ANALISA PANGAN

PENULIS :

Prof. Noor Harini
Renita Marianty, S.TP, M.S
Vritta Amroini Wahyudi, S.Si, M.Si

Zifatama
JAWARA

Analisa Pangan

Penulis : Prof. Noor Harini
Renita Marianty, S.TP, M.S
Vritta Amroini Wahyudi, S.Si, M.Si

© 2019

Diterbitkan Oleh:

Penerbit
Zifatama Jawara
Jl. Taman Pondok Jati J4,
Taman - Sidoarjo
Telp : 031-99786278
Email : zifatama1@gmail.com
Anggota IKAPI No. 149/JTI/2014

Cetakan Pertama, November 2019
Ukuran/ Jumlah hal: 15,5 x 23 mm / vi+ 166 hlm
Layout : Emji
Cover: Emji

ISBN : .....-.....-.....-.....

Hak cipta dilindungi oleh Undang-undang Ketentuan Pidana Pasal 112 - 119. Undang-undang Nomor 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta. Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Analisa pangan adalah disiplin ilmu yang berhubungan dengan pengembangan, penerapan, dan studi prosedur analitik untuk mengkarakterisasi sifat-sifat makanan dan konstituennya. Prosedur analitik ini digunakan untuk memberikan informasi tentang berbagai karakteristik makanan yang berbeda, termasuk komposisi, struktur, sifat fisikokimia dan organoleptik. Informasi ini sangat penting untuk pemahaman rasional kita tentang faktor-faktor yang menentukan sifat-sifat makanan, serta kemampuan kita untuk secara ekonomis menghasilkan makanan yang secara konsisten aman, bergizi dan diinginkan dan bagi konsumen untuk mendapatkan informasi pilihan tentang diet mereka.

Analisa pangan terus mengalami perkembangan ke arah yang makin baik, efisien dari segi metode dan juga biaya dengan juga memperhatikan kualitas keamanan dan kesehatan. Perkembangan tersebut menyesuaikan dengan legalitas yang ada dan juga permintaan para konsumen. Analisa pangan pada awalnya berkembang pada abad ke-20 berdasarkan ilmu kimia yang kemudian berkembang di metode aplikasi laboratorium dan juga instrumental.

Bahan pangan dianalisis hampir di semua sektor utama industri makanan termasuk produsen makanan, pemasok bahan, laboratorium layanan analitik, laboratorium pemerintah, dan laboratorium penelitian perguruan tinggi. Tujuan dari dilakukan kegiatan analisa pangan antara lain peraturan pemerintah (standar makanan, pelabelan informasi nutrisi, keaslian produk, inspeksi dan penentuan peringkat makanan), keamanan pangan, kontrol kualitas (*Quality Control* meliputi karater bahan baku, memonitor

bahan pangan selama proses pengolahan, karakterisasi produk akhir), penelitian dan pengembangan produk *(Research and Development).*

Kegiatan analisa pangan di laboratorium sesungguhnya memiliki alur berfikir bermula dari penentuan tujuan kemudian berlanjut terhadap pemilihan metode/ prosedur analisis. Pada dasarnya kegiatan analisis memiliki dua tujuan yaitu, analisis kualitatif dan analisis kuantitatif. Analisis kualitatif bertujuan untuk mengidentifikasi atau mengelompokkan komponen hasil pemisahan, sedangkan analisis kuantitatif bertujuan mengukur ataupun menghitung kadar komponen hasil pemisahan. Analisa kualitatif ataupun kuantitatif, keduanya memiliki prinsip yang sama yaitu, "pemisahan". Hal ini berdasarkan makna istilah analisa sesungguhnya. Istilah "analisa" berarti kegiatan pemisahan suatu kesatuan menjadi komponen penyusunnya untuk dikaji lebih lanjut. Analisa bisa juga disebut dengan istilah analisis (berasal dari kata serapan bahasa Inggris : *analysis)*.

Analisis kualitatif ataupun kuantitatif pastinya memiliki prosedur yang berbeda. Penentuannya sendiri berhubungan dengan tiga poin penting yang perlu diperhatikan antara lain : pengetahuan dasar tentang komposisi suatu bahan yang akan dianalisa, tingkat ketelitian yang dikehendaki (berhubungan dengan instrumen), dan jumlah sampel yang tersedia (berhubungan dengan waktu analisis dan teknik). Semua penentuan ini membutuhkan satu benang merah dalam proses pembelajaran.

Metode yang digunakan untuk menganalisis bahan pangan tentunya berhubungan dengan tujuan dan sifat fisikokimia dari sampel yang akan diuji. Buku ini membantu pembentukan pola pikir pembaca untuk memahami prinsip dari metode analisis

yang tepat sesuai dengan tujuan analisa. Metode yang ada juga disesuaikan dengan AOAC *(Association of the Official Analytical Chemists)* dan ISO *(International Organization for Standardization)*. Sebagai pelengkap, buku ini melampirkan penjelasan singkat mengenai K3 (Keamanan, Kesehatan, dan Keselamatan) saat bekerja di Laboratorium.

Materi di dalam buku ini mencakup analisis kualitatif dan kuantitatif dari kandungan air, abu, protein, lipid, karbohidrat, serta analisis menggunakan instrumen pada bahan pangan. Instrumen yang dibahas di buku ini berfokus pada penggunaan kromatografi dan spektrofotometri. Keunggulan pada buku ini, pada akhir pembahasan tiap bab, dirangkumkan rekomendasi dan pola pikir untuk menentukan metode mana yang tepat sesuati tujuan analisis. Harapan dengan adanya buku ini, mahasiswa dan juga para dosen pemangku mata kuliah analisa pangan dapat terbantu dengan penjelasan di buku ini.

Perkembangan metode analisis pangan tentunya akan mengalami kemajuan seiring bertambahnya waktu. Sehubungan dengan hal itu, penulis membuka peluang kritik dan saran demi perbaikan buku ini di masa mendatang. Terimakasih.

Tim Penulis

DAFTAR ISI

Bab 1
K3 (Keamanan, Kesehatan, dan Keselamatan) Bekerja di Laboratorium 5

Bab 2
Alur Berfikir pada Pemilihan Metode Analisis Pangan 13

Bab 3
Analisis Air 21

Bab 4
Analisis Karbohidrat 39

Bab 5
Analisis Protein 65

Bab 6
Analisis Lipid 91

Bab 7
Analisis Abu-Mineral 117

Bab 8
Spektroskopi 123

Bab 9
Kromatografi 141

Daftar Pustaka 157

Riwayat Penulis 159

1

K3 (Keamanan, Kesehatan, dan Keselamatan) Bekerja di Laboratorium

Bekerja di laboratorium analisa pangan sedikit banyak harus menguasai aturan dasar mengenai K3 (Keamanan, Kesehatan, dan Keselamatan) bekerja di Laboratorium. Bekerja di laboratorium dengan alat dan bahan kimia tertentu membutuhkan kedisiplinan dan keteraturan tertentu. Hal ini tertuang dalam aturan K3 yang meliputi aturan berpakaian dan APD (Alat Pelindung Diri), SOP (*Standar Operasional Procedure),* dan juga tata letak dan ruangan laboratorium.

Laboratorium berpotensi sebagai tempat bekerja yang berbahaya. Adanya bahan-bahan kimia yang mudah terbakar, beracun dan korosif dan alat-alat gelas yang mudah pecah dapat menyebabkan luka yang serius. Namun demikian bahaya ini dapat diperkecil jika tindakan pencegahan yang sesuai diketahui dan dituruti. Jika pertolongan tidak segera dilakukan, kecelakaan kecil bisa menjadi besar. Oleh karena itu, penanganan bahan kimia dan alat-alat yang benar sangat diperlukan demi keselamatan dan berhasilnya pekerjaan di laboratorium.

Bahan-bahan beracun terdapat dimana-mana karena penggunaan bahan-bahan kimia yang semakin meluas. Terlebih di laboratorium sebagai tempat penyimpanan dan penggunaan berbagai bahan kimia. Maka kecermatan kerja dan sifat hati-hati mutlak diperlukan agar tidak terjadi kecelakaan atau keracunan.

Keracunan dapat dihindarkan apabila peraturan berikut diperhatikan.

1. Kesadaran akan bahaya dari setiap bahan kimia sebelum pengerjaan analisis
2. Simpanlah semua bahan kimia pada tempatnya dalam wadah tertutup dengan label yang sesuai dan peringatan tentang bahayanya.
3. Dilarang menyimpan bahan kimia berbahaya dalam wadah bekas makanan atau minuman
4. Dilarang makan, minum atau merokok di laboratorium
5. Untuk mengerjakan bahan yang mudah menguap pergunakan lemari asam dengan ventilasi yang cukup.
6. Pakailah pakain khusus (Jas Lab)
7. Mengetahui dan selalu siap akan hal yang harus dilakukan pada keadaan darurat.

Tujuan dari K3 yaitu untuk menjamin kesehatan, keselamatan, dan kesejahteraan orang yang bekerja di laboratorium, mencegah orang lain terkena resiko terganggunya kesehatan akhibat paparan aktivitas di laboratorium, mengontrol penyimpanan dan penggunaan bahan yang mudah terbakar dan beracun, serta mengontrol pelepasan bahan berbahaya dan zat berbau ke udara sehingga tidak berdampak negatif terhadap lingkungan.

Beberapa aturan dasar yang bisa ditaati saat bekerja di laboratorium antara lain melalui penguasaan pengetahuan bahan kimia dengan memahami *Material Safety Data Sheet* (MSDS), penggunaan Alat Pelindung Diri (APD) sebelum masuk dan

selama bekerja di laboratorium, mendengarkan dan mengikuti arahan yang diberikan oleh koordinator laboratorium, dan bekerja sesuai prosedur dengan menaati penggunaan alat dan *spot location* dilakukannya kegiatan laboratorium.

Berpakaian di laboratorium juga harus memperhatikan beberapa hal di antaranya :

a) Tidak memakai perhiasan yang dapat rusak oleh bahan kimia, sepatu yang terbuka, sepatu licin, atau berhak tinggi.

b) Wanita dan pria yang memiliki rambut panjang harus diikat. Wanita yang berhijab, hijabnya harus dimasukkan ke dalam jas lab. Rambut panjang yang tidak terikat dan juga kain hijab yang tidak dimasukkan ke dalam jas, dapat menyebabkan kecelakaan karena dapat tersangkut pada alat yang berputar.

c) Disiplin mengenakan jas, sarung tangan, dan kacamata pengaman.

Gambar 1.1 Kegiatan di Laboratorium

Bahan kimia atau biasa disebut reagen memiliki beberapa klasifikasi. Berdasarkan wujudnya, bahan kimia terbagi menjadi tiga jenis yaitu,

a) Bahan kimia berbentuk cair

Bahan kimia yang berbentuk cair bisa merupakan suatu pelarut/ solven dan juga larutan (campuran ataupun hasil pengenceran).

Kode fasa yang digunakan untuk pelarut adalah (l) dari kata *liquid* sedangkan larutan adalah (aq) dari kata *aqueous.*

Contoh : larutan HCl, pelarut *n*-heksana, pelarut kloroform, dan lain-lain.

b) Bahan kimia berbentuk padat

Bahan kimia yang berbentuk padat bisa berupa serbuk ataupun kristal.

Kode fasa yang digunakan untuk bahan padat adalah (s) dari kata *solid.*

Contoh : NaOH, NaCl, logam Mg, dan lain-lain.

c) Bahan kimia berbentu gas

Bahan kimia yang berbentuk gas memiliki kode fasa (g) dari kata *gass.*

Contoh : gas He (helium), gas O_2 (oksigen), dan lain-lain.

Bahan kimia memiliki tingkat kemurnian yang berbeda. Berdasarkan tingkat kemurniannya, bahan kimia terbagi menjadi dua jenis yaitu,

a) Bahan kimia teknis

Bahan kimia teknis memiliki tingkat kemurnian < 100%. Bahan kimia teknis bisa digunakan untuk kegiatan analisis yang tidak membutuhkan tingkat ketelitian yang tinggi.

b) Bahan kimia *pro analys* (p.a)

Sesuai namanya, bahan kimia *pro analys* sangat cocok untuk kegiaatan analisis yang membutuhkan tingkat ketelitian yang tinggi. Bahan kimia *p.a* memiliki tingat kemurnian 100%.

Tanda bahwa bahan kimia tersebut tergolong teknis ataupun *p.a* dapat dilihat pada label yang ada di dalam botol kemasan.

Penggunaan bahan kimia dalam kegiatan di laboratorium tentunya harus memperhatikan jenis bahaya yang dapat ditimbulkan. Para analis dapat memperhatikan simbol hazard yang ada di setiap label kemasan bahan kimia. Berikut beberapa contoh simbol hazard dari bahan kimia yang harus diperhatikan.

Tabel 1.1 Simbol Hazard Bahan Kimia dan Artinya

Simbol	Kode dan Arti
	C *(Corrosive)* Korosif
	E *(Explosive)* Mudah meledak
	F *(Flammable)* Mudah terbakar

Simbol	Kode dan Arti
	N *(Nature polluting)* Berpotensi mencemarkan lingkungan (jika dibuang sembarangan)
	O *(Oxidising)* Mudah mengalami oksidasi
	T *(Toxic)* Beracun
	Xn *(Harmful)* Berbahaya
	(Hazardous to health) Berbahaya jika terpapar

Kemurnian bahan kimia, terutama dalam analisis sangat penting guna memperoleh ketelitian semaksimal mungkin.

Perhatikan label yang tertera dalam wadah asli bahan kimia. Jika mungkin digunakan selalu bahan kimia yang berasal dari wadah aslinya sehingga bisa diketahui dengan pasti bahan kimia yang dipakai.

Setiap membuka wadah bahan kimia, tutup wadah harus dihindarkan dari segala kemungkinan kontaminasi. Tutuplah segera setiap selesai mengambil bahan kimia, untuk mengurangi kemungkinan kontaminasi, dehidrasi atau penyerapan air dari udara, lalu kembalikan ketempat semula. Setiap akan menggunakan reagen atau larutan kimia kocoklah terlebih dahulu. Kelebihan reagen atau larutan kimia yang digunakan jangan dituang kembali ke wadah semula, oleh karena itu gunakan seperlunya. Pipet tidak boleh langsung dipakai menyedot reagen atau larutan bahan kimia dalam wadah asli tapi tuanglah terlebih dahulu kedalam wadah lain yang bersih dalam jumlah seperlunya.

Ada beberapa aturan dasar bekerja dengan bahan kimia di laboratorium antara lain :

a. Menghindari kontak langsung dengan reagen tersebut
b. Menghindari menghirup langsung uap bahan kimia
c. Tidak diperkenankan mencicipi atau mencium bahan kimia. Jika ingin mencium aroma reagen (tertentu dengan catatan sesuai prosedur bekerja), bisa dengan cara mengibaskan tangan di antara botol bahan kimia dengan hidung.

Banyak bahan kimia yang harus ditangani dengan hati-hati sekali karena sifatnya yang berbahaya ataupun bersifat racun. Beberapa bahan kimia yang digunakan dalam buku ini yang perlu mendapat perhatian khusus karena sifatnya yang dapat mengganggu kesehatan. Bahan-bahan diantaranya adalah:

1. $AgNO_3$ (perak Nitrat, silver nitrate)

   Bobot molekul 169,89. Senyawa ini beracun dan korosif. Mengganggu kulit dan lapisan mukosa. Simpan dalam botol berwarna dan ruang yang gelap dan jauhkan dari bahan-bahan yang mudah terbakar.

2. HCl (Hidrochloric acid, asam klorida)

   Bobot molekul 36,45. Menyebabkan luka bakar dan dermatitis (kulit melempuh), demikian juga uapnya dapat menyebabkan hal yang sama.

3. HgO (Mercurr Oxide). Bobot melekul 216,61

   $HgCl_2$ (Mercury bichlorida). Bobot molekul 271,52

   Hg (quick silver: air raksa). Bobot atom 200,59

   Senyawa-senyawa tersebut sangat beracun. Cuci tangan setelah bekerja dengan bahan-bahan tersebut, jangan sampai menghirup debu dari bahan ini, karena bersifat merusak membrane mukosa. Gejala keracunan ada 2 macam yaitu :

   - Akut : pusing, muntah, sakit perut, diare dan kerusakan ginjal
   - Kronis : bengkak pada mulut dan gusi, air liur banyak keluar berlimpah, gigi menjadi goyang, kerusakan ginjal, gemetar, gangguan syaraf.

4. H_2S (Hidrogen sulfide, hydrosulfurid acid, asam hidrosulfur)

   Bobot molekul 34.08. Mudah terbakar dan beracun. Menghirup gas ini dapat menyebabkan pingsan, gangguan pernafasan dan kematian. Panca indera yang terganggu menyebabkan tak dapat merasakan adanya gas ini.

5. H_2SO_4 (Sulfuric acid, asam sulfat)

   Bobot molekul 98,08. Merusak jaringan tubuh, sangat bersifat korosif, higroskopis dan bersifat membakar bahan organic. Untuk pengenceran, tuangkan asam sulfat perlahan-lahan pada bahan pengencer. Dapat larut dalam air dan alkohol dengan menimbulkan panas dan penyusutan volume. Menghirup uap asam sulfat pekat dapat menyebabkan kerusakan paru-paru. Kontak dengan mata dapat menyebabkan kebutaan.

6. NaOH (sodium hydroxide, natrium hidroksida, kaustik soda)

   Botol molekul 40.01. Bersifat higrokopis dan mudah menyerap gas karbondioksida. Merusak jaringan tubuh.

7. NH_3 (Ammonia)

   Bobot molekul 17,03. Menghirup ammonia dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan pembengkakan saluran pernafasan dan sesak nafas. Terkena ammonia pada konsentrasi 0,5% (v/v) selama setengah jam dapat menyebabkan kebutaan.

8. HCN (Hydrocyanic acid, prussic acid, asam sianida)

   Bobot molekul 27,06. Beracun. Menghirup gas ini dapat menyebabkan pingsan dan kematian. Hindarkan kontak dengan kulit.

9. HF (Hydrofluric acid, asam fluorida)

   Bobot molekul 20,008. Asam ini maupun uapnya sangat beracun., menyebabkan iritasi pada kulit, mata dan saluran pernafasan. Kontak dengan ammonia dan kebanyakan logam menghasilkan gas yang beracun

10. HNO_3 (Nitric acid, asam nitrat)

Bobot molekul 63,016. Bersifat korosit, menyebabkan luka bakar bila kontak dengan bahan ini. Uap bahan ini bila tersedot ke dalam pernafasan dapat mematikan.

Material Safety Data Sheet (MSDS) merupakan dokumen yang mencantumkan informasi yang berkaitan dengan keselamatan dan kesehatan kerja untuk penggunaan berbagai zat dan produk. MSDS adalah sistem yang banyak digunakan untuk membuat katalog informasi tentang bahan kimia, senyawa kimia, dan campuran kimia. Informasi MSDS dapat mencakup instruksi untuk penggunaan yang aman dan potensi bahaya yang terkait dengan bahan atau produk tertentu, bersama dengan prosedur penanganan penggunaan bahan kimia. Berikut merupakan contoh formulir MSDS.

***Material Safety Data Sheet* (MSDS)**
Bagian 1 : Informasi Bahan
Nama bahan Penggunaan bahan Nama pabrik/perusahaan yang mengeluarkan Alamat/ email perusahaan Nama supplier Nomor telepon/ email supplier
Bagian 2 : Informasi Hazard
Bahan hazard

***Material Safety Data Sheet* (MSDS)**
Bagian 3 : Informasi Fisik
Penjabaran wujud fisik bahan kimia (cair, gas, atau padat?)
Bagian 4 : Informasi Kecenderungan Terbakar/ Mudah Meledak
Penjabaran kondisi yang harus dijaga kestabilannya agar tidak terbakar/ meledak
Bagian 5 : Informasi Kereaktifan
Informasi mengenai bahan kimia yang harus dihindarkan agar tidak terjadi kontak yang membahayakan.
Bagian 6 : Infomasi Tingkat Toksik
Penjelasan dampak pada manusia untuk jangka panjang
Bagian 7 : Informasi Pencegahan
Penjabaran mengenai cara penggunaan, penyimpanan, pencampuran dengan bahan kimia lain
Bagian 8 : Informasi Penanganan Pertama Jika Terjadi Kecelakaan
Penjelasan mengenai cara penanganan saat terjadi kecelakaan
Bagian 9 : Informasi Persiapan Bahan
Penjelasan mengenai persiapan pemakaian bahan saat di laboratorium

Gambar 1.2 Contoh Form MSDS

2

Alur Berfikir pada Pemilihan Metode Analisis Pangan

Analisis bahan pangan sesungguhnya merupakan aplikasi dari kimia analitik. Kimia analitik merupakan cabang ilmu kimia yang mempelajari dasar-dasar analisis kimia. Analisis berarti penguraian dan penentian bahan menjadi senyawa-senyawa penyusunnya (komponennya). Kegiatan analisis memiliki dua tujuan yaitu, analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif bertujuan untuk mengidentifikais jenis atau golongan suatu bahan ataupun mengidentifikasi komponen penyusun dari bahan uji. Analisis kuantitatif bertujuan untuk mengetahui jumlah atau kadar setiap komponen penyusun dari suatu bahan. Dua tujuan ini seharusnya telah ditentukan saat akan bekerja di laboratorium karena tujuan yang berbeda akan menghasilkan metode yang berbeda pula.

Terdapat tiga poin penting yang dibutuhkan untuk membentuk alur berpikir pada kegiatan analisis di laboratorium. Tiga poin tersebut antara lain :

- Pengetahuan dasar tentang komposisi suatu bahan yang akan dianalisa.
- Tingkat ketelitian yang akan dikehendaki, berhubungan dengan instrumen yang digunakan.
- Jumlah sampel bahan yang tersedia, berhubungan dengan waktu analisis dan teknik yang digunakan.

Pemilihan prosedur analisis sendiri harus meliputi beberapa syarat antara lain :

- Valid : Valid untuk mengukur besaran tertentu
- Akurat : Menunjukkan tingkat kebenaran dari angka-angka yang dihasilkan oleh prosedur tersebut
- Cermat : Berhubungan dengan daya ukur instrumen yang digunakan untuk mengukur
- Cepat : Prosedur yang digunakan efisien secara waktu
- Hemat : Prosedur yang digunakan efisien secara biaya
- Aman : Memiliki tingkat keselamatan yang tinggi
- Konstan : Memiliki nilai keterulangan yang tinggi
- Spesifik : Bersifat khusus untuk tujuan tertentu.

Beberapa metode telah tersedia untuk menguji sampel makanan dari segi karakteristik dan juga komponen (senyawa) yang terkandung di dalamnya. Pada proses penentuan metode mana yang tepat, seorang analis sebaiknya telah memiliki pengetahuan akan prinsip yang mendasari prosedur dan langkah-langkah yang meliputi.

Pemilihan metode sangat tergantung pada tujuan analisis. Analisis proksimat makanan mengacu pada penentuan kadar air, abu-mineral, lipid, protein, dan karbohidrat. Metode yang dipilih tergantung dari komposisi komponen penyusunnya misalkan pada suatu sampel dimana kandungan lipidnya tinggi akan berbeda tahapan preparasi (persiapannya) dengan sampel makanan yang tinggi kandungan gulanya (karbohidrat). Berdasarkan penjelasan inilah dibutuhkan satu sinergi antara pengetahuan bahan pangan dan metode yang tersedia.

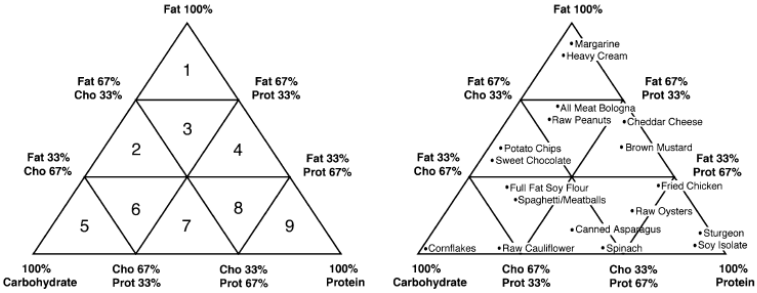
Pemilihan metode yang tepat berhubungan dengan sifat atau karakter dari bahan pangan itu sendiri. Berikut merupakan klasifikasi karakter/ sifat bahan pangan,

- sifat kimia : kandungan senyawa kimia
- sifat mekanika : berhubungan dengan massa-volume, morfometri, struktur, reological, dan bentuk permukaan
- sifat fisika : elektromagnetik, transfer massa, komposisi fisikokimia, kondisi termal, dan termodinamika
- sifat sensorik : warna, aroma, suara, rasa, tekstur
- kemampuan medis : sifat fungsional, nutrisi, toksisitas

Setelah mengetahui karakter atau sifat bahan pangan, seorang analis juga perlu memperhatikan beberapa hal terkait seperti,

- Kemampuan untuk melakukan analisis : jumlah sampel, reagen, instrumen, biaya
- Karakteristik mendasar : presisi, akurasi, sensitivitas, spesifisitas, batas deteksi, dan reproduktifitas
- Masalah personel : K3 (keamanan, kesehatan, kelesamatan) bekerja di laboratorium
- Status metode : metode terstandart atau modifikasi

AOAC *(Association of Official Analytical Chemists)* merupakan organisasi analitik resmi yang berhubungan dengan metode analisis. AOAC menyampaikan adanya "skema segitiga" untuk membagi kategori makanan.



