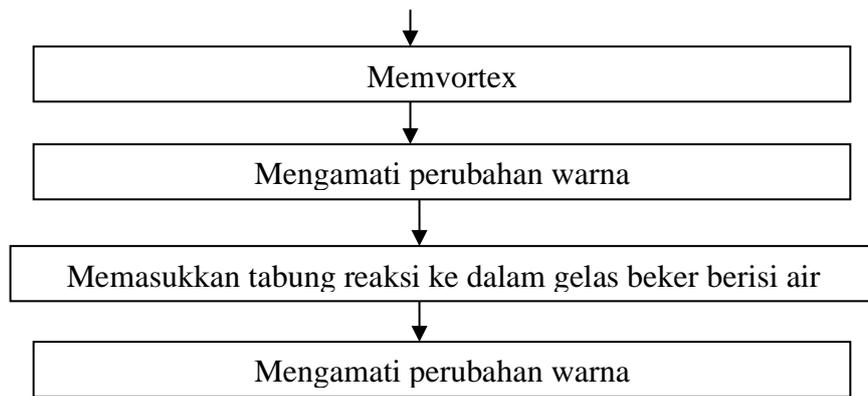
Memvortex



3.2 Analisa Kualitatif

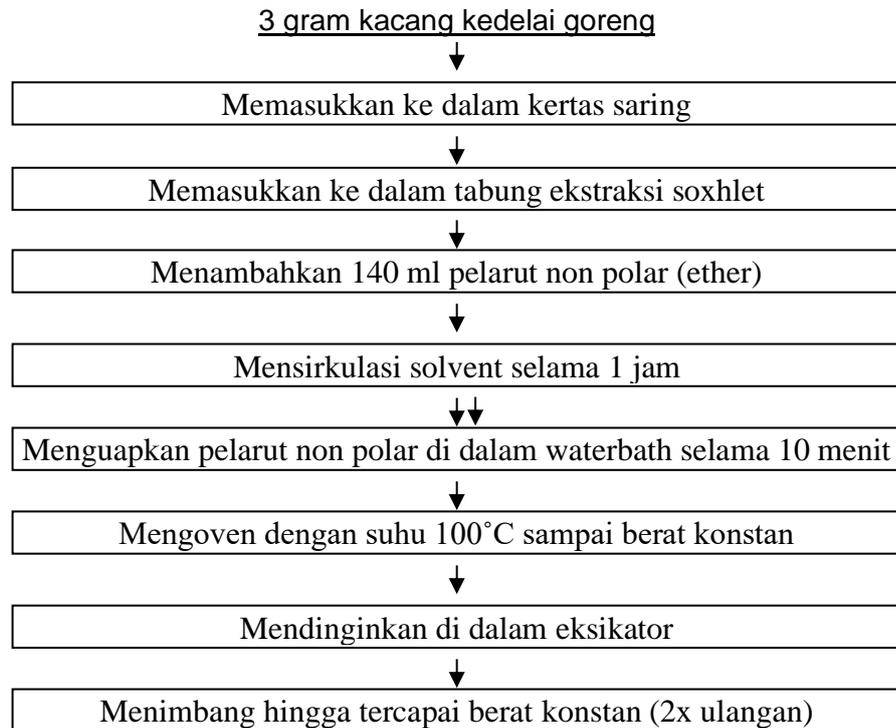
Aquades, susu, madu, jus buah