Gambar 2.1. Tata letak skematis matriks makanan berdasarkan kandungan protein, lemak, dan karbohidrat, tidak termasuk kelembaban dan abu. (AOAC International, 1997)

Puncak segitiga berisi kelompok bahan pangan berisi 100% lipid, 100% protein, ataupun 100% karbohidrat. Bahan pangan diberi peringkat "tinggi," "rendah," atau "sedang" berdasarkan kadar lemak, karbohidrat, dan protein, yang merupakan tiga nutrisi diharapkan memiliki efek terkuat pada kinerja metode analitik. Hal ini menghasilkan sembilan kemungkinan kombinasi tinggi, sedang, dan rendah lemak, karbohidrat, dan protein. Bahan pangan kompleks diposisikan secara fraksial di segitiga sesuai dengan kandungan lemak, karbohidrat, dan protein, secara normal (misal, lemak, karbohidrat, dan protein dinormalisasi menjadi total 100%). Metode analisis pangan yang dipilih idealnya akan disesuaikan dengan sembilan kombinasi tersebut namun dengan memetakan posisi dari makanan, seorang analis bisa menggunakan metode untuk bahan tertentu sebagai alternatif analisis bahan yang memiliki nilai nutrisi yang sama. Misal pada penggunaan metode analisis untuk keripik kentang dan coklat, keduanya adalah jenis

bahan pangan yang berbeda namun keduanya memiliki kesamaan yaitu rendah protein, sedang lipid, sedang karbohidrat sehingga metode analisis yang diterapkan pada keripik kentang bisa digunakan untuk analisis coklat.

Terkait validasi metode yang dipilih, banyak faktor yang bisa dijadikan pertimbangan namun akan lebih mudah jika menggunakan *official methods* dari organisasi yang resmi. AOAC Internasional adalah organisasi yang aktif sejak tahun 1884 untuk melayani badan pemerintahan dan juga penelitian tentang metode analisis. Tujuan AOAC menyediakan metode yang tepat dengan tujuan masing-masing analis. Indonesia sendiri memiliki SNI (Standar Nasional Indonesia) dimana di dalamnya terlampir metode yang sesuai untuk tujuan analis tertentu.

Metode uji makanan dan minuman sendiri telah tecantum pada SNI 01-2891-1992. SNI tersebut berisi rancangan standar industri indonesia untuk cara uji makanan dan minuman, bahan tambahan makanan, cemaran logam dan mikroba yang disusun berdasarkan hasil rapat pengurus TTSI makanan dan minuman beserta instansi Departemen Kesehatan, Pusat Pengawasan Obat dan Makanan beserta Departemen Perindustrian, Balai Besar Industri Hasil Pertanian. SNI tersebut disusun berdasarkan :

1) AOAC (Official Methods of Analysis) tahun 1984
2) Pearson's Chemical Analysis of Food tahun 1981
3) Cara Uji Standar Industri Indonesia (SII) untuk komoditi yang bersangkutan
4) Laporan Sidang Pleno IX Panitia Kodek Makanan Indonesia, Departemen Kesehatan tahun 1983
5) ICMSF (International Commision Microbiological

Exmintion of Food tahun 1976

6) Compendium of Methods for the Microbiological Exmintion of Food tahun 1976
7) Standard Methods for Examination of Waternad Wastewater 14th cd, tahun 1975 (APHA-ANWA-WPCF)
8) Hasil-hasil penelitian pengujian.

Setelah metode analisis ditentukan, hal terpenting yang harus diperhatikan adalah pengambilan sampel. Suatu sampel harus bersifat representatif artinya, harus mewakili sifat kesuluran bahan. Sampel harus menggambarkan kebenaran ilmiah, diambil 5-20% dari total bahan, dan diambil saat sampel dalam keadaan homogen. Tahap pengambilan sampel antara lain :

- Pengambilan sampel dari lapangan
- Pengurangan jumlah dan ukuran sampel lapangan menjadi sampel laboratorium
- Pengurangan sampel laboratorium menjadi sampel analitik (tidak semua hasil kegiatan laboratorium diukur, yang diukur adalah sampel analitik)
- Penyimpanan sampel analitik.

Sampel analisis berpotensi mengalami perubahan (reaksi) selama penyimpanan dan ini yang perlu diatasi juga sebagai langkah pencegahan agar sampel tetap bersifat representatif. Perubahan yang dapat terjadi pada sampel antara lain :

- Perubahan kimiawi

  Contoh : oksidasi

  Cara menghindari : sampel disimpan di wadah tertutup, kering, dingin, dan kedap udara

- Perubahan enzimatis

  Cara menghindari : sampel disimpan di dalam freezer

- Perubahan akibat kontaminasi mikroba

  Cara menghindari : sampel disimpan pada suhu rendah, penambahan zat pengawet antimikroba

- Perubahan fisik

  Contoh : penguapan

  Cara menghindari : pengeringan dengan penambahan adorben

- Perubahan mekanis

  Contoh : goncangan

  Cara menghindari : sampel disimpan pada wadah yang kuat.

Setelah melakukan kegiatan analisis maka data yang akan diperoleh dianalisis menggunakan statistika dan ditarik kesimpulan.

Pengambilan dan Preparasi Sampel

Kualitas bahan baku, bahan tambahan, dan produk pangan adalah tujuan utama dalam proses analisis pangan. Pemerolehan data analisis pangan tentunya melewati proses pengambilan sampel (*sampling*) dan preparasi sampel. Sampling yang baik harus memiliki sifat representatif yaitu, mampu mewakili sifat keseluruhan dari bahan yang akan dianalisis.

Langkah pertama dalam prosedur pengambilan sampel adalah menentukan jumlah ulangan dengan memperhatikan

ketersediaan dari sampel tersebut. Setelah pengambilan sampel dilakukan, serangkaian tahap dilakukan antara lain :

- Preparasi sampel (persiapan sampel)
- Analisis Laboratorium
- Interpretasi Data Analisis.

Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam proses preparasi sampel yaitu, pengecilan ukuran sampel, inaktivasi reaksi enzimatis, proteksi dari oksidasi lipid, dan menghindari kontaminasi dari mikrobial. Pengecilan sampel berhubungan dengan usaha menghomogenisasi ukuran sampel dan juga memaksimalkan kontak atau interaksi antara sampel dengan reagen ataupun pelarut yang digunakan dalam proses analis.

Inaktivasi reaksi enzim bisa dilakukan dengan penggunaan suhu beku (-20°C atau -30°C) ataupun pengkondisian suasana pH. Proteksi dari oksidasi sangat penting jika sampel yang dianalisis memiliki kandungan kandungan lipid yang tinggi. Reaksi oksidasi merupakan salah satu penyebab kerusakan sampel yang tinggi lipid sehingga penambahan inhibitor lipid oxidation berupa zat yang memiliki aktivitas antioksidan bisa dilakukan jika proses analisis sampel tersebut membutuhkan waktu yang lama. Kontaminasi mikrobial bisa dilakukan dengan memperhatikan tempat penyimpanan sampel saat kegiatan analisis dilakukan. Hal-hal demikian dilakukan semua untuk menjaga sifat representatif dari suatu sampel agar data yang dihasilkan benar-benar mewakili sifat yang sesungguhnya.

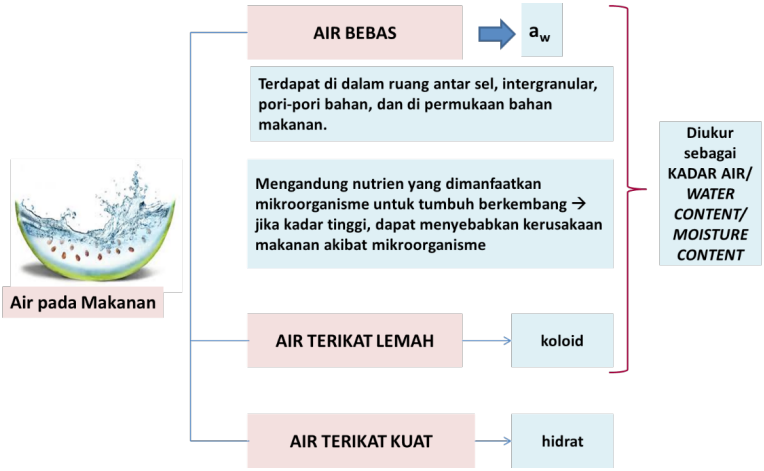
3

Analisis Air

Pendahuluan

Air merupakan kandungan pada bahan pangan yang paling penting karena mempengaruhi penampakan, tekstur, serta cita rasa. Air dalam bahan makanan dibagi menjadi 3 menurut kriteria keterikatannya :

1) Air bebas, terdapat dalam ruang-ruang antar sel dan inter-granular atau pori-pori yang terdapat pada bahan
2) Air yang terikat secara lemah karena terserap (teradsorpsi) pada permukaan koloid makromolekuler seperti protein, pectin, pati, selulosa. Selain itu air juga terdispersi diantara koloid tersebut dan merupakan pelarut zat-zat yang ada dalam sel. Air yang ada dalam bentuk ini masih tetap mempunyai sifat air bebas dan dapat dikristalkan pada proses pembekuan. Ikatan antara air dengan koloid tersebut merupakan ikatann hidrogen.
3) Air dalam keadaan terikat kuat, yaitu membentuk hidrat. Ikatannya bersifat ionik sehingga relatif sulit untuk dihilangkan atau diuapkan. Air ini tidak membeku meskipun pada 0°F, untuk mengeluarkan air ini perlu energi yang besar. Bila air ini dihilangkan, mikroorganisme, reaksi pencoklatan, hidrolisis, oksidasi lemak dapat dikurangi. Jika air ini dihilangkan semuanya, kadar air bahan sekitar 3-7%.



Gambar 3.1 Klasifikasi Air dan Parameter Analisis Air

Hubungan Antara Kadar Air *(Moisture Content)* dengan Aktivitas Air *(Water Activity)*

Pada bagian sebelumnya telah dijelaskan klasifikasi tentang air yaitu, air bebas, air terikat lemah, dan air terikat kuat. Air terikat kuat (hidrat) terikat pada substansi bahan lain pada bahan pangan sehingga tidak bisa dihitung dengan pendekatan *dry* ataupun *wet basis.* Maka, ketika dilakukan perhitungan kadar air sesunggunya yang dihitung adalah air jenis bebas dan air terikat lemah (koloid).

Kadar air suatu bahan dapat dinyatakan dalam dua cara yaitu, berdasarkan bahan kering *(dry basis)* dan berdasarkan bahan basah *(wet basis)*. Kadar air secara *dry basis* adalah perbandingan antara berat air di dalam bahan tersebut dengan berat keringnya. Bahan kering adalah berat bahan asal setelah dikurangi dengan berat airnya. Sedangkan kadar air secara *wet basis* adalah perbandingan antara berat air di dalam bahan tersebut dengan berat bahan mentah.

Contoh :

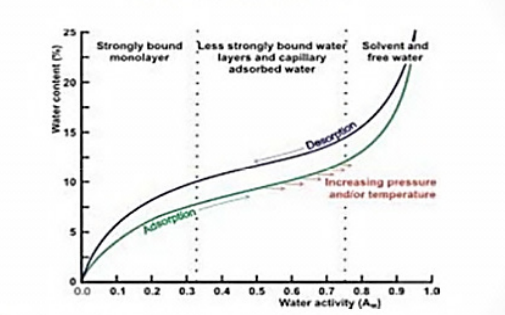
Suatu bahan yang beratnya 20 gram terdiri dari air (W) sebanyak 4 gram dan sisanya berupa bahan kering (D) sebanyak 16 gram. Maka kadar air bahan tersebut dapat dihitung sebagai berikut :

Kadar air *dry basis* = x 100 % = x 100 % = 25%

Kadar air *wet basis* = x 100 % = x 100 % = 20%

Parameter lain selain kadar air adalah aktivitas air *(Activity Water/* A_w*)*. Aktivitas air (A_w) diukur untuk memprediksi masa simpan yang berhubungan dengan kerusakan bahan pangan. Air bebas pastinya berperan pada kerusakan bahan pangan karena tidak terikat pada substansi lain sehingga dapat menyebabkan perubahan mikrobiologis, enzimatik, dan juga kontamin lain. Air jenis lain tidak membantu terjadinya proses kerusakan sehingga A_w hanya teridiri atas kadar air bebas.

Kadar air dinyatakan dalam persen (%) pada kisaran 0-100 sedangkan nilai A_w dinyataan dalam angka desimal pada kisaran skala 0-1,0. Hubungan antara kadar air dan A_w dapat tergambar pada kurva isoterm sorbsi lembab (ISL).



Gambar 3.2 Kurva Isoterm Sorbsi Lembab (ISL)

Setiap bahan bila diletakkan dalam udara terbuka, kadar airnya akan mencapai keseimbangan dengan kelembaban udara

disekitarnya. Kadar air bahan ini disebut kadar air seimbang. Setiap kelembaban relative tertentu dapat menghasilkan kadar air seimbang tertentu pula. Dengan demikian dapat dibuat hubungan antara kadar air seimbang dengan kelembaban relative. Aktivitas air (A_w) dapat dihitung dengan rumus :

Keterangan :

A_w = aktivita air

ERH = Equilibrium Relative Humidity (keseimbangan kelembapan relatif)

Pada kurva tersebut diketahui bahwa kadar air yang sama belum tentu memberikan A_w yang sama, tergantung pada jenis bahannya. Pada kadar air yang tinggi belum tentu memberikan A_w yang tinggi. Hal ini dikarenakan kemungkinan bahan ini disusun oleh bahan-bahan yang mudah mengikat air sehingga air bebas relatif menjadi lebih kecil, akibatnya bahan jenis ini memiliki A_w yang rendah.

Metode Analisis Kadar Air *(Moisture Content)*

Metode analisis kadar air terdapat 4 jenis antara lain :

- Metode pengeringan/ thermogravitasi

  Prinsip metode pengeringan (thermogravitasi) menguapkan air yang ada dalam bahan dengan cara pemanasan. Langkah berikutnya adalah menimbang bahan sampai massa-nya konstan. Ketika massa telah konstan artinya, semua air dalam bahan sudah teruapkan.

- Metode distilasi/ thermovolumetri

  Prinsip metode distilasi adalah menguapkan air dengan

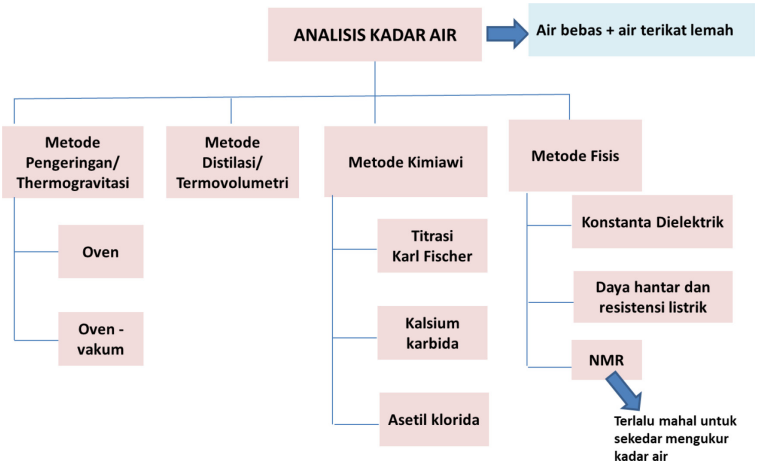
penambahan *carrier solvent* yaitu, pelarut kimia yang mempunyai titik didih lebih tinggi daripada air dan tidak dapat bercampur dengan air, serta mempunyai berat jenis yang lebih rendah daripada air. Zat kimia yang dapat digunakan antara lain : toluene, xylene, benzene, tetrakloroetilen dan xylol.

- Metode kimiawi

  Analisis kadar air dengan metode kimiawi berhubungan dengan metode analisis seperti titrasi dan juga gravimetri (analisis dengan perubahan komponen di dalamnya).

- Metode fisis

  Analisis kadar air dengan metode fisis berhubungan dengan tetapan dielektrik dan konduktivitas litsri. Analisis kadar air dengan metode fisis pada pengaplikasiannya berupa pengukuran menggunakan alat *moistrure meter*.



Gambar 3.3 Skema Metode Analisis Kadar Air

1. **Penentuan Kadar Air Metode Pengeringan (*Thermogravimetry*)**

Metode analisis kadar air dengan metode pengeringan terdiri atas 2 cara yaitu, pengeringan menggunakan oven dan pengeringan menggunakan oven-vakum.

Prinsip metode analisis kadar air dengan metode pengeringan yaitu, perhitungan selisih massa sampel sebelum dan sesudah pengeringan.

A B

Gambar 3.4 A) Oven B) Oven Vakum

- Pengeringan dengan Oven

  Analisis kadar air dengan pengeringan oven memiliki syarat sampel : tidak boleh bersifat *volatile* (mudah menguap) dan tidak tahan terhadap pemanasan 100° C.

  Proses analisis dengan cara ini dihentikan saat diperoleh berat konstran (perbedaan selisih antara penimbangan awal dan akhir tidak lebih dari 0,2 mg).

- Pengeringan dengan Oven-Vakum

  Analisis kadar air dengan pengeringan metode oven-vakum digunakan untul sampel yang *volatile* (mudah menguap) dan

tidak tahan suhu tinggi. Adanya vakum pada oven mampu mengeringkan suatu sampel dengan suhu dan tekanan yang relatif lebih rendah.

Rumus perhitungan metode pengeringan :

Kadar air (%DB) = x 100%

Kadar air (%WB) = x 100%

% Total bahan padat = x 100%

Keterangan :

DB = *Dry Bulb* (basis kering)

WB = *Wet Bulb* (basis basah)

W_1 = massa sampel awal

W_2 = massa sampel akhir (setelah pengeringan)

W_3 = selisih massa awal dan akhir

Metode pengeringan sangat sederhana meski demikian metode ini memiliki kelemahan. Kelemahan metode pengeringan yaitu,

- Bahan lain disamping air juga ikut menguap dan ikut hilang bersama dengan uap air, misalnya alkohol, asam asetat, minyak atsiri, dan lain-lain
- Dapat terjadi reaksi selama pemanasan yang menghasilkan air atau zat mudah menguap yang lain. Contoh gula mengalami dekomposisi atau karamelisasi, lemak mengalami oksidasi, dan sebagainya
- Bahan yang mengandung bahan yang dapat mengikat air secara kuat sulit melepaskan airnya meskipun sudah dipanaskan

Untuk mempercepat penguapan air serta menghindari terjadinya reaksi yang menyebabkan terbentuknya air ataupun reaksi yang lain karena pemanasan maka dapat dilakukan pemanasan dengan suhu rendah dan tekanan vakum. Dengan demikian akan diperoleh hasil yang lebih mencerminkan kadar air sebenarnya.

Untuk bahan-bahan yang mempunyai kadar gula tinggi, pemanasan dengan suhu ± 100°C dapat mengakibatkan terjadinya karamelisasi. Suatu bahan yang telah mengalami pengeringan ternyata lebih bersifat higroskopis daripada bahan asalnya, oleh karena itu selama pendinginan sebelum penimbangan, bahan selalu ditempatkan dalam ruang tertutup yang kering, misalnya dalam desikator atau eksikator yang telah diberi zat penyerap air. Penyerap air/uap air ini dapat menggunakan kapur aktif, asam sulfat, silica gel, aluminium oksida, kalium klorida, kalium hidroksida, kalsium sulfat atau barium oksida. Silica gel yang digunakan sering diberi warna guna memudahkan apakah bahan tersebut sudah jenuh dengan air atau belum. Bila sudah jenuh akan berwarna merah muda dan bila dipanaskan menjadi kering dan kembali berwarna biru.

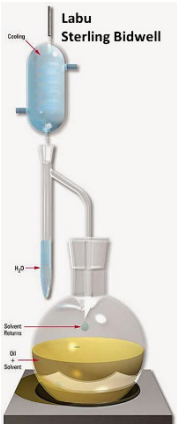
2. Penentuan Kadar Air Metode Distilasi *(Thermovolumetry)*

Analisis kadar air dengan metode distilasi memiliki prinsip dasar distilasi azeotrop. Azeotrop adalah campuran dari dua atau lebih komponen yang memiliki titik didih yang konstan. Distilasi air mampu memisahkan air dari sampel dengan menambahkan pelarut yang tidak dapat bercampur dengan air *(immiscible with water)*, memiliki titik didih lebih tinggi dibanding air, dan memiliki berat jenis lebih rendah dibanding air. Pelarut yang ditambahkan adalah toluen, xylen, dan benzena. Metode ini cocok untuk sampel yang mengandung lemak dan bersifat *volatile* (menguap). Keuntungan metode ini yaitu,

- Dapat digunakan untuk menentukan kadar air dari bahan yang memiliki kandungan air relatif sedikit

- Penentuan kadar air memerlukan waktu yang relatif singkat (1 jam)
- Dapat digunakan untuk menghindari oksidasi senyawa lipid dan dekomposisi gula dari suatu sampel.

Cara penentuannya adalah dengan memberikan zat kimia sebanyak 75-100 mL pada sampel yang diperkirakan mengandung air sebanyak 2-5 mL, kemudian dipanaskan sampai mendidih. Uap air dan zat kimia tersebut diembunkan dan ditampung dalam tabung penampung. Karena berat jenis air lebih besar daripada zat kimia tersebut, maka air akan berada di bagian bawah ada tabung penampung. Bila pada tabung penampung dilengkapi skala maka banyaknya air dapat diketahui langsung. Alat yang dipakai sebagai penampung antara lain tabung Stark-Dean dan Sterling-Bidwell atau modifikasinya (Gambar 8).



Gambar 3.5 Labu Sterling Bidwell

Cara distilasi ini baik untuk menentukan kadar air dalam zat yang kandungan airnya kecil yang sulit ditentukan dengan cara thermogravimetry. Penentuan kadar air cara ini hanya memerlukan waktu ± 1 jam. Dengan cara distilasi, terjadinya oksidasi senyawa

lipid maupun dekomposisi kimia senyawaan gula dapat dihindari, sehingga penentuannya lebih cepat.

Untuk bahan yang mengandung gula dan protein yang tinggi sering ditambahkan serbuk asbes ke dalam bahan. Hal ini untuk mencegah terjadinya superheating yang dapat menimbulkan dekomposisi bahan tersebut. Untuk memperluas permukaan kontak dengan cairan kimia yang digunakan dan memperlancar terjadinya distilasi dapat ditambahkan tanah diatome pada bahan yang telah ditumbuk halus sebelum distilasi.

Prosedur Penentuan Kadar Air Metode Destilasi Toluena

- Timbang bahan padat yang telah dipotong-potong kecil atau berupa serbuk, secukupnya yang kurang lebih mengandung 2-5 mL air, dan pindahkan ke dalam labu destilasi. Tambahkan kurang lebih 75-100 mL toluene atau xylen dan pasang labu destilasi pada alat destilasi khusus dengan penampung air yang menguap
- Atur pemanasan destilasi sampai kira-kira 4 tetes toluene jatuh dari kondensor setiap detik
- Lanjutkan distilasi sampai semua air menguap dan air dalam penampung tidak bertambah lagi (lebih kurang 1 jam)
- Bacalah volume air dan hitung % air dari berat contoh

Perhitungan :

$$\text{Kadar air } (\%) = \frac{volume\ \ air\ \ (mL)}{massa\ \ sampel\ \ (g)} \text{ x } 100\%$$

3. Penentuan Kadar Air Metode Kimia

Terdapat beberapa cara penentuan kadar air dengan metode kimia, yaitu antara lain :

a. Cara Titrasi Karl Fischer

Cara ini adalah dengan menitrasi sampel dengan larutan Iodine dalam methanol. Reagen lain yang dapat digunakan dalam titrasi adalah sulfur dioksida dan piridin. Methanol dan piridin digunakan untuk melarutkan iodine dan sulfur dioksida agar reaksi dengan air menjadi lebih baik. Selain itu piridin dan methanol akan mengikat asam sulfat yang terbentuk sehingga titik akhir titrasi akan lebih jelas dan tepat. Selama masih ada air dalam bahan, iodine akan bereaksi, tetapi begitu air habis maka iodine akan bebas. Pada saat timbul warna iodine bebas ini, titrasi dihentikan. Iodine bebas akan memberikan warna kuning kecoklatan. Untuk memperjelas pewarnaan ditambahkan metilen blue dan akhir titrasi akan memberikan warna hijau.

Gambar 3.6 Titrasi Karl Fischer

Tahapan reaksi yang terjadi dapat dituliskan sebagai berikut :

$$I_2 + SO_2 + 2\,C_6H_5N \text{ à } C_6H_5N.I_2 + C_6H_5N.SO_2$$
$$C_6H_5N.I_2 + C_6H_5N.SO_2 + C_6H_5N + H_2O \text{ à } 2\,(C_6H_5N.HI) + C_6H_5N.SO_3$$
$$C_6H_5N.SO_3 + CH_3OH \text{ à } C_6H_5N(H)SO_4CH_3$$

Dalam pelaksanaannya, titrasi harus dilakukan dengan kondisi bebas dari pengaruh kelembaban udara. Untuk keperluan tersebut dapat dilakukan dalam ruang tertutup. Cara titrasi Karl Fischer ini telah berhasil digunakan untuk penentuan kadar air dalam alkohol, ester-ester, senyawa lipid, lilin, pati, tepung gula, madu dan bahan makanan yang dikeringkan. Cara ini banyak dipakai karena memberikan harga yang tepat untuk dikerjakan cepat. Tingkat ketelitiannya lebih kurang 0,5 mg dan dapat ditingkatkan lagi dengan sistem elektroda yaitu dapat mencapai 0,2 mg.

b. Cara Kalsium Karbid

Cara ini berdasarkan reaksi antara kalsium karbid dan air menghasilkan asetilen. Cara ini sangat cepat dan tidak memerlukan alat yang rumit. Jumlah asetilen yang terbentuk dapat diukur dengan berbagai cara :

1. Menimbang campuran bahan dan karbid sebelum dan sesudah reaksi ini selesai. Kehilangan bobotnya merupakan berat asetilen
2. Mengumpulkan gas asetilen yang terbentuk dalam ruangan tertutup dan mengukur volumenya. Dengan volume yang diperoleh tersebut dapat diketahui banyaknya asetilen dan kemudian dapat diketahui kadar air bahan
3. Dengan mengukur tekanan gas asetilen yang terbentuk jika reaksi dikerjakan dalam ruang tertutup. Dengan mengetahui

tekanan dan volume asetilen dapat diketahui banyaknya dan kemudian dapat diketahui kadar air bahan

4. Dengan menangkap gas asetilen dengan larutan tembaga, sehingga dihasilkan tembaga asetilen yang dapat ditentukan secara gravimetric atau volumetric auat secara kolorimetri.

Reaksi yang terjadi selama pencampuran dapat dituliskan sebagai berikut

$$CaC_2 + H_2O \rightarrow CaO + C_2H_2$$

Tiap 1 Grol gas asetilen berasal dari 1 Grol air. Volume 1 grol gas asetilen dianggap sama dengan gas ideal, yaitu 22,4 L. Ketelitiannya tergantung pada pencampuran atau interaksi karbid dengan bahan. Cara tersebut telah berhasil untuk kadar air dalam tepung, sabun, kulit, biji vanili, mentega dan buah. Penentuan kadar air metode ini dapat dilakukan dalam waktu berkisar 10 menit.

c. Cara Asetil Klorida

Penentuan kadar air cara ini berdasarkan reaksi asetil klorida dan air menghasilkan asam yang dapat dititrasi menggunakan basa. Asetil klorida yang digunakan dilarutkan dalam toluol dan bahan didispersikan dalam piridin. Reaksi yang terjadi dapat dituliskan sebagai berikut :

$$H_2O + CH_3COCl \rightarrow CH_3COOH + HCl$$

Cara ini telah berhasil dengan baik untuk penentuan kadar air dalam bahan minyak, mentega, margarine, rempah-rempah dan bahan-bahan yang berkadar air sangat rendah.

4. Penentuan Kadar Air Metode Fisika

Ada beberapa cara penentuan kadar air metode fisika, antara lain :

a. Penentuan Kadar Air berdasarkan Tetapan Dielektrikum

Air memiliki tetapan dielektrikum sebesar 80. Zat-zat lain memiliki tetapan yang tertentu pula, missal karbohidrat dan protein lebih kecil dari 10, methanol sebesar 33, etanol sebesar 24, aseton sebesar 21,4, benzene sebesar 2,3 dan heksana sebesar 1,9. Konstanta dielektrikum dapat dituliskan rumusnya sebagai berikut :

$$D = \frac{e_1 e_2}{F.r^2}$$

F : daya tarik-menarik antara dua ion yang berlawanan
E1 dan E2 : muatan ion-ion
R : jarak antara dua ion

Untuk mengetahui kadar air bahan diperlukan adanya kurva standar yang melukiskan hubungan antara kadar air dan tetapan dielektrikumnya dari bahan yang diselidiki. Dengan mengetahui tetapan dielektrikum bahan sejenis akan dapat dihitung kadar air bahan tersebut.

Gambar 3.7 Alat Pengukuran Tetapan Dielektrikum

b. Penentuan Kadar Air berdasarkan Konduktivitas Listrik

Air merupakan penghantar listrik yang baik. Bahan yang mempunyai kandungan air yang besar akan mudah menghantarkan listrik, atau mempunyai resistensi yang relative kecil. Suatu zat dilalui aliran listrik, maka apabila diketahui suatu grafik yang menggambarkan hubungan-hubungan antara kadar air dan resistensinya, maka bila diketahui resistensi bahan sejenis akan dapat dihitung kadar air bahan tersebut.

Contoh : bahan gandum berkadar air 13 % akan mempunyai resistensi hamper tujuh kali daripada resistensi gandum yang berkadar air 14 persen.

Alat yang digunakan untuk mengukur kadar air bahan sejenis ini disebut resistensi meter atau moisture tester. Perlu diingat bahwa konduktivitas bahan dapat berubah karena perubahan temperature. Makin tinggi suhu konduktivitasnya makin besar atau resistensinya makin kecil. Untuk pengukuran yang tepat perlu diberikan koreksi terhadap data yang diperoleh pada suhu tersebut. Biasanya skala yang tercantum dalam alat sudah diubah langsung dan dapat menunjukkan kadar air suatu bahan.

Rekomendasi Metode Analisis Air
Metode analisis air memang sangat banyak namun pada buku ini disertakan metode apa yang sebaiknya dipilih.
Perlu diingat bahwa dalam memilih metode kita perlu memutuskan terlebih dahulu apa tujuan dari kegiatan analisis yang akan dilakukan. Tujuan analisis hanya ada dua yaitu, analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif bertujuan untuk menentukan jenis atau mengidentifikasi keberadaan senyawa penyusunnya. Telah dijelaskan sebelumnya bahwa jenis air ada 3 yaitu, air bebas, terikat lemah, dan terikat kuat. Analisis kualitatif untuk air tidak pernah dilakukan untuk mengidentifikasi jenis tersebut sehingga tujuan analisis air sangat spesifik dan khusus untuk tujuan kuantitatif yaitu perhitungan kadar air.

Metode pengukuran kadar air yang sering digunakan yaitu :

- pengeringan dengan oven
- distilasi
- menggunakan alat moisture meter

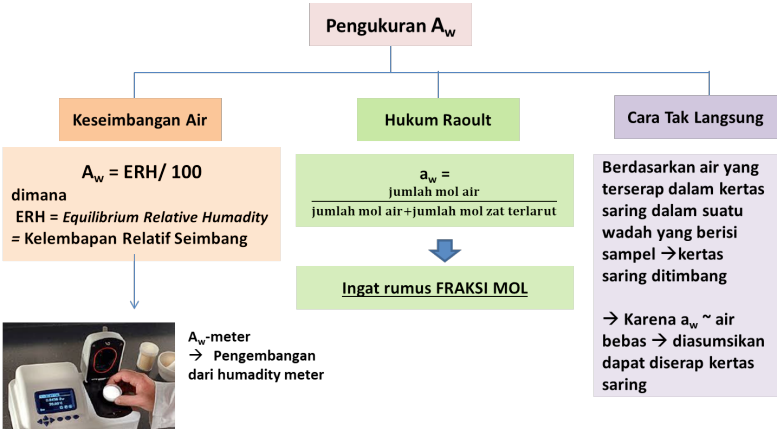
Lalu bagaimana menentukannya?

- Sampel yang kadar airnya tinggi maka, metode pengukuran kadar air yang bisa digunakan adalah pengeringan dengan oven. Perhatikan betul ketika metode pengeringan dengan oven, penggunaan desikator pada saat transisi (setelah sampel dikeluarkan dari oven dan ditimbang masa akhirnya) harus konstan.
- Sampel yang kadar airnya kecil lebih cocok menggunakan metode distilasi. Hal ini berhubungan dengan lebih mudahnya mengukur selisih air yang terbawa oleh pelarut saat distilasi dibandingkan dengan mengukur selisih kadar air jika menggunakan metode pengeringan oven.
- Sampel yang memiliki kandungan senyawa volatil tinggi, lebih cocok dianalisis kadar airnya dengan distilasi. Jika dipaksakan dengan metode pengeringan, dikhawatirkan massa selisih adalah simbangsih senyawa volatil yang ikut hilang saat pemasan (bukan murni kadar air sesungguhnya)
- Penggunakan alat moisture meter sangat mudah dan jika dimiliki oleh suatu laboratorium, tentunya alat ini adalah metode paling praktis untuk dipilih. Sampel yang akan diukur kadar airnya dengan moiture meter, sebaiknya dilihat karakter wujudnya untuk meyesuaikan jenis (spec) dari moisture meter yang akan digunakan. Perhatikan jika sampel berwujud gel, serbuk, ataupun cairan.

Analisis Aktivitas Air (A_w)

Secara definisi, $Aw = \frac{P}{P0}$ dimana P adalah tekanan uap air di dalam zat dan P_0 adalah tekanan uap murni pada temperatur yang sama. Nilai A_w menunjukkan kemampuan air dalam

proses-proses kerusakan bahan makanan. Pengukuran Aw yang direkomendasikan adalah menggunakan Aw meter.



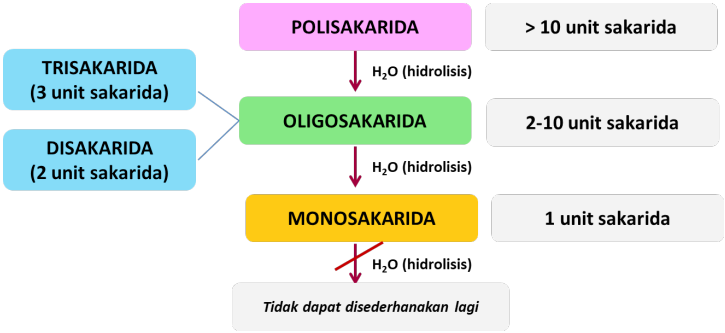
Gambar 3.8 Skema Klasifikasi Metode Analisis A_w

4

Analisis Karbohidrat

Pendahuluan

Karbohidrat merupakan polihidroksi aldehida atau polihidroksi keton, atau turunan senyawa-senyawa tersebut. Karbohidrat banyak terdapat dalam bahan nabati, baik berupa gula sederhana seperti heksosa, pentosa dan karbohidrat dengan berat molekul yang tinggi seperti pati dan pektin. Pada umumnya buah-buahan mengandung monosakarida seperti fruktosa dan glukosa. Disakarida banyak terdapat pada batang tebu dalam air susu (laktosa). Beberapa oligosakarida terdapat pada roti dan bir, sedangkan polisakarida seperti pati banyak terdapat pada serealia dan umbi-umbian.



Gambar 4.1 Skema Klasifikasi Karbohidrat

Secara alami ada tiga bentuk senyawa karbohidrat yang terpenting yaitu monosakarida, disakarida, oligosakarida, polisakarida. "Sakarida" artinya gula sehingga istilah polisakarida, oligosakarida, disakarida, dan monosakarida merujuk pada

jumlah unit gula penyusunnya. Polisakarida terdiri atas lebih dari 10 unit sakarida. Polisakarida dapat mengalami hidrolisis (pemecahan menjadi bagian penyusunnya yang lebih sederhana) menjadi oligisakarida. Oligisakarida adalah karbohidrat yang terdiri aras 2-10 unit. Trisakarida sendiri terdiri atas 3 unit sakarida sedangkan disakarida terdiri atas 2 unit gula. Monosakarida adalah karbohidrat yang paling sederhana dan tidak bisa dihidrolisis lebih lanjut.

Monosakarida adalah satuan karbohidrat yang sederhana, yang tak dapat dihidrolisis menjadi molekul karbohidrat yang lebih kecil. Monosakarida juga digolongkan berdasarkan jumlah atom karbon yang dimilikinya antara lain adalah triosa (mengandung 3 atom karbon), tetrosa (empat atom karbon), pentosa (lima atom karbon) dan seterusnya.

Penggolongan Monosakarida → **Berdasarkan jumlah atom karbon dan gugus fungsi utama yang dimiliki (aldehida*/ keton**)**

↓

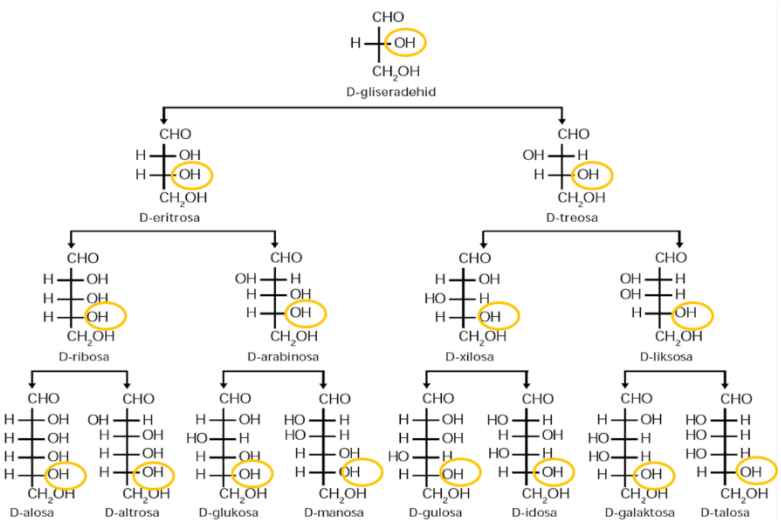
ALDOSA = monosakarida yang memiliki gugus ALDEHIDA
KETOSA = monosakarida yang memiliki gugus KETON

Jumlah atom C	Aldosa	Ketosa
3 (triosa)	Aldotriosa	Ketotriosa/ triulosa
4 (tetrosa)	Aldotetrosa	Ketotetrosa/ tetrulosa
5 (pentosa)	Aldopentosa	Ketopentosa/ pentulosa
6 (heksosa)	Aldoheksosa	Ketoheksosa/ heksulosa
7 (heptosa)	Aldoheptosa	Ketoheptosa/ heptulosa

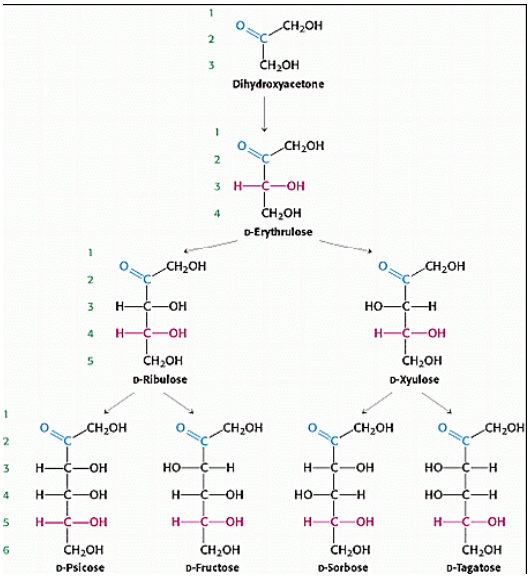
*Gugus Aldehida : -CHO

**Gugus keton : -C=O

Gambar 4.2 Skema Klasifikasi Monosakarida



Gambar 4.3 Skema Golongan Monosakarida Aldosa

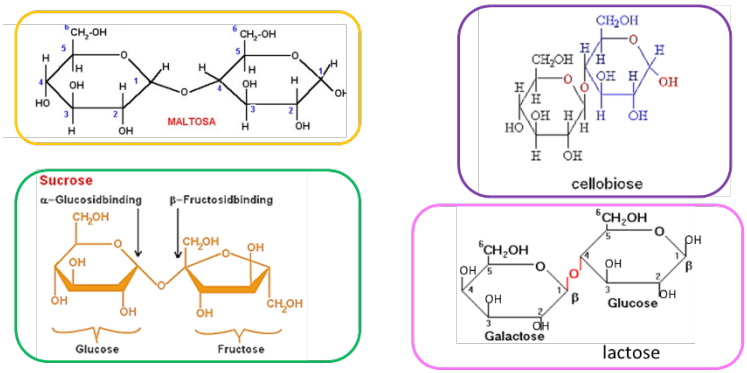


Gambar 4.4 Skema Golongan Monosakarida Ketosa

Disakarida adalah suatu karbohidrat yang tersusun dua satuan monosakarida yang dipersatukan oleh suatu hubungan glikosida pada karbon 1 dari satu satuan ke suatu OH satuan lain. Suatu cara ikatan yang lazim ialah suatu hubungan glikosida α atau β dari satuan pertama ke gugus 4-hidroksil dari satuan kedua. Hubungan ini disebut suatu ikatan 1,4'-α atau 1,4'-β, bergantung pada stereokimia pada karbon glikosida. Beberapa contoh disakarida adalah maltosa, selobiosa dan sukrosa. Disakarida adalah gabungan dari dua molekul monosakrida. Disakarida yang penting dalam ilmu pangan adalah sukrosa, maltosa dan laktosa.

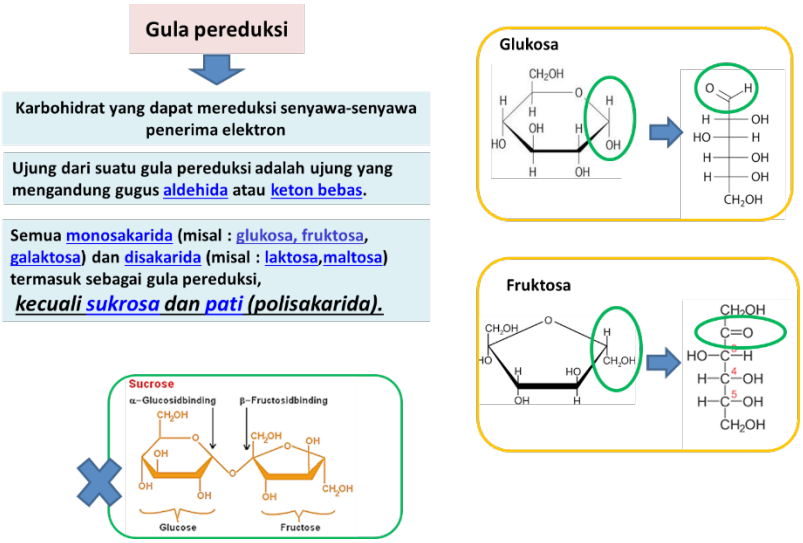
Contoh disakarida yang sering ditemui di bahan pangan antara lain sukrosa, maltosa, dan laktosa. Sukrosa adalah gula yang dihasilkan dari tebu atau bit, yang lebih dikenal dengan sebutan gula pasir. Sukrosa adalah gula non pereduksi (ditandai dengan analisis hasil negative uji larutan Fehling dan Tollens). Maltosa adalah disakarida yang disusun oleh glukosa dan glukosa. Maltosa disebut juga dengan gula gandum. Tingkat kemanisan maltosa hanya 0,33 kali dari gula putih. Enzimnya adalah maltase. Maltosa merupakan gula reduksi (ditunjukkan dengan kemampuannya dapat mereduksi larutan Fehling dan Tollens). Laktosa merupakan gula susu dan merupakan gula pereduksi (positif uji Fehling dan Tollens). Laktosa juga mudah mengalami hidrolisis dalam suasana asam, atau dengan enzim laktase membentuk galaktosa dan glukosa.

Nama	Unit penyusun	Ikatan
Maltosa	Glukosa + Glukosa	Mata rantai α, 1→ 4'
Selobiosa	Glukosa + Glukosa	Mata rantai β, 1→ 4'
Sukrosa	Glukosa + Fruktosa	C-1 glukosa → C-1 fruktosa
Laktosa	D-galaktosa + D-glukosa	Mata rantai β, 1 → 4'



Gambar 4.5 Skema Klasifikasi Disakarida

Terkait sifat pereduksi, karbohidrat yang dapat mereduksi senyawa-senyawa penerima elektron pasti merupakan gula pereduksi. Sifat tersebut berhubungan dengan ujung dari suatu gula pereduksi yang mengandung gugus aldehida dan keton bebas. Semua monosakarida (seperti glukosa, fruktosa, galaktosa, dll) dan disakarida (seperti laktosa, maltosa, dll) termasuk gula pereduksi, kecuali sukrosa dan pati (polisakarida).



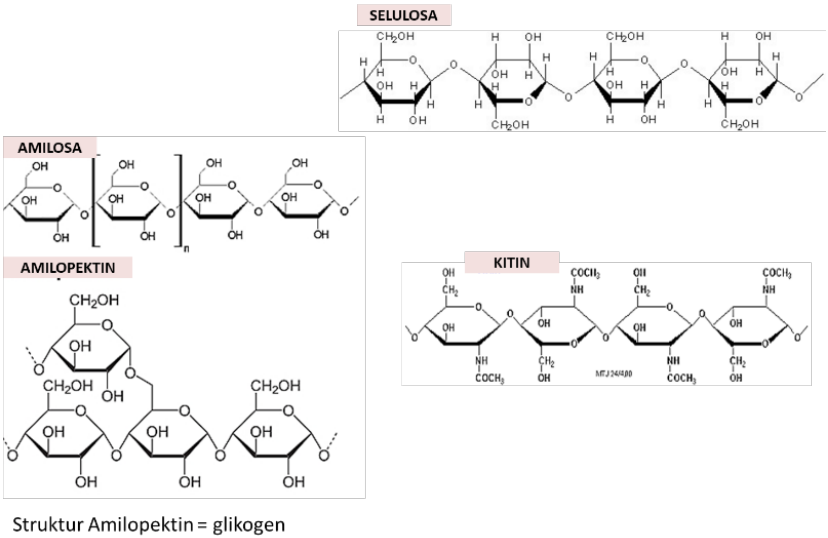
Gambar 4.6 Skema Penjelasan tentang Gula Pereduksi

Polisakarida adalah karbohidrat yang tersusun dari banyak monosakarida yang dipersatukan dengan ikatan glukosida. Hidrolisis lengkap akan mengubah suatu polisakarida menjadi monosakarida. Polisakarida memenuhi tiga maksud dalam kehidupan yaitu sebagai: a) bahan bangunan, b) bahan makanan, c) sebagai zat spesifik. Polisakarida sebagai bahan banguna misalkan selulosa, yang memberikan kekuatan pada pokok kayu dan dahan bagi tumbuhan, dan kitin sebagai struktur kerangka luar serangga.

No.	Nama	Unit penyusun	Ikatan
1.	Amilum		Mata rantai α
	a. Amilosa	Rantai tak bercabang dari glukosa	α, 1 → 4'
	b. Amilopektin	Rantai bercabang (α, 1 → 6')	α, 1 → 4'
2.	Glikogen	Struktur sama dengan amilopektin Rantai bercabang (α, 1 → 6')	α, 1 → 4'
3.	Selulosa	Rantai tak bercabang	Mata rantai β, 1→ 4'
4.	Kitin	Hampir sama strukturnya dengan selulosa, namun kitin = poli dari *N*-asetilglukosamina	Mata rantai β, 1→ 4'

Tabel 4.1. Skema Klasifikasi Polisakarida

Polisakarida merupakan polimer dari monosakarida yang tersusun dalam rantai bercabang atau lurus. Polisakarida ialah karbohidrat dimana molekulnya apabila dihidrolisa menghasilkan banyak sekali monosakarida. Polisakarida juga biasa disebut sebagai glikan. Berdasarkan unit pembentuknya, glikan terbagi menjadi 2 kelompok : homoglikan (selulosa, pati, amilopektin) dan heteroglikan (algin, guar gum). Polisakarida yang sering digunakan dalam industri pangan adalah agar, alginate, carragenan, LBG, pektin, CMC, modified starch dan xanthan gum. Sifat polisakarida adalah sukar larut dalam air, larutannya dalam air berupa koloid dan rasanya tidak manis, sering juga disebut bukan gula. Contohnya amilum yang berasal dari pati dan selulosa yang berasal dari tumbuh-tumbuhan.



Gambar 4.7 Struktur Polisakarida

Polisakarida dalam bahan makanan berfungsi sebagai penguat tekstur (selulosa, hemiselulosa, pektin, lignin) dan sebagai sumber energy (pati, dekstrin, glikogen, fruktan). Polisakarida penguat tekstur ini tidak dapat dicerna oleh tubuh, tetapi merupakan serat-serat (dietary fiber) yang dapat menstimulasi enzim-enzim pencernaan. Menurut jenis monosakaridanya dikenal pentosan dengan unit-unit pentosa dan heksosan dengan monomer heksosa. Beberapa poliskarida mempunyai nama kebiasaan (trivial) yang berakhiran "in" misalnya : kitin, dekstrin, dan pektin.