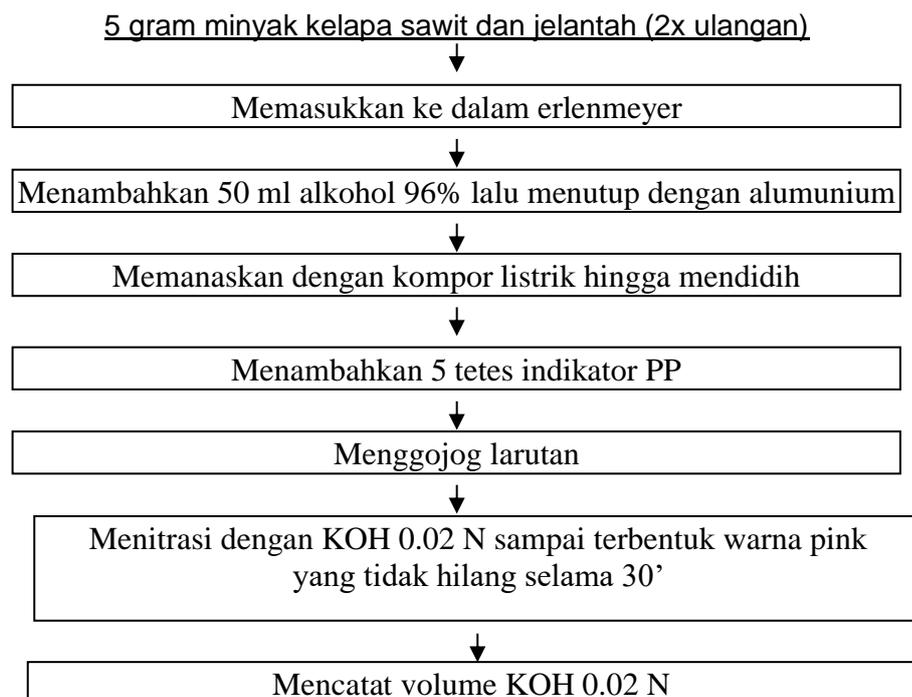


Uji Lemak

Metode Soxhlet



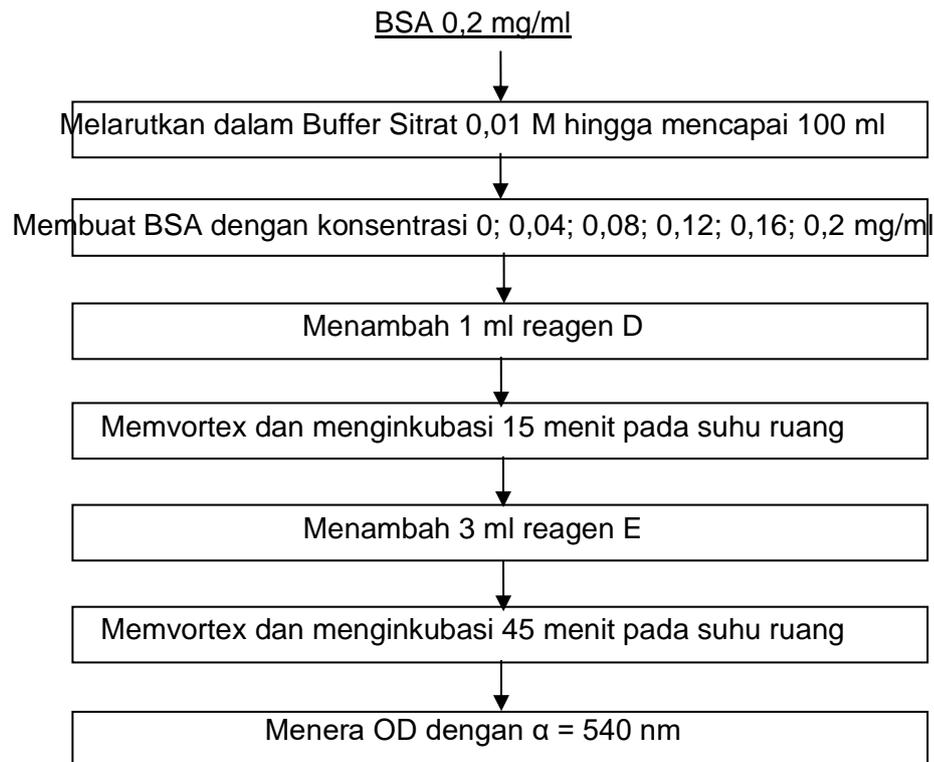
Metode Titrimetri (Angka Asam dan %FFA)