Analisis Karbohidrat pada Bahan Pangan

Sebelum dilakukan analisis, terdapat tiga tujuan berdasarkan teknologi pangan, ilmu gizi, dan bioteknologi. Tujuan analisis karbohidrat pada bahan pangan dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Tujuan Analisis Karbohidat pada Bahan Pangan

Teknologi pangan	Ilmu Gizi	Bioteknologi
Menentukan komposisi karbohidrat suatu makanan	Analisis kandungan karbohidrat pada makanan untuk mencegah penyakit diabetes, karies gigi, obesitas	Menentukan jenis dan perubahan kimia pada karbohidrat selama proses fermentasi
Menentukan sifat fisika/ kimia dari komposisi karbohidrat yang terkandung di dalam makanan	Analisis kandungan serat kasar dalam pencernaan untuk diet	Analisis karbohidrat untuk menentukan kondisi optimal pengolahan produk bioteknologi
Meneliti hubungan karbohidrat yang terkandung dengan kekentalan, kelekatan, stabilitas larutan, dan tekstur hasil olahan bahan makanan		

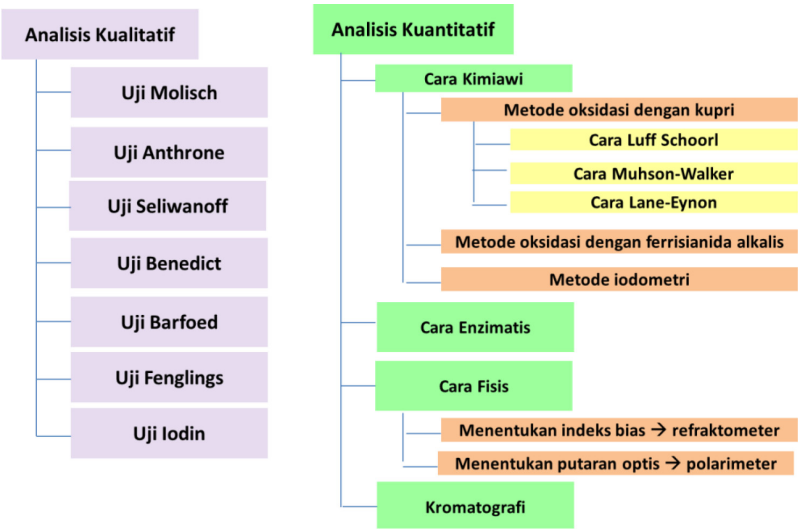
Sebelum dilakukan analisis karbohidrat, bahan pangan harus dipreparasi terlebih dahulu untuk menghilangkan zat-zat lain selain karbohidrat yang mengganggu proses analisis.

1) Penggilingan sampel untuk menghaluskan sampel
2) Ekstraksi degan eter untuk menghilangkan lipid (lemak dan turunannya) dan klorofil (jika berasa dari daun dan sebagainya).
   - Ekstraksi dengan eter dilakukan pada < 50° C (karbohidrat tidak larut jika suhu < 50° C)
   - Ditambahkan basa kalsium karbohidrat ($CaCO_3$) untuk menghindari terjadinya hidrolisis oleh asam-asam organik yang terdapat dalam bahan pangan
   - Jika pada sampel mengandung enzim yang dapat menghidrolisis karbohidrat, ditambahkan etanol 80% atau sampel dipanaskan selama 30 menit.
3) Penjernihan larutan sampel untuk pengendapan protein,

asam amino, tanin, asam-asam organik

- Ditambahkan senyawa adsorban dari kompleks logam berat untuk mengedapkan zat selain karbohidrat dan gula (sakarida)
- Adsorban atau penjernih yang biasa digunakan adalah timbal asetat
- Jika timbal asetat berlebih, dapat dihilangkan dengan penambahan natrium fosfat (Na_3PO_4), kalium oksalat ($K_2C_2O_4$), natrium karbonat (Na_2CO_3).

Analisis karbohidrat terbagi menjadi dua tujuan yaitu, analisis kualitatif dan analisis kuantitatif. Analisis kualitatif untuk menentukan jenis karbohidrat sedangkan analisis kuantitatif untuk menentukan kadar/ jumlah karbohidrat pada bahan pangan. Metode analisis karbohidrat dapat dilihat pada Gambar 20.

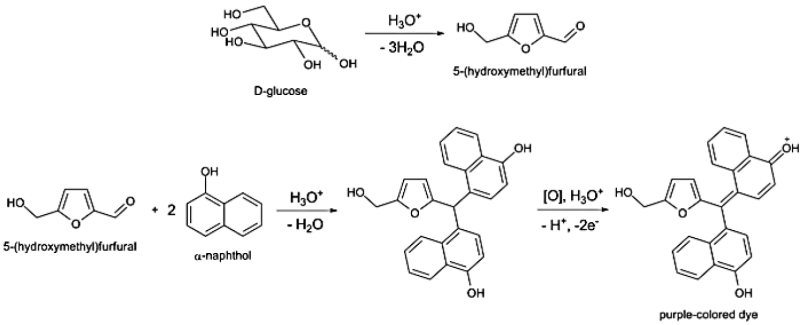


Gambar 4.8 Metode Analisis Karbohidrat

Analisis Kualitatif Karbohidrat

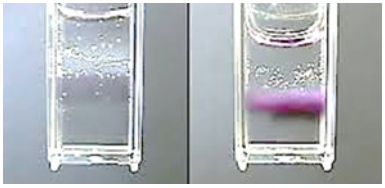
1) **Uji Molisch**

Uji Molisch bertujuan untuk menentukan keberadaan



Gambar 4.9 Persamaa Reaksi Uji Molisch

Hasil uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu (artinya mengandung karbohidrat). Hasil uji negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna ungu (artinya tidak mengandung karbohidrat).

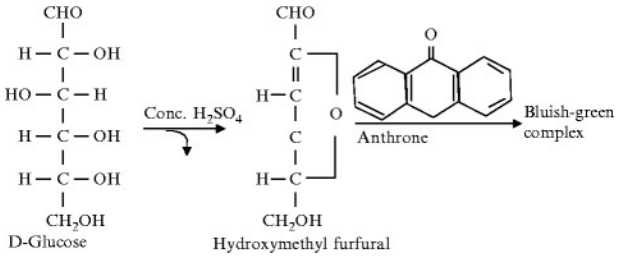


Gambar 4.10 Hasil negatif dan positif Uji Molisch

2) **Uji Anthrone**

Tujuan uji anthrone untuk mengetahui keberadaan karbohidrat pada sampel. Prinsip uji anthrone (hampir sama dengan Uji Molisch) yaitu, karbohidrat dihirolisis oleh asam sulfat (H_2O) menjadi monosakarida.

Monosakarida yang terbentuk bereaksi lebih lanjut dengan asam sulfat sehingga mengalami dehidrasi ($-H_2O$) menjadi furfural ataupun metilfurfural. Furfural ataupun metil furfural bereaksi dengan reagen anthrone (9,10-dihidroksi-9-oksoanthrasen) membentuk senyawa kompleks biru kehijauan.



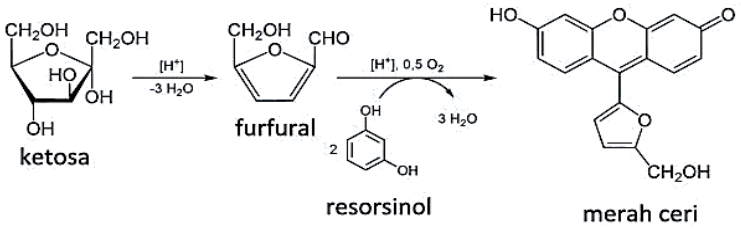
Gambar 4.11 Persamaa Reaksi Uji Anthrone

Hasil positif ditunjukkan dengan warna biru kehijauan (terbukti mengandung karbohidrat), hasil negatif tampak melalui tidak munculnya biru kehijauan (tidak mengandung karbohidrat).

Gambar 4.12 Hasil negatif dan positif Uji Anthrone

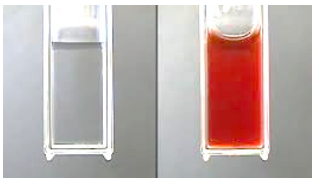
3) **Uji Seliwanoff**

Tujuan untuk membedakan jenis monosakarida ketosa dan mono sakarida aldosa. Prinsip uji seliwanoff yaitu terjadinya Reaksi dehidrasi monosakarida ketosa menjadi furfural lebih cepat dibandingkan dehidrasi monosakarida aldosa. Karena urutan hidrolisis ketosa menjadi aldosa (menggunakan HCl 12% dan CH_3COOH yang kekuatan asamnya lebih rendah dibanding H_2SO_4) sehingga monosakarida aldosa akan bereaksi negatif dengan reagen Seliwanoff.



Gambar 4.13 Persamaa Reaksi Uji Seliwanoff

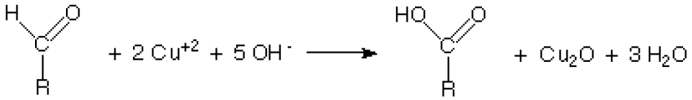
Tampak pada persamaan reaksi tersebut : Furfural bereaksi dengan resorsinol menghasilkan kompleks warna merah. Hasil menunjukkan hasil positif dengan adanya tanda merah (artinya menganding monosakarida ketosa), hasil negatif dengan tidak adanya warna merah (artinya mengandung monosakarida aldosa).



Gambar 4.14 Hasil Negatif dan Positif Uji Seliwanoff

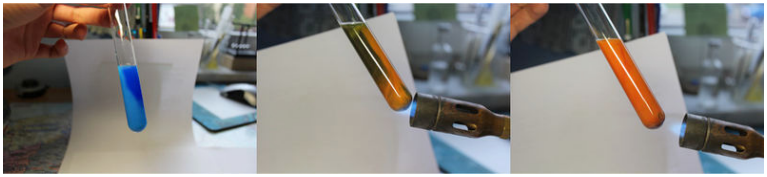
4) **Uji Benedict**

Tujuan untuk mengidentifikasi adanya gula pereduksi (yang memiliki gugus aldehida/ keton bebas). Prinsipnya yaitu Gula pereduksi mengalami reaksi redoks dengan reagen Benedict (campuran kuprisulfat, natrium sitrat, dan natrium karbonat) menghasilkan endapan merah dari kuprooksida.



Gambar 4.15 Persamaa Reaksi Uji Benedict

Hasil positif uji Benedict ditunjukkan dengan munculnya endpan merah (artinya merupakan gula pereduksi). Hasil negatif dengan tidak munculnya endapan merah (bukan merupakan gula pereduksi).



Gambar 4.16 Hasil uji positif benedict tampak dengan adanya endapan merah

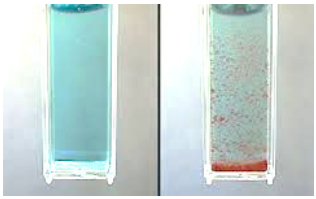
5) **Uji Barfoed**

Tujuan untuk membedakan antara gula pereduksi monosakarida dan gula pereduksi disakarida. Prinsipnya Gula pereduksi monosakarida bereaksi dengan reagen barfoed (campuran kupri asetat dan asam asetat) sehingga menghasilkan endapan merah kuprooksida. Gula pereduksi disakarida memberikan hasil negatif karena bereaksi lambat dengan reagen Barfoed. Lambatnya reaksi dari gula pereduksi disakarida tersebut disebabkan karena disakarida harus mengalami transformasi terlebih dahulu (dengan penambahan asam) menjadi monosakarida untuk bereaksi dengan reagen Barfoed.

$$RCHO + 2Cu^{2+} + 2H_2O \rightarrow RCOOH + Cu_2O\downarrow + 4H^+$$

Gambar 4.17 Persamaa Reaksi Uji Barfoed

Hasil positif uji barfoed tampak pada munculnya endapan merah (artinya mengandung jenis gula pereduksi monosakarida) dan hasil negatif dengan tidak muncul endapan merah

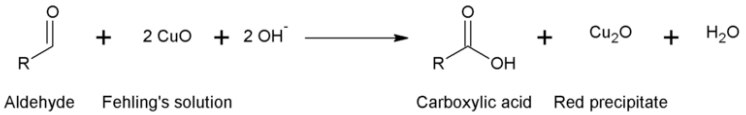


Gambar 4.18 Hasil Postif Uji Barfoed dengan Munculnya Endapan Merah

6) **Uji Fehlings**

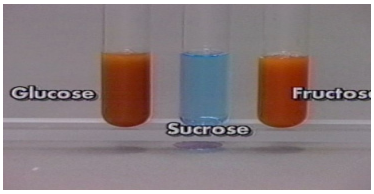
Tujuan Uji Fehlings yaitu, mengidentifikasi adanya gula pereduksi. Prinsip uji tersebut yaitu, Pereaksi Fehling

terdiri dari dua bagian, yaitu Fehling A dan Fehling B. Fehhling A adalah larutan $CuSO_4$, sedangkan Fehling B merupakan campuran larutan NaOH dan kalium natrium tartrat. Pereksi Fehling dibuat dengan mencampurkan kedua larutan tersebut, sehingga diperoleh suatu larutan yang berwarna biru tua. Dalam pereaksi Fehling, ion Cu^{2+} terdapat sebagai ion kompleks. Pereaksi Fehling dapat dianggap sebagai larutan CuO. Reaksi aldehida dengan pereaksi fehling menghasilkan endapan merah bata dari Cu_2O.



Gambar 4.19 Persamaa Reaksi Uji Fehlings

Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan merah (artinya positif merupakan gula pereduksi), hasil negatif ditunjukkan dengan tidak muncul endapan merah (artinya bukan gula pereduksi).



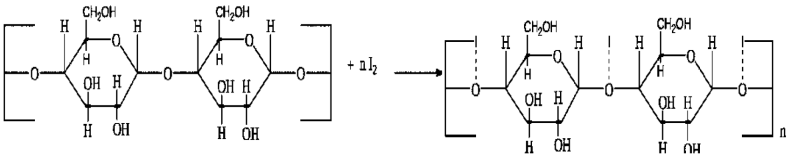
Gambar 4.20 Glukosa dan Fruktosa menghasilkan warna merah (positif gula pereduksi)

7) **Uji Iodin**

Tujuan uji iodin berfungsi untuk identifikasi jenis ataupun golongan polisakarida. Prinsip uji tersebut yaitu, masing-

masing jenis/golongan polisakarida memberikan hasil senyawa kompleks dengan warna yang berbeda.

Persamaan reaksi :



Gambar 4.21 Persamaa Reaksi Uji Iodin

Hasil uji iodin dapat dilihat di Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Hasil Uji Iodin dan Artinya

Hasil Uji	Arti
Biru	Amilosa
Merah violet	Amilopektin
Merah coklat	Glikogen
Merah coklat	Dekstrin

Analisis Kuantitatif Karbohidrat

1) **Cara Kimia**

a) **Metode Oksidasi dengan Kupri**

Tujuan metode ini untuk menghitung kadar gula pereduksi dengan prinsip adanya reaksi reduksi kuprioksida menjadi kuprooksida oleh gula pereduksi.

Reagen yang digunakan antara lain : Reagen Luff (Campuran kupri sulfat, natrium karbonat, dan asam sitrat) dan reagen soxhlet (Campuran kupri sulfat dan kalium natrium tartrat).

- **Cara Luff Schrool**

  Prinsip : Menghitung kadar gula pereduksi melalui penentuan kadar kuprioksida sebelum direaksikan dengan sampel (titrasi blanko) dan sesudah direaksikan dengan sampel (titrasi sampel). Penentuan kadar kuprioksida melalui titrasi dengan natrium tiosulfat. Indikator yang digunakan yaitu, amilum. Selisih titrasi blanko dan titrasi sampel sebanding dengan jumlah gula pereduksi pada sampel.

  Reaksi pada Cara Luff Schoorl :

  $H_2SO_4 + CuO \rightarrow CuSO_4 + H_2O$

  $CuSO_4 + 2\ KI \rightarrow CuI_2 + K_2SO_4$

  $2\ CuI \rightarrow Cu_2I_2 + I_2$

  $I_2 + Na_2S_2O_3 \rightarrow Na_2S_4O_6 + NaI$

  I_2 + amilum : biru

- **Cara Munson-Walker**

  Prinsip cara tersebut dengan menentukan jumlah kuprooksida yang terbentuk dengan cara penimbangan dan melarutkan kembali dengan asam nitrat kemudian dititrasi dengan tiosulfat. Jumlah kuprooksida yang terbentuk sebanding dengan jumlah gula pereduksi. Hubungan antara jumlah kuprooksida dengan gula pereduksi dengan Tabel Hammond.

- **Cara Lane-Eynon**

  Prinsip cara ini yaitu, titrasi reagen soxhlet (campuran $CuSO_4$ dan kalium natrium tartrat) dengan sampel. Reagen titrasi menggunakan reagen soxhlet, indikatir

metilen biru, dimana titik akhir titrasi yaitu ketika larutan tepat berubah dari biru menjadi tidak berwarna. Reagen soxhlet terlebih dahulu distandarisasi dengan gula pereduksi. Setelah distandarisasi, reagen soxhlet dapat digunakan untuk titrasi sampel. Hubungan antara volume hasil titrasi dengan jumlah gula pereduksi menggunakan Tabel Lane-Eynon.

b) **Metode Oksidasi dengan Larutan Ferrisianida Alkalis**

Tujuan metode ini untuk menghitung kadar gula pereduksi. Prinsip metode tersebut untuk adanya reaksi reduksi ferrisianida menjadi ferrosianida oleh gula pereduksi. Penentuan kadar dengan cara oksidasi dengan larutan ferrisianida alkalis lebih baik daripada oksidasi dengan kuprisulfat karena reagen ferrisianida dalam alkali lebih stabil daripada kuprooksida. Jumlah ferrosianida yang terbentuk dianggap ekivalen dengan jumlah gula pereduksi.

Persamaan reaksi :

$$2\ K_2Fe(CN)_6 + 2\ KI \rightarrow 2\ K_4Fe(CN)_6 + I_2$$

Bila ke dalam campuran tersebut, ditambahkan $ZnSO_4$ maka ferrosianida yang terbentuk akan diendapkan menjadi senyawa kompleks dengan persamaan reaksi :

$$2\ K_4Fe(CN)_6 + 3\ ZnSO_4 \rightarrow K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_{2\ (s)} + 3\ K_2SO_4$$

Perhitungan kadar dari metode oksidasi dengan larutan ferrisianida alkalis dapat dilakukan dengan :

- Dari persamaan reaksi : $2\ K_4Fe(CN)_6 + 3\ ZnSO_4$ à $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_{2\ (s)} + 3\ K_2SO_4$

Menimbang jumlah endapan dari senyawa kompleks yang dihasilkan pada penambahan $ZnSO_4$ setelah terbentuk ferrosianida

- Dari persamaan reaksi :

  $2\ K_2Fe(CN)_6 + 2\ KI \rightarrow 2\ K_4Fe(CN)_6 + I_2$

  Menentukan jumlah I_2 yang dibebaskan dengan titrasi natrium thiosulfat standar dengan indikatir amilum. Tiap mL larutan thiosulfat standar <-> jumlah gula pereduksi. Titik akhir titrasi saat tepat hilangnya warna biru dari kompleks ion-amilum.

  Menentukan jumlah ferrosianida yang terbentuk $(K_4Fe(CN)_6)$ dengan titrasi $Ce(SO_4)_2$ dengan indikator pp atau diukur secara kolometri (spektroskopi UV-vis)

- Mengukur ferrisianida sebelum tereduksi dan sesudah tereduksi dengan cara titrasi dengan gula pereduksi standart dengan indikator asam pikrat atau metilen biru.

c) **Metode Iodometri**

Tujuan uji untuk menghitung kadar gula pereduksi aldosa. Prinsip yaitu, iodin dalam alkalis dapat bereaksi menjadi hipiodida. Hipoiodida cenderung lebih mengoksidasi gula pereduksi aldosa dibandingkan ketosa. Sampel ditambahkan iodin encer kemudian NaOH (untuk suasana basa), diasamkan dengan HCl atau H_2SO_4. Kelebihan iodin dititrasi dengan larutan thio standar dengan indikator amilum.

Persamaan reaksi :

Titrasi sampel

$$RCOH + I_2 + 3\ NaOH \rightarrow RCOONa + 2\ NaI + 2\ H_2O$$

$$I_2\ (sisa) + 2\ Na_2S_2O_3 \rightarrow Na_2S_2O_6 + 2\ NaI$$

I_2 + amilum à iod-amilum (biru)

Titrasi blanko

$$I_2\ (blanko) + 2\ Na_2S_2O_3 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2\ NaI$$

2) **Cara Enzimatis**

Tujuan cara ini untuk menghitung kadar gula tertentu sesuai dengan ezim tertentu pula.

Catatan : Enzim bekerja secara spesifik sehingga pengukuran kadar gula tertentu pada suatu campuran dapat dilakukan.

a) **Penentuan Glukosa dan Fruktosa**

Prinsip :

- Glukosa dan fruktosa difosforilasikan menjadi glukosa-6-fosfat (G6P) dan fruktosa-6-fosfat (F6P) dengan bantuan enzim heksokinase (HK) dan dengan adanya adenosin-5-trifosfat (ATP).
- G-6-P kemudian dioksidasi oleh nikotinamida adenin dinukleotida (NADP) menjadi glukonat-6-fosfat (NADP) dengan bantuan enzim glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6P-DH) menghasilkan sejumlah NADPH.

Persamaan reaksi :

- Glukosa + ATP → G-6-P + ADP

  Fruktosa + ATP → F-6-P + ADP

- G-6-P + NADP (G6P-DH) → G-6-P + NADPH + H^+
- Laktosa + H_2O (b-galakosidase) → glukosa + b-galaktosa
- b-galaktosa + NaD (GAL-DH) → asam galatonat + NADH + H^+

Prinsip :

- Jumlah NADPH yang terbentuk setara dengan jumlah glukosa yang bereaksi sehingga NADPH inilah yang diukur dengan SEKTROSKOPI UV-VIS pada panjang gelombang 365 nm.
- Khusus untuk fruktosa, F-6-P yang terbentuk sebelumnya, harus diubah terlebih dahulu menjadi G-6-P dengan bantuan enzim fosfoglukosa isomerase (PGI). Setelah menjadi G-6-P, reaksi berjalan sesuai penentuan kadar glukosa.

b) **Penentuan Laktosa dan Galaktosa**

Prinsip :

- Laktosa daat dihidrolisis menjadi glukosa dan b-galaktosa oleh enzim b-galaktosidase.
- b-galaktosa dioksidasi menjadi asam galatonat oleh Nikotinamida adenin dinukleotida (NAD) dengan bantuan enzim galatosa dehidrogenase (GAL-DH) menghasilkan NADH

Persamaan reaksi :

- Laktosa + H_2O (β -galakosidase) → glukosa + β-galaktosa
- β-galaktosa + NaD (GAL-DH) → asam galatonat + NADH + H^+

Jumlah NADH yang terbentuk setara dengan jumlah laktosa yang ada. NADH diukur dengan spektroskopi UV-Vis pada 365 nm.

3) **Cara Fisis**

a) **Menentukan Indeks Bias (Refraktometer)**

- Tiap jenis gula memiliki indeks bias masing-masing
- Indeks bias : n^{20}_{D}
- Artinya, pengukuran indeks bias pada suhu 20° C dengan sinar natrium sebagai sumber sinar monokromatis

Gambar 4.22 Refraktometer

b) **Menentukan Putaran Optis (Polarimeter)**

- Karbohidrat bersifat optis aktif (dapat memutar bidang sinar terpolarisasi) sehingga dapat dianalisis secara polarimetri

- Putaran optis : $= \frac{100\ a}{l\ C}$

  dimana

  dimana, [α]= putaran/ rotasi spesifik

  t = suhu pengukuran (°C)

  D = sinar natrium (589 nm)

  α = sudut putar yang diamati

  C = konsentrasi (g sampel dalam 100 mL pelarut)

  l = panjang tabung (dm)

Gambar 4.23 Refraktometer

4) **Cara Kromatografi**

Preparasi terlebih dahulu karbohidrat yang diinginkan kemudian diukur kadarnya. Penentuan kadar karbohidrat dengan kromatografi bisa dilakukan di level instrumen seperti HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatography)*. Analisis dengan HPLC bisa dilakukan dengan melakukan pengujian terhadap larutan standart terlebih dahulu lalu mencocokan RT *(Rentention Time)* dari peak yang dihasilkan. Kadar akan diperoleh dari perhitungan luas peak secara otomatis dari hasil analisis HPLC.

Gambar 4.24 HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatigraphy)*

Rekomendasi Metode Analisis Karbohidat
Karbohidrat sesungguhnya merupakan senyawa gabungan dari unit "sakarida" atau bahasa lainnya disebut gula. Tujuan analisis karbohidrat tentunya ada dua yaitu, analisis kualitatif untuk menentukan jenis karbohidar atau sakarida penyusunnya dan analisis kuantitatif untuk menentukan kadar karbohidrat pada sampel.

Pada prakteknya, analisis pangan untuk karbohidrat yang biasa dilakukan adalah pada perhitungan parameter gula total dan gula reduksi. Jenis dari karbohidrat saat ini dilakukan menggunakan instrumen HPLC dengan standart sesuai dengan tujuan jenis karbohidrat yang akan dicek pada sampel.

Analisis gula total yang biasa digunakan adalah metode anthrone menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Reagen anthrone sebenarnya digunakan untuk analisis kualitatif untuk menentukan keberadaan karbohidrat pada suatu sampel. Ketika suatu sampel bereaksi dengan reagen anthrone, akan dihasilkan senyawa kompleks berwarna dimana intensitas warnanya. Intensitas warna tersebut diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis kemudian diperoleh kadarnya dari hasil absorbansi warna tersebut.

Analisis gula reduksi (atau beberapa menyebut gula pereduksi) bisa dilakukan menggunakan metode Luff Schrool. Metode Luff Schrool dilakukan dengan perhitungan titrasi iodometri dimana perhitungannya menggunakan tabel Luff Schroll.

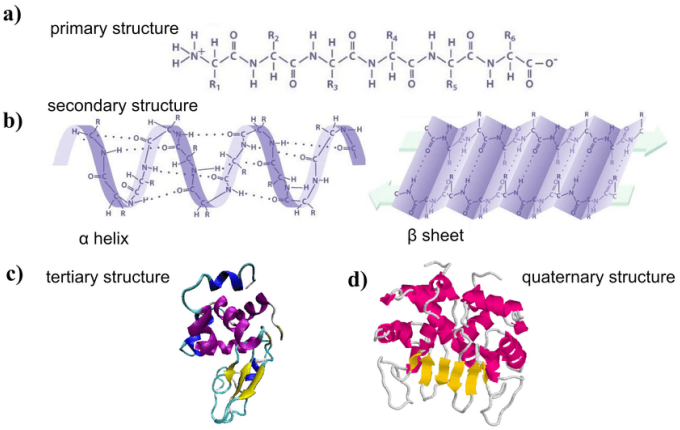
Secara kasar, perhitungan kadar karbohidrat juga bisa dilakukan menggunakan metode *by Difference* yaitu, perhitungan kadar protein, lipid, air terlebih dahulu, lalu sisanya adalah persen dari karbohidrat.

5

Analisis Protein

Pendahuluan

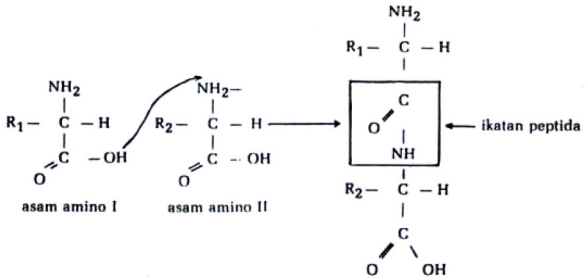
Protein merupakan bahan pembentuk jaringan organis yang paling utama. Sel-sel hewan dan tumbuhan, bakteri dan virus selalu mengandung protein sebagai bahan penyusun kerangka struktural sel maupun sebagai senyawa biomolekul yang secara fisiologis aktif. Protein termasuk senyawa makromolekul karena tersusun atas ≥ 50 unit asam amino yang saling bergabung melalui ikatan peptida. Asam amino sendiri merupakan senyawa organik yang memiliki gugus fungsi asam karboksilat (-COOH) dan amina ($-NH_2$). Struktur yang khas dari protein adalah strukturnya yang mengandung N, disamping C, H, O (seperti juga karbohidrat dan lemak). Unsur S, P, Fe dan Cu juga bisa terikat di struktur protein dalam bentuk senyawa kompleks.



Gambar 5.1 Struktur Protein

Molekul protein sendiri merupakan rantai panjang yang tersusun oleh matarantai asam-asam amino. Asam amino adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus karboksil (-COOH) dan satu atau lebih gugus amino ($-NH_2$) yang salah satunya terletak pada atom C tepat disebelah gugus karboksil (atau atom C alfa). Asam-asam amino yang berbeda-beda (ada duapuluh jenis asam amino dalam protein alamiah) bersambung melalui ikatan *peptida* yaitu ikatan antara gugus karboksil satu asam amino dengan gugus amino dari asam amino yang disampingnya (Gambar 5.1).

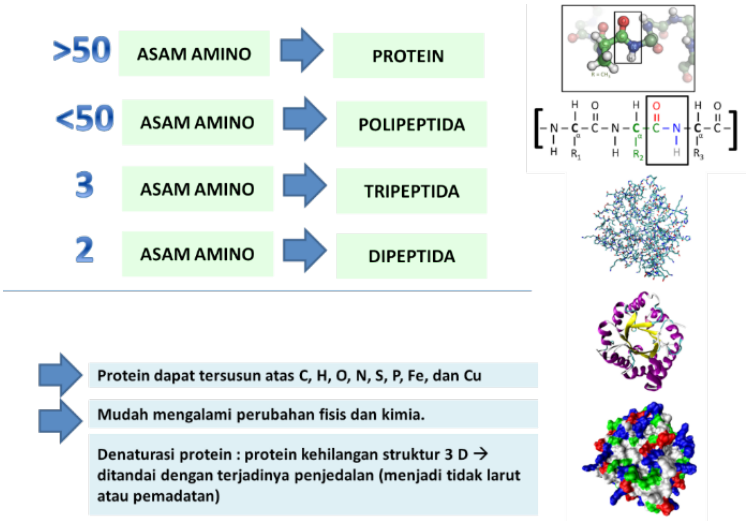
Di alam umumnya terdapat 20 jenis asam amino (untuk protein tertentu dapat 25 jenis); ratusan bahkan ribuan unit asam-asam amino yang berbeda-beda ini menyusun molekul protein, oleh sebab itu secara matematis jenis protein di alam ini dapat dikatakan tak terhingga jenisnya.



Gambar 5.2 Struktur Protein dari Gabungan Asam Amino

Protein memiliki sifat sebagai amfoter yaitu, bersifat asam dan basa. Sifat asam berasal dari adanya gugus asam karboksilat sedangkan sifat basa berasal dari adanya gugus amina. Selain sifat khas amfoter, protein juga dapat bersifat sebagai *zwitter ion. Zwitter ion* ditandai dengan adanya ion positif dan juga negatif secara bersamaan. Ion positif hasil ionisasi gugus amina sedangkan ion negatif hasil ionisasi dari guguus asam karboksilat.

Unit penyusun protein adalah asam amino. Protein terdiri atas > 50 unit asam amino, polipeptida jika < 50 unit asam amino, tripeptida jika terdiri atas 3 asam amino, sedangkan dipeptida terdiri atas 2 unit asam amino. Semua unit asam amino terhubung dengan ikatan peptida.



Gambar 5.3 Skema Protein

Apabila protein murni dianalisa unsur-unsur penyusunnya, maka gambaran yang berikut ini umum dijumpai :

C : 50-55%

O : 20-25%

N : 15-18%

H : 5-7%

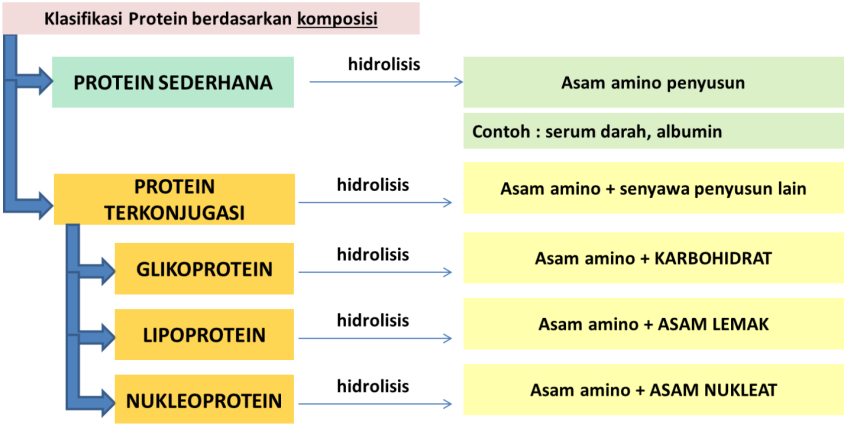
S : 0,4-2,5%

P : < 2,5%

Fe : < 2,5%

Cu : < 2,5%

Protein dapat diklasifikasikan berdasarkan komposisinya yaitu, protein sederhana dan protein terkonjugasi. Protein sederhana terdiri atas asam amino penyusunya. Protein terkonjugasi terdiri atas glikoprotein, lipoprotein, dan nukleoprotein. Glikoprotein terdiri atas asam amino dan karbohidrat. Lipoprotein terdiri atas asam amino dan asam lemak. Nukleoprotein terdiri atas asam amino dan asam nukleat.



Gambar 5.4 Jenis Protein Berdasarkan Komposisi

Oleh sebab itu ada usaha mengklasifikasikan protein berdasarkan sifat fisiko-kimiawinya terutama sifat kelarutannya. Menurut cara pengelompokan ini maka garis besar kelompok protein sederhana adalah sebagai berikut :

- Albumin : protein yang larut dalam air.
- Globulin : protein yang tidak larut dalam air, tetapi larut dalam larutan garam encer
- Prolamin : protein yang larut dalam etanol 70-80%, tak larut. Dalam air, larutan garam, ataupun etanol murni.
- Glutelin : protein yang tak larut dalam air, larutan garam atau etanol, tetapi dapat larut dalam larutan alkalis

atau asam encer.

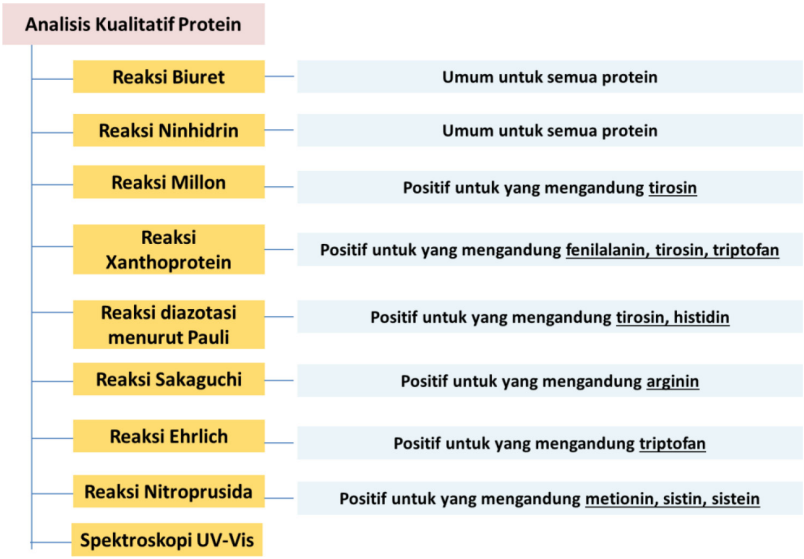
- Scleroprotein : protein yang tak larut dalam air, larutan garam encer dan solven organik.
- Protamine dan histone : protein yang bersifat alkalis, larut dalam air dan larutan garam.

Untuk protein kompleks, pengelompokannya dibuat berdasarkan gugus prostetik yaitu bagian bukan proteinnya, sebagai berikut :

- Nukleo-protein : protein yang mengandung asam nukleat.
- Gloki-protein : protein yang mengandung polisakarida.
- Lipoprotein : protein yang mengandung ipid.
- Chromoprotein: protein yang mengandung logam yang berwarna misalnya. Besi porfirin.
- Fosfo-protein : protein yang mengandung asam fosfat.

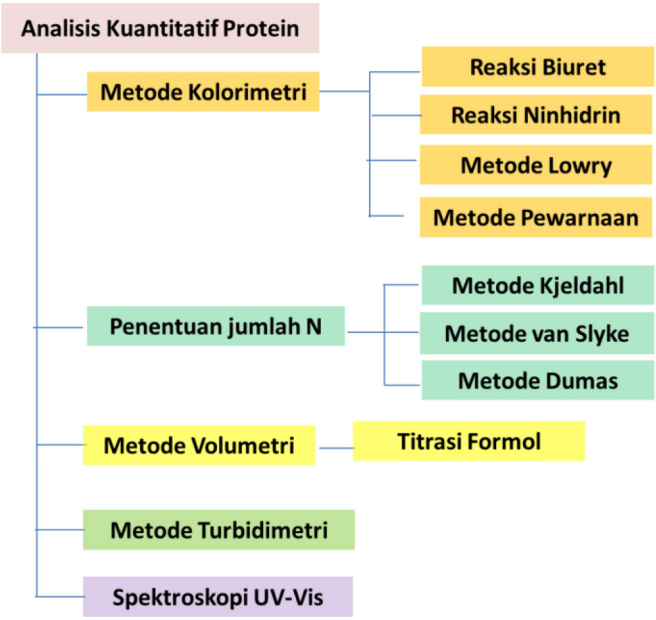
Analisis Protein

Analisis protein memiliki beberapa tujuan yaitu, menentukan jumlah kandungan protein bahan makanan, menentukan tingkat kualitas protein, dan menentukan karakter protein yang terkandung di dalamnya. Beberapa metode analisis kualitatif protein untuk menentukan jenis asam amino penyusunnya antara lain reaksi buiret, ninhidrin, millon, xanthoprotein, diazotasi (Pauli), sakaguchi, ehrilch, nitroprusida, dan juga bisa menggunakan instrumen spektroskopi uv vis. Beberapa metode kuantitatif protein untuk menentukan jumlah/ kadar protein pada sampel antara lain kolorimetri (reaksi biuret, ninhidrin, lowry, pewarnaan), penentuan jumlah N (Kjedahl, van Slyke, Dumas), volumetri (titrasi formol), turbidimetri, dan analisis menggunakan instrumen spektroskopi UV-Vis.



Gambar 5.5 Skema Metode Analisis Kualitatif Protein

Cara terpenting menentukan jumlah protein secara kuantitatif adalah dengan penentuan kandungan N yang ada dalam bahan pangan atau bahan hasil pertanian lainnya. Apabila unsur N ini dilepaskan dengan cara destruksi (perusakan bahan sampai terurai unsur penyusunnya) dan N yang terlepas ditentukan jumlahnya secara kuantitatif (dengan titrasi atau cara lain) maka jumlah protein dapat diperhitungkan atas dasar kandungan rata-rata unsur N yang ada dalam protein. Cara ini sebenarnya mengandung kelemahan, yaitu tidak semua jenis protein mengandung senyawa N yang sama, kelemahan lain adalah adanya senyawa lain yang bukan protein yang mengandung N meskipun jumlahnya biasanya jauh lebih sedikit dari protein. Senyawa-senyawa bukan protein yang mengandung N misalnya ammonia, asam amino bebas dan asam nukleat. Oleh sebab itu cara penentuan jumlah protein melalui penentuan jumlah N total hasilnya disebut jumlah protein kasar atau *crude protein*.



Gambar 5.6 Skema Metode Analisis Kuantitatif Protein

Analisis Kualitatif Protein

1) **Reaksi Biuret**

Tujuan dari analisis kualitatif protein menggunakan reaksi biuret adalah mengidentifikasi keberadaan protein_dalam sampel melalui ada tidaknya ikatan peptida_dari asam-asam amino pembentuk protein.

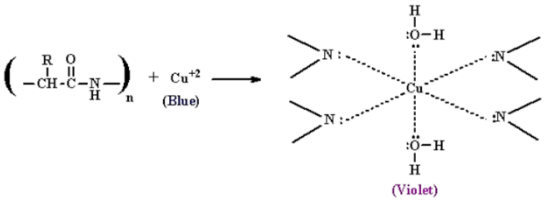
Prinsip reaksi ini yaitu,

- Ikatan peptida dari protein bereaksi dengan reagen biuret menghasilkan perubahan warna.
- Reaksi positif uji biuret ditunjukkan dengan munculnya warna ungu atau merah muda akibat adanya reaksi antara dari reagen biuret dengan -NH dari ikatan peptida dan -O dari air

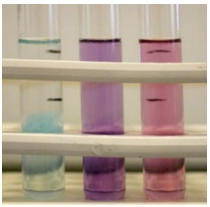
membentuk senyawa kompleks.

- Semakin panjang ikatan peptida (banyak asam amino yang berikatan) akan menghasilkan senyawa kompleks berwarna ungu, semakin pendek ikatan peptida (sedikit asam amino yang berikatan) akan menghasilkan senyawa kompleks berwarna merah muda.

Reaksi :



Hasil uji positif jika menghasilkan warna ungu atau merah muda yang berarti sampel tersebut terbukti mengandung protein. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak munculnya warna ungu atau merah muda yang artinya tidak mengandung protein. Hasil negatif juga berarti mengandung asam amino bebas.



Gambar 5.7 Hasil Negatif dan Positif Uji Biuret

2) **Reaksi Ninhidrin**

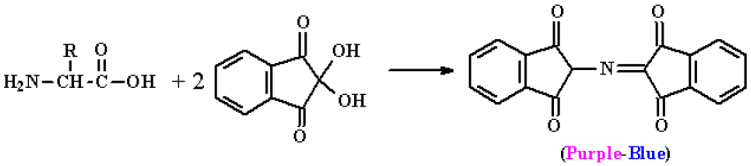
Tujuan dari analisis kualitatif dengan reaksi ninhidrin yaitu, mengidentifikasi keberadaan protein dalam sampel melalui identifikasi ada tidaknya asam amino yang dihasilkan dari proses

hidrolisis protein.

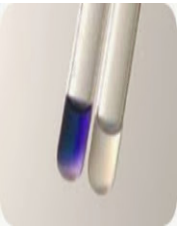
Prinsip yang uji reaksi nindihirin yaitu,

- Reaksi ninhidrin diawali dengan reaksi hidrolisis protein menjadi asam amino.
- Jika sampel mengandung protein, hidrolisis akan mengasilkan asam amino. Asam amino bereaksi dengan ninhidrin menghasilkan senyawa kompleks berwarna ungu kebiru-biruan.

Reaksi



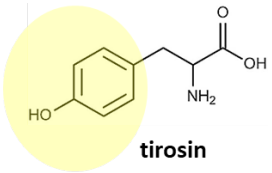
Hasil positif reaksi ninhidrin ditunjukkan dengan munculnya warna ungu kebiru-biruan yang membuktikan adanya protein. Jika tidak berwarna, artinya negatif adanya protein. Uji ninhidrin digunakan oleh kepolisian untuk menunjukkan sidik jari yang tertinggal di tempat kejadian perkara. Keringat yang dikeluarkan mengandung asam amino sehingga dapat dideteksi dengan ninhidrin.



Gambar 5.8 Hasil Positif dan Negatif Reaksi Ninhidrin

3) **Reaksi Millon**

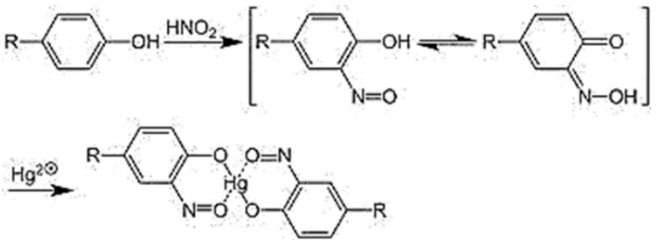
Reaksi Millon bertujuan untuk mengidentifikasi sampel yang mengandung asam amino tirosin.Reagen yang digunakan adalah $HgNO_3$ dalam asam nitrat dengan sedikit asam nitrit.



Prinsip pada Reaksi Millon yaitu,

- Reagen millon bereaksi dengan asam amino tirosin karena tirosin merupakan asam amino yang megandung gugus fenol.
- Reagen millon mengandung merkuri (Hg) dalam asam nitrat (HNO_3) bereaksi dengan senyawa yang mengandung gugus fenol menghasilkan senyawa kompleks berwarna merah.

Reaksi :

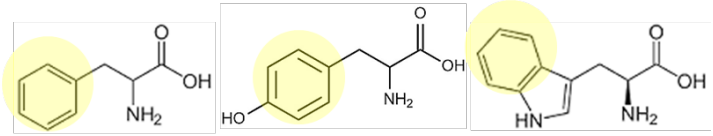


Hasil positif ditandai dengan munculnya warna merah yang berarti asam amino yang ada pada sampel terbukti mengandung tirosin. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak munculnya warna yang berarti tidak mengandung tirosin.

Gambar 5.9 Hasil Positif Uji Reaksi Millon

4) **Reaksi Xanthoprotein**

Tujuan analisis kualitatif dengan reaksi xanthoprotein yaitu, mengidentifikasi sampel yang mengandung asam amino fenilalanin, tirosin, triptofan. Perlakuan yang dilakukan adalah pendidihan dalam asam nitrat.

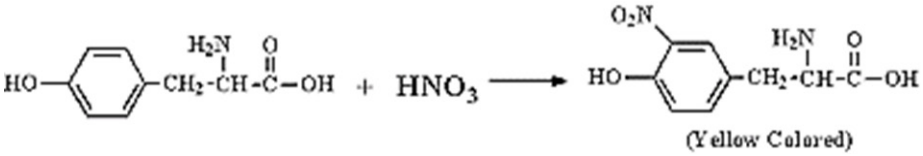


fenilalanin **tirosin** **triptofan**

Prinsip :

- Reagen xanthoprotein bereaksi dengan asam amino fenilalanin, tirosin, triptofan karena ketiganya merupakan asam amino yang megandung gugus aromatik
- Inti benzen (aromatik) yang terdapat di dalam molekul tirosin, fenilalanin, dan triptofan akan ternitrasi dengan penambahan HNO_3. Senyawa kompleks nitro yang terbentuk berwarna kuning dan dalam lingkungan alkalis akan terionisasi dengan bebas dan warnanya menjadi lebih tua atau berubah menjadi jingga.

Reaksi :

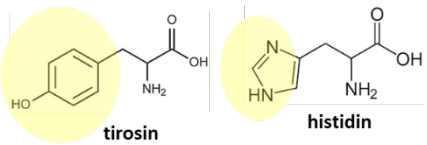


Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya warna kuning-jingga yang artinya pada sampel mengandung asam amino fenilalanin, tirosin, atau triptofan. Jika tidak dihasilkan warna artinya negatif mengandung ketiga asam amino tersebut.

Gambar 5.10 Hasil Positif Uji Reaksi Xanthoprotein

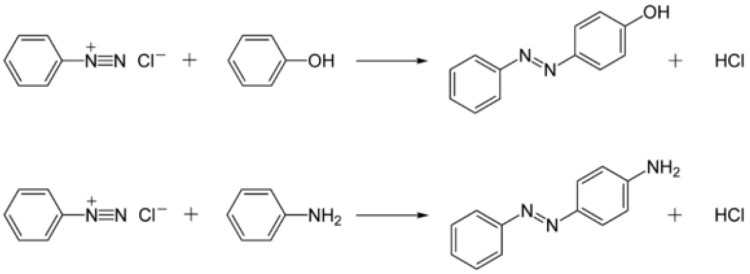
5) **Reaksi Diazotasi (menurut Pauli)**

Tujuan analisis kualitatif protein dengan reaksi diazotasi yaitu, mengidentifikasi sampel yang mengandung asam amino tirosin atau histidin. Reagen yang digunakan adalah asam sulfanilat terdiazotasi dalam larutan basa.



Prinsip uji reaksi diazotasi yaitu, Reaksi diazotasi pada asam amino tirosin atau histidin akan menghasilkan senyawa kompleks diazo berwarna kuning sampai coklat.

Reaksi :

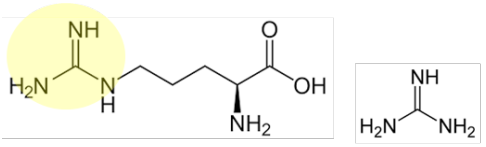


Hasil uji positif ditandai dengan munculnya warna kuning yang artinya mengandung tirosin atau histidin. Hasil negatif ditandai dengan tidak munculnya warna sehingga artinya tidak mengandung kedua asam amino tersebut.

Gambar 5.11 Hasil Positif Uji Reaksi Diazotasi (Menurut Pauli)

6) **Reaksi Sakaguchi**

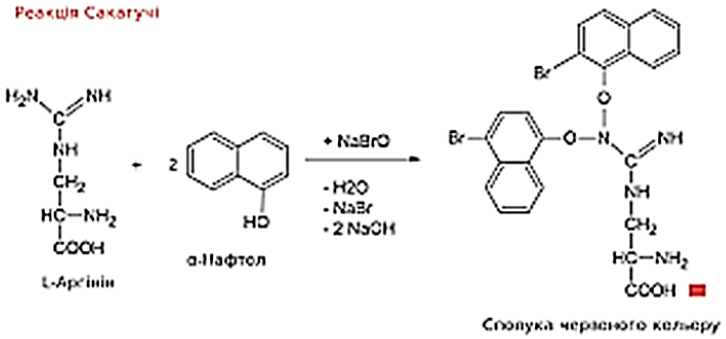
Tujuan analisis kualitatif reaksi sakaguchi yaitu, mengidentifikasi sampel yang mengandung asam amino arginin. Reagen yang digunakan yaitu, α-naftol dan natrium hipoklorit.



arginin **Gugus guanidin**

Prinsip reaksi tersebut yaitu,

- Arginin memberikan hasil positif pada uji reaksi sakaguchi karena arginin memiliki gugus guanidin.
- Reaksi antara reagen sakaguchi dengan arginin menghasilkan senyawa kompleks merah.