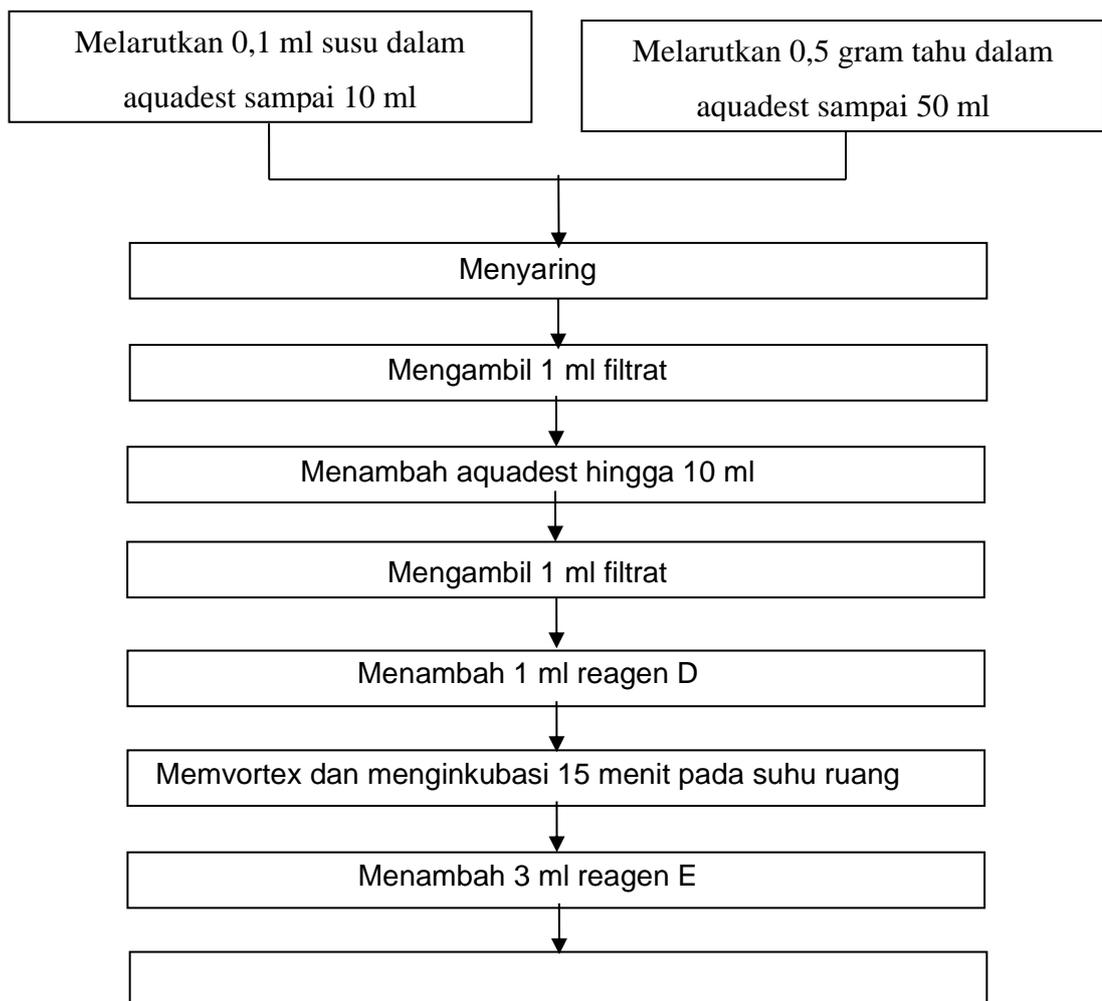
Uji Protein

Uji Protein Terlarut (Metode Lowry Follin)