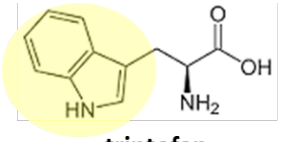
Hasil uji positif ditandai dengan munculnya warna merah yang berarti positif menganding arginin. Hasil negatif dengan tidak munculnya warna yang berarti tidak mengandung arginin.

Gambar 5.12 Hasil Positif Uji Reaksi Sakaguchi

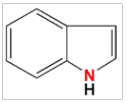
7) **Reaksi Erlich**

Tujuan analisis kualitatif protein dengan reaksi erlich adalah mengidentifikasi sampel yang mengandung asam amino triptofan. Reagen yang digunakan adalah *p*–

dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) dalam etanol & HCl pekat.

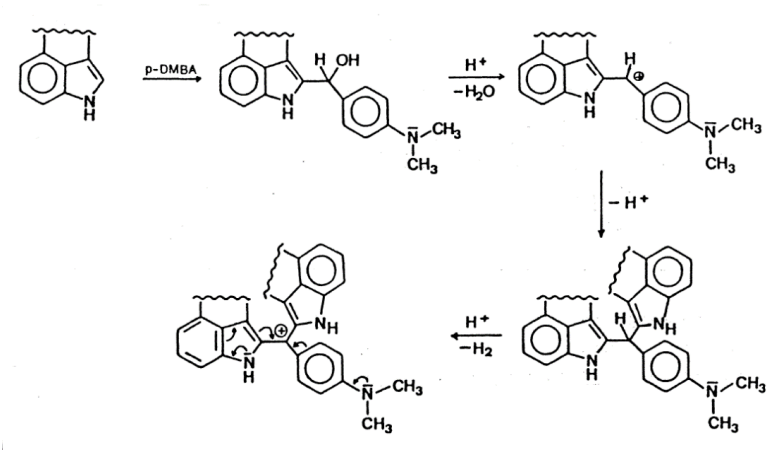


triptofan



Gugus indol

Prinsip dari uji ini adalah adanya triptofan yang memiliki gugus indol yang dapat bereaksi dengan reagen Erhrlich membentuk senyawa kompleks berwarna merah tua hingga ungu kebiru-biruan.

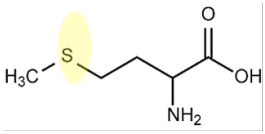


Hasil positif uji reaksi Ehrlich ditandai dengan adanya warna merah kebiru-biruan yang berarti mengandung triptofan. Hasil negtatif dengan tidak munculnya warna yang artinya tidak mengandung triptofan.

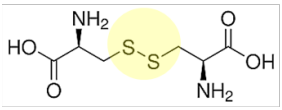
Gambar 5.13 Hasil Positif Uji Reaksi Erlich

8) **Reaksi Nitroprusida**

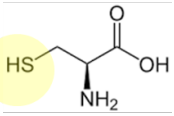
Tujuan analisis dengan reaksi nitroprusida adalah mengidentifikasi sampel yang mengandung asam amino metioin, sistin, sistein. Reagen yang digunakan adalah natrium nitroprusida dalam NH_3 encer.



Metionin



Sistin



Sistein

Prinsip dari uji reaksi nitropusida adalah reagen niroprusida akan bereaksi dengan metionin, sistin, ataupun sistein menghasilkan senyawa kompleks berwarna merah karena ketiga asam amino tersebut mengandung atom S. Hasil positif ditandai dengan munculnya warna merah yang artinya mengandung asam amino metioin, sistin, sistein. Hasil negatif ditandai dengan tidak munculnya warna.

Gambar 5.14 Hasil Positif Uji Reaksi Nitroprusida

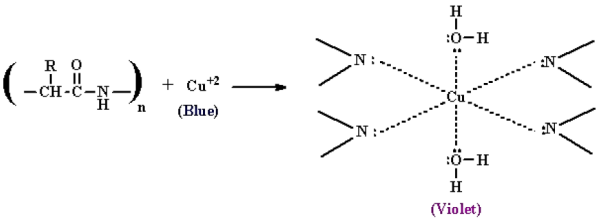
Analisis Kuantitatif Protein

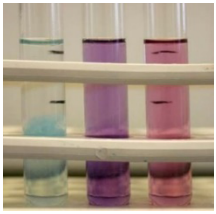
Analisis kuantitatif protein berprinsip dengan metode kolorimetri, penentuan jumlah N, metode volumetri, metode turbidimetri, dan analisis dengan instrumen spektroskopi UV-Vis.

1) **Metode Kolorimetri**

a) **Reaksi Biuret**

Prinsip reaksi ini untuk mengukur intensitas warna ungu atau merah muda dari hasil positif reaksi biuret (pada reaksi kuantitatif) dengan spektroskopi UV-Vis.

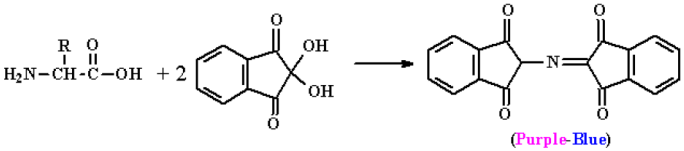


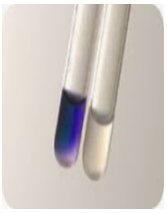


Gambar 5.15 Hasil Uji Reaksi Biuret

b) **Reaksi Ninhidrin**

Prinsip reaksi yaitu, mengukur intensitas warna ungu kebiru-biruan dari hasil positif reaksi ninhidrin (pada reaksi kuantitatif) dengan spektroskopi UV-Vis

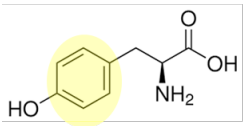


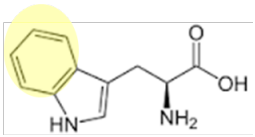


Gambar 5.16 Hasil Uji Reaksi Ninhidrin

c) **Metode Lowry**

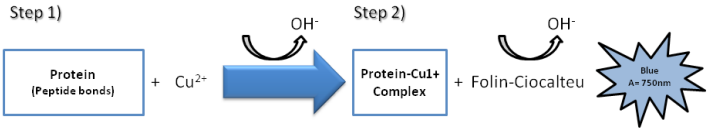
Prinsip Metode Lowry yaitu, reaksi antara dengan ikatan peptida dan reduksi asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat oleh tirosin dan triptofan (residu protein) akan menghasilkan senyawa kompleks berwarna biru.





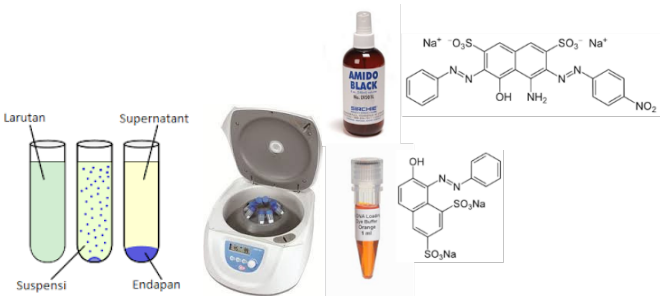
Warna biru yang dihasilkan diukur intensitasnya dengan uv-vis pada 750 nm. Warna yang terbentuk terutama dari hasil reduksi fosfomolibdat dan fosfotungstat sehingga

warna yang terbentuk tergantung dari kadar tirosin dan triptofan dalam protein. Metode Lowry lebih sensitif dibandingkan dengan metode biuret.



d) **Metode Pewarnaan**

Prinsip metode tersebut yaitu, protein dapat mengikat zat warna *(dye)* dimana jumlah zat warna yang diikat berbanding lurus dengan kadar protein pada sampel. Zat warna yang tidak terikat pada protein dapat dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan diukur intensitas warnanya dengan uv-vis (tiap zat warna, memiliki panjang gelombang berbeda). Semakin rendah intensitas warna dari supernatan, semakin banyak zat warna yang diikat oleh protein, artinya semakin banyak protein yang terkandung di dalam sampel.



Gambar 5.17 Skema Metode Pewarnaan

2) **Penentuan Jumlah N**

a) **Metode Kjedahl**

Prinsip Metode Kjedahl yaitu, menentukan jumlah N pada sampel. Ingat bahwa protein terdiri asam amino yang memiliki gugus amina. Penentuan jumlah N dianggap ekivalen dengan jumlah asam amino yang terdapat pada sampel. Pada faktanya, ada beberapa zat selain protein yang dapat mengandung atom N pada sampel sehingga hasil analisis kuantitatif dengan penentuan jumlah N hanya dianggap sebagai metode analisis untuk *crude protein* (protein kasar). Protein alamiah mengandung N rata-rata sebesar 16%. Terdiri atas 3 tahap : tahap destruksi, destilasi, titrasi.

- Tahap Destruksi

  Tujuan untuk melepaskan unsur N dari sampel. Prinsip untuk penambahan asam kuat (H_2SO_4) dan pemanasan pada 370-410° C. Untuk mempercepat reaksi dapat ditambahkan katalis Na_2SO_4 dan HgO (20 : 1).

  $$NH_2\text{-}CH(R)\text{-}COOH + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)SO_4$$

- Tahap Destilasi

  Tujuan untuk memecah $(NH_4)_2SO_4$ menjadi gas NH_3. Prinsip tahap ini untuk penambahan NaOH dan pemanasan akan menghasilkan gas NH_3 yang akan menguap dan bereaksi dengan H_3BO_3 (asam borat) membentuk $NH_4H_2BO_3$.

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \rightarrow Na_2SO_4 + 2\ H_2O + 2\ NH_3$$

$$2\ NH_3 + 2\ H_3BO_3 \rightarrow 2\ NH_4H_2BO_3$$

- Tahap Titrasi

  Tujuan untuk mengukur NH_3 melalui titrasi $NH_4H_2BO_3$ dengan HCl.

  Prinsip tahap tersebut adalah senyawa $NH_4H_2BO_3$ dititrasi dengan HCl encer (0,02 N) sehingga asam borat akan terlepas kembali dan terbentuk NH_4Cl. Jumlah HCl yang digunakan untuk titrasi ekivalen dengan jumlah gas NH_3 yang dibebaskan dari proses distilasi. 1 mol HCl = 1 mol N = 14 g N.

$$2\ NH_4H_2BO_3 + 2\ HCl \rightarrow 2\ NH_4Cl + 2\ H_3BO_3$$

Rumus Perhitungan

$$\%\ N = \frac{(\text{mL HCl Sampel} - \text{mL HCl Blanko})\text{xN HCl x } 14{,}007}{\text{mg sampel}}$$

Kadar Protein = %N x faktor koreksi

b) **Metode Van Slyke**

Prinsip metode ini yaitu, menentukan jumlah N pada sampel dengan cara mereaksikan sampel dengan asam nitrit sehingga dibebaskan N_2. Gas N_2 yang diperoleh diukur jumlahnya secara volumetri.

$$R\text{-}NH_2 + HNO_2 \rightarrow ROH + H_2O + N_2$$

Gas N_2 dianggap sebagai gas ideal, 1 grol (gram molekul) N = 22,4 L.

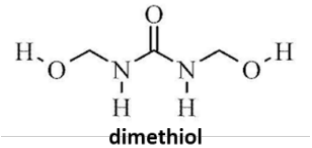
Dengan mengetahui volume gas, dapat dihitung massa nitrogen dan selanjutnya dikonversikan ke kadar protein.

c) **Metode Dumas**

Prinsip metode ini yaitu, menentukan jumlah N dengan cara pirolisis (memecah protein tanpa oksigen) sehingga dibebaskan N_2. Gas N_2 diukur secara volumetri.

3) **Metode Volumetri**

Prinsip metode ini yaitu, sampel yang mengandung protein direaksikan dengan basa (NaOH) kemudian ditambah formalin sehingga terbentuk dimethiol. Titrasi dilakukan dengan larutan NaOH dengan indikator pp dan ditandai dengan titik akhir munculnya warna merah jambu yang stabil.



4) Metode Turbidimetri

Prinsip metode ini yaitu, mengukur kekeruhan dari protein pada sampel. Kekeruhan akan terbentuk dalam larutan yang mengandung protein bila ditambahkan bahan pengendap protein._Bahan pengendap protein : TCA *(tri chloro Acetic Acid)*, $K_4Fe(CN)_6$ (kalium ferri sianida), dan asam sulfosalisilat (ortohidroksibenzoat). Kadar protein dtentukan dengan kurva.

Gambar 15.18 Turbidimeter

4) **Kromatografi**

Analisis kadar protein dengan kromatografi biasa digunakan menggunakan HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatography).* Analisis menggunakan HPLC membutuhkan preparasi terlebih dahulu.

- **Standart Protein**

Pemilihan standart protein merupakan penentu keberhasilan analisis kuantitatif. Bovine Serum Albumin (BSA) adalah protein yang umum digunakan sebagai standard dalam penetapan kadar protein. BSA banyak dipilih karena tingkat kemurniannya yang tinggi dan harganya relatif murah. Standard protein lain yang bisa digunakan adalah Bovine Gamma Globulin (BCG), terutama untuk keperluan kuantifikasi antibodi karena BCG menghasilkan warna yang sangat mirip dengan immunoglobulin G (IgG).

Larutan induk (stok) standard protein biasanya dibuat dalam konsentrasi 1 - 5 mg/mL, namun tidak menutup kemungkinan dibuat larutan stok dengan konsentrasi yang lebih besar. Misalkan larutan stok standard protein yang ingin dibuat adalah 1 mg/mL sebanyak 100 mL, maka ditimbang 100 mg BSA kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades (sebaiknya bebas CO2). Perlu dicatat, ketika larutan stok dibuat, jangan dikocok,

karena akan berakibat denaturasi protein (teramati sebagai buih di permukaan larutan). Untuk membantu pelarutan protein, cukup diaduk perlahan. Simpan larutan stok ini (bila belum digunakan) dalam freezer (atau lebih baik pada suhu -20°C).

- **Preparasi Sampel**

Sebelum sampel dianalisis, sampel harus dilarutkan terlebih dahulu, biasanya dalam buffer fosfat (PBS = *Phosphate Buffer Saline*). Proses pelarutan dilakukan dalam keadaan dingin. Bila sampel berupa padatan, jaringan atau sel, diperlukan langkah pendahuluan sebelum dilarutkan berupa penghancuran (diblender). Bila perlu, lakukan pemurnian protein untuk meminimalkan interferensi matriks. Cara paling sederhana adalah dengan mengendapkan protein menggunakan aseton

Prosedur pengendapan protein:

1. Tambahkan aseton 100% (yang telah didinginkan dalam es) pada larutan sampel hingga diperoleh konsentrasi akhir aseton 80% (misal: 2 mL larutan sampel + 8 mL aseton) dalam tabung sentrifuge.
2. Vortex campuran tersebut, kemudian diinkubasi pada -20oC (atau pada *freezer*) selama 1 jam.
3. Sentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 20 menit pada 4oC.
4. Buang supernatan, endapan dilarutkan kembali dengan PBS dengan vortex dan encerkan secara kuantitatif hingga volume tertentu.

Rekomendasi Metode Analisis Protein

Protein pada dasarnya adalah suatu gabungan dari unit penyusun asam amino. Tujuan analisis pada protein pastinya adalah mengidentifikasi asam amino yang menyusunnya sekaligus menghitung berapa kadar asam amino tersebut. Pada saat ini, dengan tujuan tersebut, bisa dilakukan dengan analisis menggunakan HPLC. Namun kendalanya adalah tidak semua laboratorium memiliki HPLC dan biaya yang dibutuhkan juga tidaklah sedikit.

Analisis pangan yang biasa dilakukan adalah pada tahap perhitungan kadar protein dan metode yang digunakan adalah Kjedahl. Metode ini lebih hemat dan cara yang dilakukan cukup mudah. Melalui tiga tahap penting, hasil analisis dari metode kjedahl adalah kadar protein kasar karena yang dianalisis pada sesungguhnya adalah senyawa dengan unsur N di dalamnya. Perhitungan yang melibatkan faktor konversi merupakan kunci dari keakuratan perhitungan dengan metode tersebut.

6

Analisis Lipid

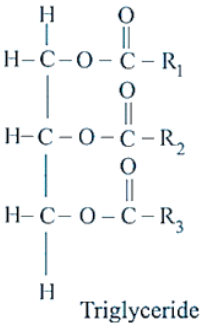
Pendahuluan

Lemak dan minyak atau secara kimiawi adalah trigliserida merupakan bagian terbesar dari kelompok ipid. Trigliserida ini merupakan senyawa hasil kondensasi satu molekul gliserol dengan tiga molekul asam lemak. Di alam, bentuk gliserida yang lain yaitu digliserida dan monogliserida yang dibuat dengan sengaja dari hidrolisa tidak lengkap trigliserida dan banyak dipakai dalam teknologi makanan misalnya sebagai bahan pengemulsi, penstabil dan lain-lain keperluan.

Dalam teknologi makanan, lemak dan minyak memegang peran yang penting. Minyak dan lemak memiliki titik didih yang tinggi (sekitar 200°C) maka biasa dipergunakan untuk menggoreng makanana sehingga bahan yang digoreng akan kehilangan sebagian besar air yang dikandungnya dan menjadi kering. Minyak dan lemak juga memberikan rasa gurih spesifik minyak yang lain dari gurihnya protein. Juga minyak member aroma yang spesifik. Dalam dunia teknologi roti, (*bakery technology*), lemak dan minyak penting dalam memberikan konsistensi empuk, halus dan berlapis-lapis. Bahan atau mentega yang dipakai dalam pembuatan roti dan kue dikenal dengan *shortening*. Juga dalam teknolog es krim (*ice cream*) lemak dan minyak memberikan tekstur yang lembut dan lunak. Minyak (nabati) merupakan bahan utama pembuatan margarine (mentega tiruan) sedangkan lemak (hewani, terutama susu) merupakan bahan utama pembuatan mentega (butter).

Lipid merupakan senyawa hidrokarbon alifatik nonpolar dan hidrofobik. Lipid termasuk senyawa non polar sehingga tidak larut dalam pelarut polar seperti air namun larut dalam pelarut non polar seperti *n*-heksana dan eter. Lipid secara kimia termasuk senyawa trigliserida dengan dua jenis minyak dan lemak. Minyak berbentuk cair sedangkan lemak berbentuk padat pada suhu kamar.

Pada proses pembentukannya, trigliserida merupakan hasil proses kondensasi satu molekul gliserol dengan tiga molekul asam-asam lemak (umumnya ketiga asam lemak berbeda-beda) yang membentuk satu molekul trigliserida dan tiga molekul air.

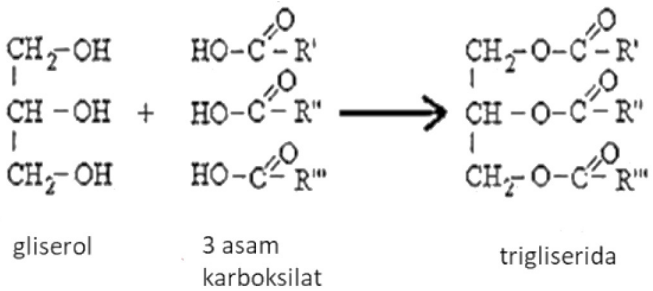


R = asam lemak

Gambar 6.1 Struktur Kimia Trigliserida

Trigliserida adalah senyawa ester dari gliserol dan asam karboksilat. Seperti halnya senyawa ester-ester organik, bila minyak dan lemak mengalami hidrolisis, akan dihasilkan asam lemak dan gliserol (1,2,3-propanatriol). Apabila satu molekul gliserol hanya mengikata satu molekul asam lemak maka hasilnya disebut *monogliserida* dan kalau dua asaml lemak disebut *digliserda*. Mono dan digliserida ini di alam hanya terdapat sangat sedikit

dalam dunia tanaman. Mono dan digliserda ini sengaja dibuat misalnya dari sintesa trigliserida yang tak sempurna atau dengan hidrolisa tak sempurna bahan trigliserida.



Gambar 5.2 Reaksi Pembentukan Trigliserida

Jenis-jenis asam lemak dan titik cairnya ditunjukkan dalam tabel berikut ini.

Rantai C	Nama Umum	Nama Sistematis	Titik Cair
ASAM LEMAK JENUH			(°C)
4	Butirat	Butanoat	-8,0
6	Kaproat	Heksanoat	-3,4
8	Kaprilat	Oktanoat	16,7
10	Kaprat	Dekanoat	31,6
12	Laurat	Dodekanoat	44,2
14	Miristat	Tetradekanoat	54,4
16	Palmitat	Heksadekanoat	62,9
18	Stearat	Oktadekanoat	69,6
20	Arakhidat	Eikosanoat	75,4
22	Behenat	Dokosanoat	80,0
24	Lignoserat	Tetrakosanoat	84,2
TAK JENUH DENGAN SATU IKATAN RANGKAP			
10 : 1	Obtusilat	4-Decenoat	-
10 : 1	Kaproleat	9-Decenoat	-
12 : 1	Linderat	4-Dodecenoat	1,3

12 : 1	Lauroleat	9-Dodecenoat	-
14 : 1	Tsuzuat	4-Tetradecenoat	18,5
14 : 1	Physterat	5-Tetradecenoat	-
14 : 1	Miristoleat	9-Tetradecenoat	-
16 : 1	Palmitoleat	9-Heksadecenoat	-
18 : 1	Petroselinat	6-Oktadecenoat	30,0
18 : 1	Oleat	9-Oktadecenoat	14 (16)
18 : 1	Vaccenat	11-trans-Oktadecenoat	44,0
20 : 1	Gadoleat	9-Eikosenoat	-
20 : 1	-	11-Eikosenoat	-
22 : 1	Cetolaet	11-Dokosenoat	-
22 : 1	Erusat	13-Dokosenoat	33,5
24 : 1	Selakholeat	15-Tetrakosenoat	-
26 : 1	Ximenat	17-Heksakosenoat	-
30 : 1	Lumequeat	21-Triakontenoat	-
TAK JENUH DENGAN DUA ATAU LEBIH IKATAN RANGKAP			
18 : 2	Linoleat	cis-cis-9, 12-Oktadeka-dienoat	-5,0
18 : 3	Linolenat	cis-cis-9, 12, 15-Ok-tadekatrienoat	-11,0
18 : 3	Alfa-Eleostearat	cis-trans-trans-9, 11, 13-Oktadekatrienoat	49,0
18 : 3	Beta-Eleostearat	trans-trans-trans-9, 11, 13-Oktadekatetraenoat	71,0
18 : 4	Parinarat	9,11,13-Oktadekatrie-noat	86 (96)
20 : 4	Arakhidonat	5, 8, 11, 14-Eikosatetrae-noat	-50,0
22 : 5	Klupanodonat	4,8,12,15,19-Dokosapen-taenoat	-

Semakin panjang rantai atom C asam lemak semakin tinggi titik cairnya. Namun apabila ada ikatan tak jenuhnya, maka titik cair rantai C asam lemak yang sama akan turun. Dengan

prinsip perbedaan titik cair asam-asam lemak ini trigliserida dapat dipisahkan secara fisi antara komponen minyak dan lemaknya. Komponen minyak umumnya terdiri trigliserida yang memiliki banyak asam-asam lemak yang tak jenuh. Misalnya minyak kelapa sawit (*crude palm oil,* CPO) dapat dipisahkan secara pendinginan (*winterisasi*) antara bagian yang banyak mengandung asam lemak tak jenuh (oleat) yaitu yang berupa minyak dan yang banyak dijual dipasaran dalam negeri sebagai minyak padat dengan berbagai merek. Bagian minyak karena banyak mengandung oleat disebut minyak olein sedangkan lemak yang padat karena banyak mengandung stearat disebut stearin.

Analisa Lipid

Senyawa lemak dan minyak merupakan senyawa alami penting yang dapat dipelajari secara lebih mendalam relatif lebih mudah daripada senyawa-senyawa makronutrien yang lain. Prosedur-prosedur analisa lemak dan minyak berkembang pesat, baik yang menggunakan alat peralatan sederhana maupun yang lebih mutakhir. Kemudahan analisa tersebut dimungkinkan antara lain karena :

a. Molekul lemak dan minyak relatif lebih kecil dan kurang kompleks bila dibandingkan dengan molekul karbohidrat atau protein
b. Molekul-molekul lemak dan minyak dapat disintesakan di laboratorium menurut kebutuhan, sedang molekul protein dan karbohidrat yang kompleks misalnya lignin, belum dapat.

Kemajuan prosedur penentuan komposisi asam lemak merupakan salah satu contoh pesatnya perkembangan ini. Untuk

menentukan komposisi asam-asam lemak yang terdapat pada trigliserida misalnya pada tahun 1950 hanya dapat dilakukan dengan cara *distilasi ester-ester asam lemak* yang membutuhkan waktu lama, pelaksanaannya rumit, hasilnya kurang cermat dan meragukan, sampel yang dibutuhkan banyak sampai setengah kilogram. Tetapi kini dengan alat Gas Liquid Chromatography, penentuan yang sama dapat dilakukan dengan lebih cermat, dalam waktu pendek (hanya beberapa jam) dengan sampel yang hanya beberapa milligram.