Pembuatan Larutan Standar



Penentuan Protein Terlarut



Memvortex dan menginkubasi 45 menit pada suhu ruang



Menera OD dengan $\alpha = 540 \text{ nm}$

3.3.2. Pembuatan Blanko

1 ml aquadest + reagen D 0,1 ml



Memvortex dan menginkubasi 15 menit pada suhu ruang



Menambah 3 ml reagen E

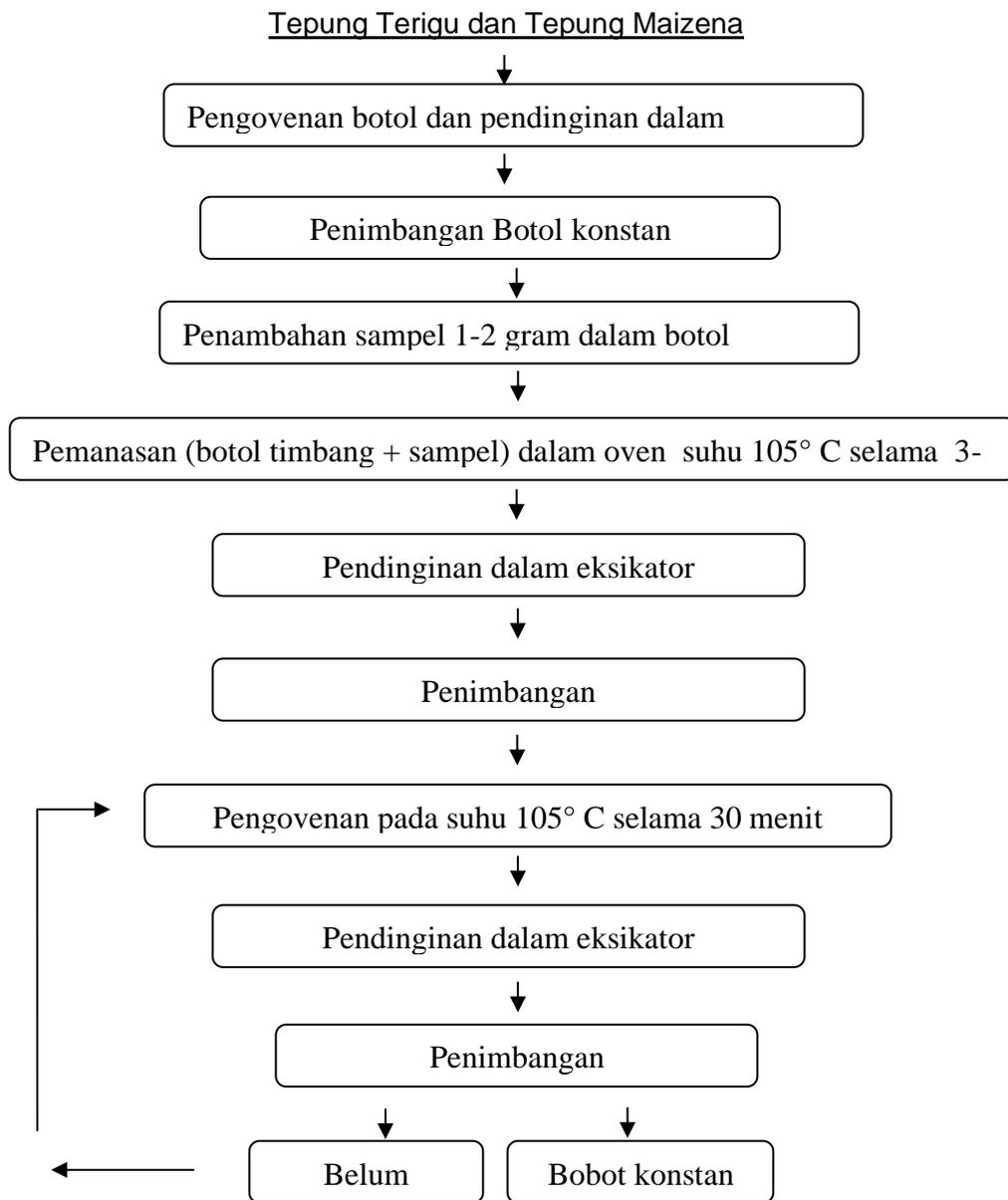


Memvortex dan menginkubasi 45 menit pada suhu ruang

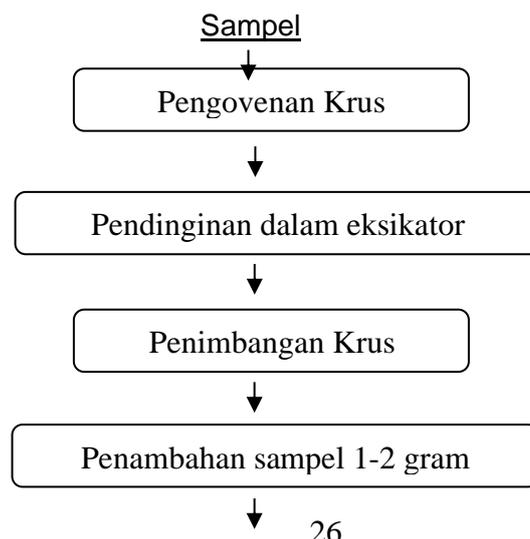


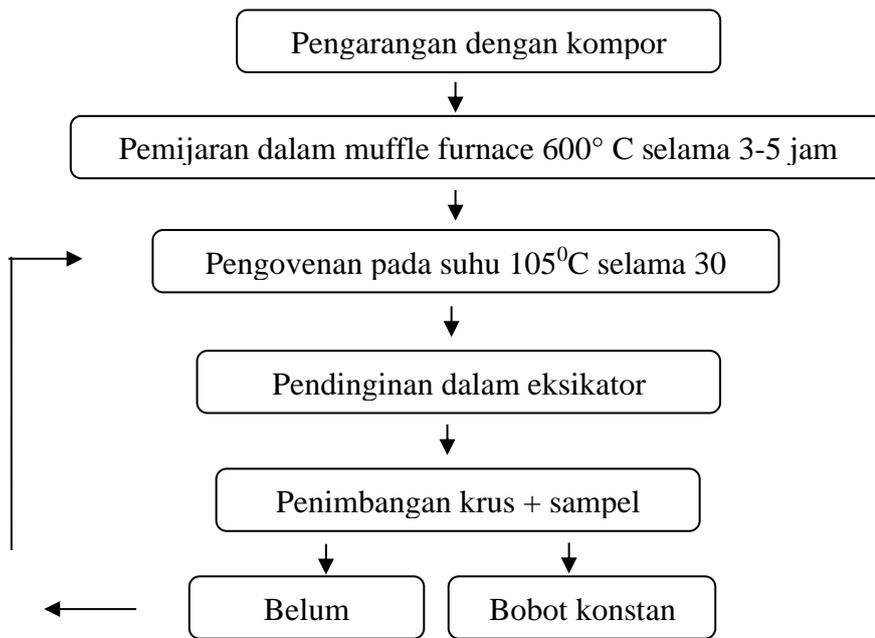
Menera OD dengan $\alpha = 540 \text{ nm}$

Analisis Kadar Air



Analisis Kadar Abu





Analisis Vitamin C