Analisa lemak dan minyak yang umum dilakukan pada bahan makanan dapat digolongkan dalam tiga kelompok tujuan ini :

1. Penentuan kuantitatif atau penentuan kadar lemak atau minyak yang terdapat dalam bahan makanan atau bahan pertanian
2. Penentuan kualitas minyak (murni) sebagai bahan makanan yang berkaitan dengan proses ekstraksinya, atau ada tidaknya perlakuan pemurnian lanjutan misalnya penjernihan (*refining*), penghilangan bau (*deodorizing*), penghilangan warna (*bleaching*) dan sebagainya. Penentuan tingkat kemurnian minyak ini sangat berhubungan erat dengan kekuatan daya simpannya, sifat gorengannya, baunya maupun rasanya. Tolok ukur kualitas ini termasuk angka asam lemak bebas (*free Fatty Acids* atau FFA), bilangan peroksida, tingkat ketengikan dan kadar air.
3. Penentuan sifat fisis maupun kimiawi yang khas atau mencirikan sifat minyak tertentu. Data mengenai sifat minyak ini misalnya angak iodin yang menunjukkan tingkat ketidakjenuhan asam-asm lemak penyusunnya, titik cair (*melting point*), titik asap (*smoke point*), angka Reichert-Meissl yaitu angka yang

menunjukkan jumlah asam-asam lemak yang dapat larut dalam air dan mudah menguap (panjang rantai C_4 – C_6), angka Polenske yaitu angka yang menunjukkan kadar asam-asam lemak yang mudah menguap tetapi tidak larut dalam air (C_8 – C_{14}) dan angka Kirschner yang khusus menunjukkan jumlah asam butirat. Angka penyabunan (*Saponification Value*) menunjukkan secara relatif besar kecilnya molekul asam-asam lemak yang terkandung dalam gliserida. Tolok ukur lainnya misalnya angka Indeks Refraksi, titik cair, angka kekentalan, titik percik (*Flash Piont*), komposisi asam-asam lemak dan sebagainya.

Ekstraksi Lipid

Sebagai senyawa hidrokarbon, lemak dan minyak atau ipid pada umumnya tidak larut dalam bahan pelarut organik. Pemilihan bahan pelarut yang paling sesuai untuk ekstraksi ipid adalah dengan menentukan derajat polaritasnya. Pada dasarnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya. Karena polaritas ipid berbeda-beda maka tidak ada bahan pelarut umum (universal) untuk semua macam ipid. Contoh dibawah ini menunjukkan beberapa jenis bahan pelarut yang sesuai untuk ekstraksi ipid tertentu :

a. Senyawa trigliserida yang bersifat nonpolar akan mudah diekstraksi dengan pelarut-pelarut nonpolar misalnya heksan atau petroleum ether.
b. Glikoipid yang polar akan mudah diekstraksi dengan alkohol yang polar.
c. Lesitin (Lecithin) atau secara kimiawi adalah senyawa

phosphatidyl-choline bersifat basis dan akan mudah larut dalam pelarut yang sedikit asam misalnya alkohol. Lesitin ini terdapat dalam jaringan tanaman (misalnya biji kedelai) dan jaringan hewan misalnya jaringan saraf dan otak.

d. Phosphatidyl-serine yaitu fosfoipid yang bersifat polar dan asam akan mudah larut dalam kloroform yang sedikit polar dan basis. Senyawa ini tidak larut dalam alkohol.

Bahan-bahan baik dari tanaman maupun hewan harus dihaluskan terlebih dahulu sebelum diekstraksi ipidnya. Apabila bahan ipid yang diekstraksi akan dianalisa lebih lanjut, maka selama proses pelembutan (penghancuran) ipidnya harus dilindungi dari proses-proses perubahan yang mungkin terjadi. Pencegahan tersebut dapat berupa :

a. Proses ekstraksi dilakukan dalam ruangan yang berisi gan N_2
b. Bahan pelarut yang digunakan harus bebas peroksida
c. Jaringan yang akan diperiksa dipisahkan dari bahan lain yang tidak diinginkan dan diekstraksi dengan segera
d. Selama persiapan maupun selama ekstraksi harus diusahakan penggunaan panas seminimal mungkin
e. Sedapat mungkin, bahan yang bukan ipid dipisahkan dengan segera (atau ipidnya diekstraksi dengan segera)
f. Ipid yang diperoleh dengan ekstraksi sebaiknya disimpan dalam wadah tertutup yang diisi gas N_2 dan disimpan dalam suhu rendah.

Kadar air yang tinggi dalam bahan menyebabkan ipid sukar diekstraksi dengan pelarut nonpolar (ether) karena bahan pelarut sukar masuk ke dalam jaringan yang basah dan menyebabkan

bahan pelarut menjadi jenuh dengan air sehingga kurang efisien untuk ekstraksi. Pemanasan bahan yang terlalu tinggi (misalnya untuk menghilangkan sebagian air yang ada dalam bahan) juga tidak baik untuk proses ekstraksi ipid karena sebagian ipid akan terikat dengan protein dan karbohidrat yang ada dalam bahan sehingga menjadi sukar untuk diekstraksi.

Tingkat kemudahan ekstraksi bahan kering masih ditentukan oleh ukuran partikel bahan tersebut. Penghancuran (pelembutan, penghalusan) merupakan perlakuan pendahuluan yang sangat penting sebelum ekstraksi. Penghancuran bahan dalam jumlah sedikit dapat dilakukan dalam mortar dengan bantuan sejumlah tertentu pasir kering bebas lemak yang ditambahkan pada bahan. Bahan kering misalnya biji kacang atau kopra dapat diparut terlebih dahulu. Untuk mencegah hilangnya minyak selama pemarutan, pendinginan bahan pada 0°C akan dapat mengurangi kehilangan ini. Untuk bahan-bahan yang mengandung minyak tidak terlalu tinggi (misalnya beras atau bagian tanaman selain biji) dapat dihaluskan lewat gilingan (grinder) dengan ukuran saringan sampai 40 mesh. Apabila persyaratan keamanan memenuhi (misalnya motor yang tertutup rapat dengan logam) maka bahan yang kurang halus dapat langsung diekstraksi dengan bahan pelarutan dalam blender.

Petroleum ether atau *n*-heksana adalah bahan pelarut ipid non-polar yang paling banyak digunakan dengan alasan sebagai berikut :

a. Harganya relatif murah,
b. Kurang berbahaya terhadap risiko kebakaran dan ledakan dan
c. Lebih selektif untuk ipid nonpolar.

Sedangkan dietileter cenderung melarutkan juga ipid-ipid yang telah mengalami oksidasi, bahan bukan ipid misalnya gula dan kelemahan lain adalah kecenderungan membentuk peroksida dengan bahan ipid. Campuran beberapa bahan pelarut untuk mengekstraksi kelompok bahan ipid yang lebih luas juga dapat dipergunakan untuk ekstraksi bahan-bahan biologis, namun bahan bukan ipid yang terikat harus segera dipisahkan agar tidak terjadi perubahan interaksi lebih lanjut. Atau campuran butanol dengan air untuk ekstraksi ipid dalam tepung terigu atau katul. Campuran khloroform, metanol dan air sering digunakan untuk isolasi total ipid dalam jaringan hewani.

Analisis Kuantitatif Lipid

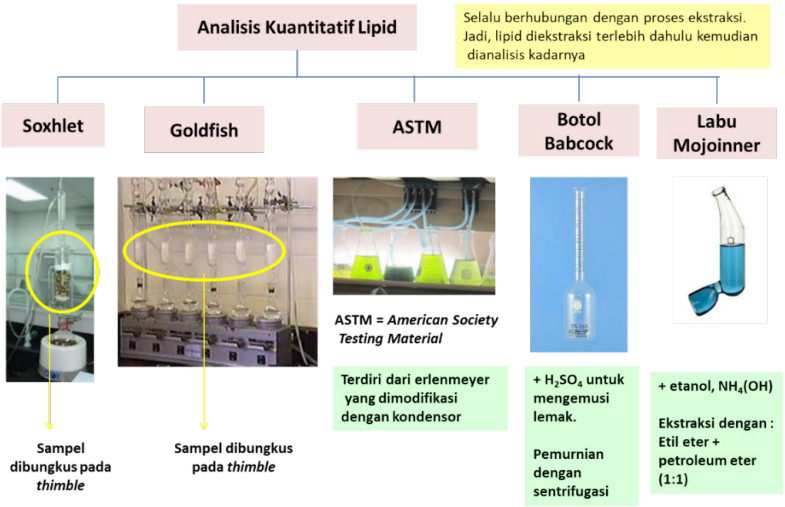
Penentuan kuantitatif (kadar) lipid dengan pelarut, selain lemak juga terikart fosfoipid, sterol, asam lemak bebas, karotenoid dan pigmen yang lain. Karena itu hasil analisanya disebut "lemak kasar" *(crude fat)*. Pada garis besarnya analisa lemak kasar ada dua macam yaitu cara kering dan cara basah.

Pada cara kering bahan dibungkus atau ditempatkan dalam thimble, kemudian dikeringkan dalam oven untuk menghilangkan airnya. Pemanasan harus secepatnya dan dihindari suhu yang terlalu tinggi, untuk ini dianjurkan dengan vakum oven (suhu 70°C) dengan tekanan vakum. Karena sampai kering maka pelarut yang dipilih harus bersifat tidak menyerap air. Apabila bahan masih mengandung air yang tinggi maka bahan pelarut akan sulit masuk ke dalam jaringan/sel dan pelarut menjadi jenuh dengan air selanjutnya ekstraksi lemak kurang efisien. Selain itu adanya air akan menyebabkan zat-zat yang larut akan ikut pula terekstraksi bersama lemak sehingga hasil analisa kurang mencerminkan yang

sebenarnya.

Ekstraksi lemak dari bahan kering dapat dikerjakan secara terputus-putus atau bersinambungan. Ekstraksi secara terputus dijalankan dengan alat Soxhlet atau alat ekstraksi ASTM (American Society Testing Material). Sedangkan cara bersinambungan dengan alat Goldfisch atau ASTM yang dimodifikasi.

Beberapa bahan pelarut yang sering digunakan dalam ekstraksi lemak adalah ether yaitu ethil-ether dan petroleum ether. Petroleum ether lebih banyak digunakan daripada ethil ether karena lebih murah, kurang berbahaya terhadap kebakaran dan ledakan serta lebih selektif dalam pelarutan ipid. Ethil-ether selain melarutkan ipid yang sudah mengalami oksidai serta zat bukan ipid misalnya gula. Ether kering (tidak mengandung air) mempunyai tendensi membentuk peroksida. Selain pelarut tersebut juga sering dipakai campuran alkohol-ether yaitu untuk mengekstraksi ipid dari jaringan biologis. Campuran butanol dan air (jenuh) untuk mengekstraksi ipid dari terigu, tepung, katul. Sedangkan campuran kloroform methanol dan air untuk isolasi dan pemurnian lipid total dari jaringan hewani.



Gambar 6.1 Skema Metode Analisis Lipid

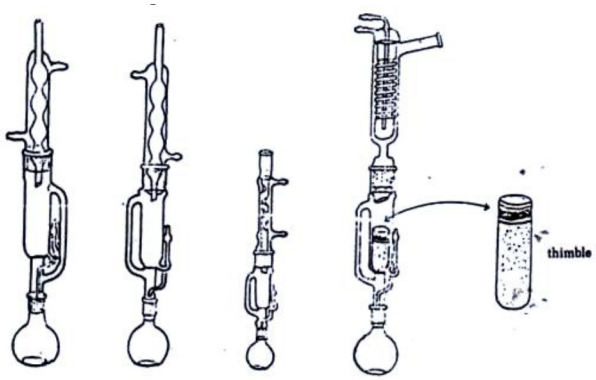
1) **Metode Soxhlet (AOAC)**

- Timbang dengar teliti 2 g bahan yang telah dihaluskan (sebaiknya yang Kering dan lewat 40 mesh).
- Campur denan pasir yang telah dipijarkan sebanyak 8 g dan masukkan ke dalam tabung ekstraksi Soxhlet dalam Thimble.
- Alirkan air pendingin melalui kondensor.
- Pasang tabung ekstraksi pada alat distilasi Soxhlet dengan pelarut petroleum ether secukupnya selama 4 jam. Setelah reside dalam tabung ekstraksi diaduk, ekstraksi dilanjutkan lagi selama 2 jam dengan pelarut yang sama.
- Petroleum ether yang telah mengandung tikstrak lemak dan minyak dipindahkan ke dalam botol timbang yang bersih dan diketahui beratnya kemudian uapkan dengan penangas air sampai agak pekat. Teruskan pengeringan dalam oven

100˚C> sampai berat konstan.

- Berat residu dalam botol timbang dinyatakan sebagai berat Lemak dan minyak.

Penentuan kadar lemak dengan alat ekstraksi Soxhlet



Gambar 6.2 Alat ekstraksi Soxhlet dan Thimble

Sejumlah sampel ditimbang dengan teliti dimasukkan ke dalam thimble yang dapat dibuat dari kertas saring atau alundum (Al_2O_3) yang poreus. Ukuran thimble dipilih sesuai dengan besarnya Soxhlet yang digunakan. Besarnya ukuran sampel adalah lolos saringan 40 mesh. Sampel yang belum kering harus dikeringkan lebih dahulu dan bila perlu dicampur dengan pasir murni bebas lemak untuk memperbesar luas permukaan kontak dengan pelarut. Di atas sampel dalam thimble ditutup dengan kapas bebas lemak supaya partikel bahan/sampel tidak ikut terbawa aliran pelarut. Selanjutnya labu godok dipasang berikut kondensornya. Pelarut yang digunakan sebanyak 1½ - 2 kali isi tabung ekstraksi. Pemanasan sebaiknya menggunakan penangas air untuk menghindari bahaya kebakaran atau bila terpaksa menggunakan kompor listrik harus dilengkapi dengan pembungkus labu dari asbes. Ipid akan terekstraksi dan melalui

sifon terkumpul ke dalam labu godok. Pada akhir ekstraksi yaitu kira-kira 4 – 6 jam, labu godok diambil dan ekstraks dituang ke dalam botol timbang atau cawan porselin yang telah diketahui beratnya, kemudian pelarut diuapkan di atas penangas air sampai pekat. Selanjutnya dikeringkan dalam oven sampai diperoleh berat konstan pada suhu 100°C. berat residu dalam botol timbang dinyatakan sebagai berat lemak atau minyak. Agar diperoleh lemak dan minyak bebas air dengan cepat maka pengeringan dapat menggunakan oven vakum. Selain cara di atas penentuan banyaknya lemak dapat pula diketahui dengan menimbang sampel padat yang ada dalam thimble setelah ekstraksi, dan sudah dikeringkan dalam oven sehingga diperoleh berat konstan. Selisih berat sebelumdengan sesudah ekstraksi merupakan berat minyak atau lemak yang ada dalam bahan tersebut.

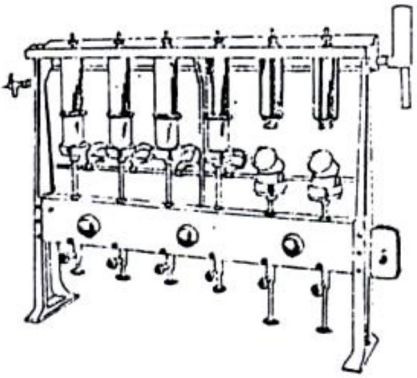
2) **Metode Goldfisch**

- Timbang kira-kira 5 g bahan kering dan halus dan pindahkan ke dalam kertas siring atau kertas alminium (aluminium foil) yang dibentuk sedemikian rupa sehingga membungkus bahan dan dapat masuk dalam thimble, yaitu pembungkus bahan yang terbuat dari alumina yang porous.
- Pasanglah bahan dan thimble pada sample tube, yaitu gelas penyangga yang bagian bawahnya terbuka, tepat di bawah kondensor alat distilasi Goldfisch.
- Masukkan pelarut, misalnya petroleum-ether secukupnya (paling banyak 75 ml) dalam gelas piala khusus yang telah diketahui beratnya.
- Pasanglah piala berisi pelarut ini pada kondensator sampai tepat, dan tak dapat diputar lagi.
- Jangan lupa mengalirkan air pendingin pada kondensor.

Naikkan pemanas listrik sampai menyentuh bagian bawah gelas piala dan nyalakan pemanas listriknya.

- Lakukan ekstraksi selama 3 sampai 4 jam. Setelah selesai, matikan pemanas listriknya dan turunkan. Setelah tidak ada tetesan pelarut, ambillah thimble dan sisa bahan dalam gelas penyangga.
- Pasanglah gelas piala penampung pelarut (solvent-recovery-tube) di tempat gelas penyangga tadi. Gelas piala yang berisi pelarut dan minyak yang terekstraksi, dipasang lagi dan dilanjutkan pemanasan sampai semua pelarut menguap dan tertampung dalam gelas piala penampung pelarut. Pelarut yang tertampung dapat digunakan lagi.

Lepaskan gelas pia1a yang berisi minyak dari alat distilasi, dan lanjutkan pemanasan di atas alat pemanas sampai berat konstan. Timbang berat minyak dan hitunglah persen minyak dalam bahan.



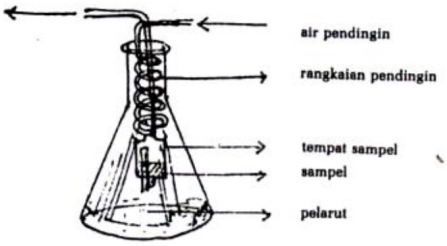
Gambar 6.3 Alat Ekstraksi Goldfish

Ekstraksi dengan alat Goldfisch sangat praktis dan mudah pemakaiannya. Bahan sampel yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam thimble dan dipasang dalam tabung penyangga yang

pada bagian bawahnya berlubang. Bahan pelarut yang digunakan ditempatkan dalam bekerglas dibawah tabung penyangga. Bila bekerglas 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 ipid akan terekstraksi dan selanjutnya akan tertampung kedalam bekerglas kembali. Setelah ekstraksi selesai (3-4 jam), pemanas dimatikan dan sampel berikut penyangganya diambil dan diganti dengan bekerglas yang ukurannya sama dengan tabung penyangga. Pemanas dihidupkan kembali sehingga pelarut akan diuapkan lagi dan diembunkan serta tertampung ke dalam bekerglas yang terpasang di bagian bawah kondensor. Dengan demikian pelarut yang tertampung ini dapat dimanfaatkan untuk ekstraksi yang lain. Residu yang ada dalam bekerglas 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 ekstrak berakhir dan sudah dikeringkan sampai berat konstan. Selisih bobot sampel sebelum dan bobot residu sesudah ekstraksi dan sudah dikeringkan merupakan lemak yang ada dalam bahan. Keuntungan cara ekstraksi Goldfisch ini adalah pelarut yang sudah dipakai dapat diperoleh kembali.

3) **Metode ASTM**

Penentuan kadar lemak dengan alat ekstraksi ASTM

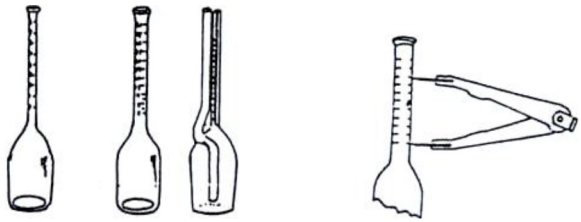


Gambar 6.4 Alat ekstraksi ASTM

Alat ekstraksi ini terdiri dari atas tabung ekstraksi dari gelas dengan kumparan pendingin terbuat dari seng atau tembaga. Tabung tempat sampel seperti yang digunakan pada Goldfisch ataupun Soxhlet. Bila tempat penyangga sampel digunakan tabung dengan sifon maka ekstraksi berjalan secara terputus sedang bila menggunakan yang berlubang bagian bawahnya atau poreus ekstraksi bekerja secara bersinambungan. Lemak yang ada dalam pelarut akan berada dalam tabung ekstraksinya dan setelah diuapkan dan dikeringkan dalam oven 100°C dapat ditimbangsampai berat konstan. Berat residu ini merupakan lemak yang ada dalam bahan.

4) **Metode Ekstraksi dengan Babcock dan Mojonnier**

Bahan yang berbentuk cair, penentuan lemaknya dapat menggunakan botol Babcock atau dengan Mojonnier.



Gambar 6.5 Botol Babcock dan Kapiler

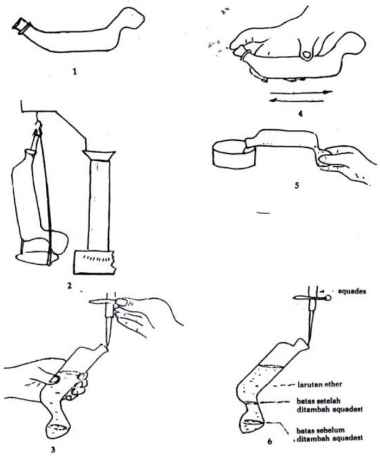
Penentuan lemak dengan botol Babcock sangatlah sederhana. Sampel yang telah ditimbang dengan teliti dimasukkan ke dalam botol Babcock. Pada leher botol Babcock ini telah dilengkapi dengan skala ukuran volume. Sampel yang dianalisa ditambah asam sulfat pekat (95%) untuk merusak emulsi lemak sehingga lemak 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 senyawaan 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 secara langsung dibaca/diketahui. Asam sulfat yang berfungsi untuk merusak emulsi minyak dapat diganti dengan senyawa lain misalnya detergent tidak mengion tetapi hidrofil yaitu polioxiethilen sorbitan monolaurat.

Penentuan Lemak Susu Cara Babcock

- Timbang 18 g susu dalam botol Babcock dan tambahkan lebih kurang 17,5 ml $H_2SO_4 \pm 95\%$ (B . J = 1,83). Campurlah baik-baik dengan menggoyang-goyangkan botol sampai gumpalan-gumpalan susu tercampur semua.
- Pasanglah botol babcock dalam sentrifug dan jangan lupa memasang botol Babcock yang sama beratnya untuk keseimbangan. Putarlah selama 5 menit.
- Tambahkan air panas (60°C atau lebih) samipai labu dari botol Babcock terisi penuh. Lanjutkan sentrifugasi selama 2 menit lagi. Kemudian tambahkan air panas lagi sampai lemak cair terletak dalam leher botol (kolom) yang berskala. Sentrifug lagi 1 menit.
- Masukkan botol dalam air hangat (55 - 60°C) selama 3 menit atau lebih.
- Usahakan permukaan lemak dalam botol sama dengan permukaan air pemanas
- Ambil dan keringkan botol dan aukurlah kolom lemak dari ujung bawah sampai meniskus atas dengan pengukur kaliper atau lainnya. Nyatakan kadar lemak dalam % berat.

Pada penentuan kadar lemak dengan Mojonnier, sampel dimasukkan ke dalam tabung Mojonnier dan ditambahkan ethanol, amonium hidroksida, kemudian diekstraksi menggunakan campuran ethil-ether dan petroleum ether (1:1). Amonium hidroksida akan menetralkan asam-asam dan menghilangkan mantol/lapisan film, sekeliling globula lemak sehingga lemak mudah terekstraksi. Ethanol merupakan medium yang menyebabkan ether dapat mudah mengadakan kontak

dengan lemak secara lebih baik. Dengan demikian adanya ethanol menyebabkan ekstraksi lebih cepat. Petroleum ether mempunyai kemampuan mengurangi kelarutan air dalam ethil-ether, dengan demikian adanya petroleum ether ini akan memperkecil adanya zat-zat yang dapat larut dalam air terikut dalam minyak. Dengan kata lain akan diperoleh lemak/minyak yang mencerminkan jumlah sebenarnya. Untuk memperbesar ketelitian maka ekstraksi dikerjakan berulang-ulang. Hasil ekstraksi kemudian diuapkan pelarutnya dan dikeringkan dalam oven 100°C sampai diperoleh berat konstan. Berat residu dinyatakan sebagai berat lemak/minyak dalam bahan.



Cara analisa lemak dengan Mojonnier

1. Tabung ekstraksi Mojonnier
2. Cara menimbang sampel
3. Cara menuang reagent
4. Cara menggojog tabung
5. Cara menuang hasil ekstraksi
6. Posisi lapis batas setelah dan sebelum ditambah aquadest.

Gambar 6.6 Cara analisa lemak dengan Metode Mojonnier

Analisis untuk Penentuan Karakterisasi Lipid

Jenis minyak dan lemak dapat dibedakan antara yang satu dengan yang lainnya berdasarkan sifat-sifatnya. Pengujian sifat-sifat minyak tersebut meliputi uji penyabunan, uji ketidakjenuhan, uji kelarutan, uji titik cair, indeks bias, bobot jenis dan lain-lain. Karakterisasi lipid terangkum pada Tabel 6.1

Tabel 6.1 Karakterisasi Lipid

No.	Karakterisasi Lipid	Deskripsi	Cara Penentuan
1	Penentuan Angka Penyabunan	Untuk menentukan massa molekul minyak atau lemak secara kasar. Jika massa molekul rendah → angka penyabunan tinggi. Jika massa molekul tinggi → angka penyabunan rendah. Angka penyabunan = jumlah (mg) KOH yang dibutuhkan untuk menyabunkan 1 g lemak atau minyak.	Sampel + KOH alkoholik, dididihkan sampai tersabunkan. Pengukuran kadar KOH : Titrasi dengan HCl Indikator : pp Titik akhir titrasi : hilangnya warna merah Meliputi juga titrasi blanko (KOH saja tanpa sampel) Perhitungan : Angka penyabunan = $\frac{(mL\ titrasi\ blanko - sampel)x\ N\ HCl\ x\ Mr\ KOH}{massa\ sampel\ (g)}$
2	Penentuan Angka Ester	Angka ester menunjukkan jumlah asam organik yang tergolong ester	Angka ester = selisih angka penyabunan dan angka asam
3	Penentuan Angka Asam	Angka asam menunjukkan adanya asam lemak bebas yang berasal dari proses hidrolisis minyak. Pengolahan minyak yang buruk → terjadi hidrolisis minyak. Semakin tinggi angka asam → makin rendah kualitas minyak.	Sampel + alkohol, dipanaskan dalam penangas air, didinginkan. Sampel kemudian dititrasi dengan KOH dengan indikator pp. titik akhir titrasi : muncul warna pink. Perhitungan angka asam : $\frac{mL\ KOH\ x\ N\ KOH\ x\ Mr\ KOH}{massa\ sampel\ (g)}$

No.	Karakterisasi Lipid	Deskripsi	Cara Penentuan
		Angka asam = jumlah (mg) KOH yang diperlukan untuk menetralkan asam lemak bebas pada 1 g minyak atau lemak.	
		Dapat dinyatakan juga sebagai kadar asam lemak bebas (% FFA)	Perhitungan % FFA : $\frac{\text{mL KOH x N KOH x Mr KOH x 100\%}}{\text{massa sampel (g)x 1000}}$
		FFA berhubungan dengan angka asam lemak bebas yang paling banyak terkandung.	Angka asam : $\frac{\text{Mr KOH}}{\text{Mr asam lemak bebas : 10}}$ x 100%
4	Penentuan Angka Iod	Angka iod menunjukkan ketidakjenuhan (jumlah ikatan rangkap) pada asam lemak penyusun minyak atau lemak. Angka iod = jumlah (g) iod yang diikat oleh 100 g minyak atau lemak.	Cara Hanus, von Hubl, Wiys. Cara hanus : Sampel + kloroform atau CCl_4 + iodin bromida dalam CH_3COOH glasial, dibiarkan 1 jam (tempat gelap). Iodin sisa dititrasi dengan $Na_2S_2O_3$, indiator amilum. Titik akhir titrasi hilangnya warna biru. Perhitungan angka iodin : $\frac{(mL\ blanko - mL\ sampel)x\ N\ tiosulfat\ x\ Mr\ iod}{massa\ sampel\ (g)}$

No.	Karakterisasi Lipid	Deskripsi	Cara Penentuan
5	Penentuan Angka Reichert-Meissl (Asam lemak berantai karbon 4-6)	Angka Reichert-Meissl = jumlah (mL) NaOH yang digunakan untuk menetralkan asam lemak yang menguap dan larut dalam air (asam lemak polar) yang diperoleh dari distilasi minyak atau lemak .	Sampel + soda gliserol,dipanaskan hingga membentuk sabun sempurna dan cairan menjadi jernih, ditambah air dan H_2SO_4 untuk didestilasi. Destilat → asam lemak polar. Destilat ditambah aquadest. Bagian yang larut dalam aquades dipisahkan dan dititrasi dengan NaOH, indikator pp sampai terbentuk wana pink. Perhitungan angka Reichert-Meissl: 1,1 x (mL titrasi sampel – blanko)
6	Penentuan Angka Polenske (Asam lemak berantai karbon 8-14)	Angka polenske = jumlah (mL) NaOH yang diperlukan untuk menetralkan asam lemak yang menguap dan tidak larut dalam air tetapi larut dalam alkohol (asam lemak non polar) yang diperoleh dari hasil distilasi.	Bagian asam lemak yang tidak larut dalam air (lanjutan Reichert- Meissl) dilarutkan ke alkohol 95%, kemudian dititrasi dengan NaOH dengan indikator pp sampai pink. Perhitungan angka Polenske : mL NaOH untuk titrasi

No.	Karakterisasi Lipid	Deskripsi	Cara Penentuan
7	Penentuan titik leleh	titik leleh minyak atau lemak → berupa *range* suhu saat tepat meleleh dan selesai meleleh (menjadi jernih). Semakin panjang rantai karbon → semakin tinggi titik lelehnya. Semakin banyak ikatan rangkapà titik leleh semakin tinggi. Titik leleh lemak dengan struktur trans > cis.	Alat : pipa kapiler Sampel dimasukkan ke dalam pipa kapiler kemudian dipanaskan melalui cairan yang masuk ke dalam pipa.
8	Penentuan Berat Jenis	Berat jenis berbeda dengan massa jenis. Berat jenis = perbandingan berat dari volume minyak atau lemak pada 25°C dengan berat air pada volume dan suhu yang sama.	Alat : piknometer
9	Penentuan Indeks Bias	Digunakan untuk menguji kemurnian minyak	Alat : refraktometer
10	Penentuan Angka Peroksida	Angka peroksida menunjukkan sejumlah senyawa peroksida yang merupakan salah satu bentuk kerusakan makanan akibat reaksi autooksidasi.	Metode Hills, Thiel, Iodin. 1) Merode Hills dan Thiel : Sampel dilarutkan ke benzena-metanol (3:7). Peroksida akan larut kemudian direaksikan dengan ferroklorida. Kemudian

No.	Karakterisasi Lipid	Deskripsi	Cara Penentuan
			ditambah NH_4CNS hingga membentuk $Fe(CNS)_3$ yang berawarna merah. Intensitas warna merah diukur dengan UV-vis pada 510 nm. Kadar ferri yang terbentuk diukur melalui kurva standart. 2) Metode Iodin : Sampel dilarutkan ke campuran asetat : kloroform (2:1), ditambah KI. Kelebihan I_2 dititrasi dengan tiosulfat.
11	Penentuan Asam Thiobarbiturat (TBA)	Angka TBA menunjukkan kerusakan minyak atau lemak akibat ketengikan dengan adanya senyawa aldehid (malonaldehid). Makin besar TBA → makin tengik	Malonaldehid dapat bereaksi dengan thiobarbiturat menghasilkan kompleks warna merah. Intensitas warna merah diukur dengan uv-vis pada 528 nm.
12	Penentuan Kadar Air Minyak	Sama halnya dengan analisis kadar air pada sampel	

Rekomendasi Metode Analisis Lipid
Lipid secara kimia adalah senyawa trigliserida yang terdiri atas gliserol yang mengikat 3 asam lemak. Pangan yang tinggi lipid tentunya dianalisis dengan tujuan yang lebih spesifik seperti menganalisis kualitasnya. Hal ini berhubungan dengan karakter lipid yang mudah mengalami kerusakan akibat reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi pada lipid akan menyebabkan putusnya asam lemak menjadi asam lemak bebeas *(free fatty acid)* dan juga dihasilkan senyawa peroksida. Berdasarkan penjelasan tersebut, analisis lipid pada sampel pangan tidak hanya sebatas penentuan kualitatif dan kuantitatif namun juga analisis karakterisasinya. Karakterisasi yang biasa dianalisis pada sampel tinggi lipid antara lain nilai asam lemak bebas (FFA), angka iod, dan angka peroksida.
Analisis kualitatif pada lipid pada saat ini, dilakukan menggunakan instrumen GC-MS dan juga HPLC. Tujuan analisis tersebut tentunya untuk mengidentifikasi jenis asam lemak penyusunnya. Analisis kuantitatif pada sampel yang mengandung lipid biasa menggunakan metode soxhlet. Hal ini berhubungan dengan sifat lipid yang non polar sehingga proses paling mudah adalah ekstraksi. Proses ekstraksi menggunakan soxhlet berprinsip kontinyu (artinya penggunaan pelarut non polar secara terus menerus) sehingga pada akhir proses diperoleh ekstrak lipid kasar. Pelarut yang digunakan antara lain *n*-heksana ataupun eter. Ekstrak yang diperoleh dihitung dengan perbandingan massa kemudian dikali 100% untuk mendapatkan prosentase kadar lipid tersebut. Analisis karakterisasi yang umum dilakukan antara lain FFA menggunakan metode titrasi basa, angka peroksida dan angka iod dengan titrasi iodometri.

7

Analisis Abu-Mineral

Pendahuluan Abu

Kadar abu menggambarkan kandungan mineral dari sampel bahan makanan yang merupakan senyawa anorganik sisa hasil pembakaran suatu bahan organik. Semua bahan organik akan terbakar sempurna menjadi air dan CO_2 serta NH_3 sedangkan elemen–elemen tertinggal sebagai produk oksidasinya. Beberapa senyawa anorganik yang terdapat pada bahan pangan antara lain : Kalsium (Ca), Sodium (Na), Besi (Fe), Zink (Zn), Potasium (K), dan Belerang (S).

Tujuan dari analisis kadar abu antara lain :

- Untuk menentukan baik tidaknya suatu proses pengolahan.

  Misalnya pada proses penggilingan gandum di harapkan dapat di pisahkan antara bagian endosperm dengan kulit atau katul dan lembaganya.Apabila masih banyak katul atau lembaga terikut dalam endosperm maka tepung gandum yang di hasilkan akan mempunyai kadar abu yang relatif tinggi.Hal ini karena pada bagian katul kandungan mineralnya dapat mencapai 20 kali lebih banyak dari pada dalam endosperm.

- Untuk mengetahui jenis bahan yang di gunakan.

  Penentuan kadar abu dapat di gunakan untuk memperkirakan kandungan buah yang di gunakan untuk membuat *jelly*. Kandungan abu juga dapat di pakai untuk menentukan atau

membedakan *fruit vinegar* (asli) atau sintesis.

- Penentuan abu total sangat berguna sebagai parameter nilai gizi bahan makanan. Adanya kandungan abu yang tidak larut dalam asam yang cukup tinggi menunjukkan adanya pasir atau kotoran yang lain.

Analisis Kadar Abu

Penentuan abu total dapat di kerjakan dengan pengabuan secara langsung (kering) dan dapat pula secara basah atau cara tidak langsung (basah). Perbedaan pengabunan cara kering dan cara basah yaitu,

- Cara kering biasa di gunakan untuk penentuan total abu dalan suatu bahan makanan dan hasil pertanian,sedangkan cara basah untuk trace elemen.
- Cara kering untuk penentuan abu yang larut dan tidak larut dalam air serta abu yang tidak larut dalam asam memerlukan waktu yang relatif lama sedangkan cara basah memerlukan waktu yang cepat.
- Cara kering memerlukan suhu yang relatif tinggi, sedang cara basah dengan suhu relatif rendah.
- Cara kering dapat di gunakan untuk sampel yang relatif banyak, sedang cara basah sebaiknya sampel sedikit dan memerlukan reagensia yang kadangkala agak berbahaya. Karena menggunakan reagensia maka penentuan cara basah perlu kireksi terhadap reagen yang di gunakan.

1) **Penentuan Kadar Abu secara langsung (Cara Kering)**

Penentuan kadar abu dengan mengoksidasikan semua zat organik pada suhu yang tinggi, yaitu sekitar 500- 600° C dan kemudian melakukan penimbangan zat yang tertinggal setelah proses pembakaran tersebut. Sampel yang akan diabukan ditimbang sejumlah tertentu tergantung macam bahannya.

Bahan yang mempunyai kadar air tinggi sebelum pengabuan harus dikeringkan terlebih dahulu. Bahan yang mempunyai kandungan zat yang mudah menguap dan berlemak banyak pengabuan di lakukan dengan suhu mula- mula rendah sampai asam hilang, baru kemudian di naikkkan suhunya sesuai dengan yang di kehendaki. Untuk bahan yang membentuk buih waktu di panaskan harus di keringkan dahulu dalam oven dan di tambahkan zat anti buih misalnya *olive* atau *parfin.*

Temperatur pengabuan harus di perhatikan sungguh-sungguh karena banyak elemen abu yang dapat menguap pada suhu yang tinggi misalnya K, Na, S, Ca, P. Selain itu suhu pengabuan juga dapat menyebabkan dekomposisi senyawa tertentu misalnya K_2CO_3, $CaCO_3$, $MgSO_4$. Menurut Whichmann (1941), K_2CO_3 terdekomposisi pada 600- 650° C, sedangkan $MgCO_3$ terdekomposisi pada suhu 300- 400 °C. Berikut pada Tabel 6.3 disajikan persentasi kehilangan garam selama pengabuan.

Pengabunan di lakukan dengan muffle yang dapat di atur suhunya, tetapi apabila tidak tersedia dapat menggunakan pemanas buatan.Lama pengabuan tiap bahan berbeda- beda dan berkisar antara 2- 8 jam.Pengabuan di anggap selesai apabila di peroleh sisa pengabuan yang umumnya berwarna putih abu- abu dan beratnya konstant dengan selang waktu pengabuan 30 menit. Penimbangan terhadap bahan di lakukan dalam keadaan dingin,

untuk itu maka krus yng berisi abu yang di ambil dari dalam muffle harus lebih dulu di masukkan ke dalam oven bersuhu 100° C agar supaya suhuny turun, baru kemudian di masukkan kedalam eksikator sampai dingin.Eksikator yang di gunakan harus di lengkapi dengan zat penyerap uap air misalnya silika,gel atau kapur aktif atau kalsium klorida, sodium hidroksida.Agar supaya eksikator dapat mudah di geser tutupnya maka permukaan gelas di olesi oleh *vaselin*.

Perhitungan

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{\text{Berat akhir} - \text{Berat krus porselin}}{\text{Berat Bahan}} \times 100\%$$

2) **Penentuan Kadar Abu secara Tidak Langsung (Cara Basah)**

Pengabuan basah terutama di gunakan untuk digesti sampel dalam usaha penentuan *trace element* dan logam beracun. Pengabuan cara basah prinsipnya adalah memberikan reagen kimia tertentu kedalam bahan di lakukan pengabuan berbagai bahan kimia yang sering di gunakan untuk pengabuan basah dapat di sebut sebagai berikut:

a. Asam sulfat sering di tambahkan ke dalam sampel untuk membantu mempercepat terjadinya reaksi oksidasi.
b. Campuran asam sulfat dan potasium sulfat dapat di pergunakan untuk mempercepat dekomposisi sampel. Potasium sulfat akan menaikkan titik didik asam sulfat sehingga suhu pengabuan dapat di pertinggi dan pengabuan dapat lebih cepat.
c. Campuran asam sulfat, asam nitrat banyak di gunakan untuk mempercepat proses pengabuan. Kedua asam ini merupakan

oksidator yang kuat.Dengan penambahan oksidator ini akan menurunkan suhu 350° C, dengan demikian komponen yag dapat menguap atau terdekomposisi pada suhu tinggi dapat tetap di pertahankan dalam abu yang berarti penentuan kadar abu lebih baik.

d. Penggunaan asam perkhlorat dan asam nitrat dapat di pergunakan untuk bahan yang sangat sulit mengalami oksidasi. Dengan perklorat yang merupakan oksidator yang sangat baik memungkinkan pengabuan dapat dipercepat. Kelemahan perkhlorat adalah bersifat exsplosive atau mudah meledak sehingga cukup berbahaya.Proses pengabuannya sangat cepat yaitu 10 menit sudah dapat di selesaikan.

Penentuan abu yang tidak larut dalam asam di lakukan dengan mencampurkan abu dalam asam klorida 10 %. Setelah diaduk kemudian dipanaskan selanjutnya di saring dengan kertas Whatman nomor 52. Residu merupakan abu yang tidak larut dalam asam yang terdiri atas pasir dan silika.Apabila abu banyak mengandung mengandung abu jenis ini maka dapat di perkirakan proses pencucian bahan tidak sempurna ataupun terjadinya kontaminasi dari tanah selam proses pengolahan bahan tersebut.

Penentuan abu yang larut dalam air di lakukan dengan melarutkan abu ke dalam aquades kemudian di saring. Filtrat kemudian di keringkan dan di timbang residunya.Abu yang larut dalam air ini kadang di gunakan sebagai indeks kandungan buah-buahan yang di awetkan.Cara yang umum dalam penentuan abu yang larut adalah dengan mengabukan residu yang terdapat dalam kertas saring bebas abu pada perlakuan tersebut. Abu yang larut dalam air adalah selisih berat abu mula- mula dengan berat abu yang ada dalam residu tersebut.

Analisis Mineral

Kandungan mineral dapat diketahui dengan lebih teliti menggunakan metode spektrofotometri yang dikenal dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA). Prinsip dari pengukuran menggunakan SSA adalah sampel dipecah menjadi ion melalui tahap *flame* kemudian diukur kuantitasnya berdasarkan data library.

Gambar 7.1 Spektroskopi Serapan Atom

Rekomendasi Metode Analisis Abu-Mineral

Abu sesungguhnya adalah mineral (senyawa anorganik) sisa hasil pembakaran. Analisis abu hanya sebatas tujuan kuantitatif (perhitungan kadar). Tujuan kualitatif untuk mengidentifikasi jenis mineral yang ada paling baik menggunakan metode SSA yaitu, Spektroskopi Serapan Atom.

8

Spektroskopi

Prinsip Kerja Spektroskopi

Prinsip spektroskopi didasarkan pada adanya interaksi dari energi radiasi elektromagnetik dengan zat kimia. Dengan mengetahui interaksi yang terjadi, dikembangkan teknik-teknik analisa kimia yang memanfaatkan sifat-sifat dari interaksi tersebut. Hasil interaksi tersebut bisa menimbulkan satu atau lebih peristiwa seperti : pemantulan, pembiasan, interferensi, difraksi, penyerapan (absorpsi), fluoresensi, fosforiensi dan ionisasi. Dalam analisa kimia, peristiwa absorpsi merupakan dasar dari cara spektroskopi karena proses absorpsi tersebut bersifat unik/ spesifik untuk setiap zat kimia atau segolongan zat kimia (aplikasi kualitatif). Disamping itu adalah kenyataan bahwa banyaknya absorpsi berbanding lurus dengan banyaknya zat kimia (aplikasi kuantitatif).

Instrumen yang digunakan disebut spektrometer atau spektrofotometer yang telah dibuat dalam berbagai merek, model, jenis dengan tingkat kepekaan maupun reprodusibilitas yang semakin tinggih dan canggih. Pengertian yang baik tentang bagaimana instrumen-instrumen tersebut bekerja merupakan prasyarat untuk memperoleh hasil guna yang maksimal dan untuk mengetahui validitas data yang diperoleh. Untuk dapat memahami spektroskopi diperlukan pengetahuan tentang sifat-sifat radiasi

elektromagnetik, interaksinya dengan zat, serta prinsip kerja maupun cara penggunaannya.

Radiasi elektromagnetik mempunyai dua karakter yaitu sebagai gelombang dan partikel. Gelombang elektromagnetik sesuai dengan namanya terdiri dari komponen magnetik, dan hanya komponen listrik yang aktif dalam interaksinya dengan zat kimia. Sebagai gelombang radiasi elektromagnetik mempunyai panjang gelombang (λ), frekuensi (ν), amplitude (A) dan kecepatan (c). Hubungan antara panjang gelombang, frekuensi dan kecepatan dinyatakan oleh persamaan berikut :

$$\lambda v = \frac{c}{n}$$

dimana, λ = panjang gelombang, cm

ν = frekuensi, jumlah siklus/detik atau hertz (Hz)

c = kecepatan cahaya dalam hampa, 3×10^{10} cm/detik

n = indeks bias medium.

Frekuensi radiasi adalah sama dalam setiap medium, hanya kecepatan dan panjang gelombang radiasi yang berubah dari satu medium ke medium yang lain. Panjang gelombang dinyatakan dalam satuan Angstrom (1A° = 10^{-8} cm), nanometer (1 nm = 10^{-7} cm), milimikron (1 m μ = 1 nm) dan mikrometer (1 μ = 10^{-4} cm). Dikenal juga bilangan gelombang ($\bar{v}$) yaitu jumlah gelombang setiap satu cm atau harga kebalikan dari panjang gelombang.

$$\bar{v} = \frac{1}{\lambda(\mathrm{cm}^{-1})}$$

Peristiwa-peristiwa optik seperti pemantulan, pembiasan, interferensi, difraksi adalah contoh-contoh yang berkaitan dengan sifat radiasi elektromagnetik sebagai gelombang. Untuk menerangkan peristiwa absorpsi energi radiasi oleh zat kimia,

maka radiasi elektromegnetik dipandang sebagai partikel-partikel energi yang disebut foton. Oleh max Planck dinyatakan bahwa energi setiap foton berbanding langsung dengan frekuensi radiasi dan hal ini dinyatakan dalam persamaan :

$$E = \mathrm{hv} = \frac{(\mathrm{hc})}{(\mathrm{n}\lambda)}$$

dimana, E = energi foton (radiasi), Joule (J)

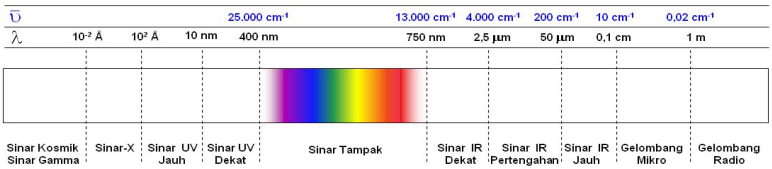
h = tetapan Planck, 6,624 x 10^{-34} joule detik

Foton yang memiliki frekuensi tinggi (panjang gelombang pendek) mempunyai energi yang lebih tinggi dari foton yang berfrekuensi rendah (panjang gelombang panjang). Intensitas berkas sinar sebanding dengan jumlah foton dan tak bergantung dengan energi foton. Energi selain dinyatakan dalam Joule, dapat dinyatakan dengan cara lain yaitu "erg" (1 joule = 10^7 erg), "electron volt" (1 eV = 1, 6021 x 10^{-19}) joule) atau dalam "kcal/mol" (1 eV = 23,06 kcal/mol).

Radiasi elektromagnetik meliputi banyak panjang gelombang mulai dari radiasi yang mempunyai frekuensi (energi) yang sangat rendah sampai yang sangat tinggi dan disebut *spektrum elektromagnetik*. Spektrum tersebut bisa dibagi dalam daerah-daerah spektrum yang lebih kecil.

Radiasi yang yang dapat dilihat oleh manusia disebut cahaya tampak/terlihat yang meliputi daerah panjang gelombang dari 400-700 nm, dan merupakan campuran dari warna-warna seperti yang terlihat pada pelangi. Apabila suatu larutan mendapat irradiasi sinar polikhromatik yaitu sinat yang terdiri dari beberapa macam warna, maka diserap, sedang yang lainnya diteruskan

melalui larutan tersebut.



Gambar 8.1 Klasifikasi Kisaran Spektrum Elektromagnetik

Sinar yang mempunyai warna sama dengan larutan tidak diserap oleh larutan tersebut, tapi akan diteruskan. Warna yang diteruskan yang sebenarnya merupakan warna dari larutan tersebut adalah merupaka warna komplementer dari warna yang tidak diteruskan atau yang diserap. Sebagai contoh apabila suatu larutan menyerap bagian sinar biru dari spektrum sinar (λ = 475 nm), maka larutan kelihatan berwarna kuning yaitu komplementer dari warna biru. Beberapa warna dan warna komplementer dalam spektrum cahaya tampak tercantum dalam Tabel 8.1.

Tabel 8.1 Panjang Gelombang dan Warna

Panjang gelombang (nm)	Warna	Warna Komplementer (sampel)
400 - 435	Violet (ungu)	Hijau Kekuningan
435 - 480	Biru	Kuning
480 - 490	Biru Kehijauan	Jingga
490 - 500	Hijau Kebiruan	Merah
500 - 560	Hijau	Ungu Kemerahan
560 - 595	Hijau Kekuningan	Ungu
595 - 610	Jingga	Biru Kehijauan
610 - 680	Merah	Hijau Kebiruan
680 - 700	Ungu Kemerahan	Hijau

Interaksi radiasi elektromagnetik dengan zat kimia yang penting dalam spektroskopi adalah proses absorpsi dan emisi, karena itu ada spektroskopi absorpsi dan emisi. Setiap atom atau

molekul memiliki energi. Bila suatu molekul memiliki energi pada tingkat yang paling rendah, maka molekul tersebut berada dalam keadaan "tingkat dasar". Bila molekul tersebut mengabsorpsi energi radiasi, maka energi molekul tersebut menjadi lebih besar sehingga molekul tersebut berada dalam keadaan "tingkat tereksitasi".

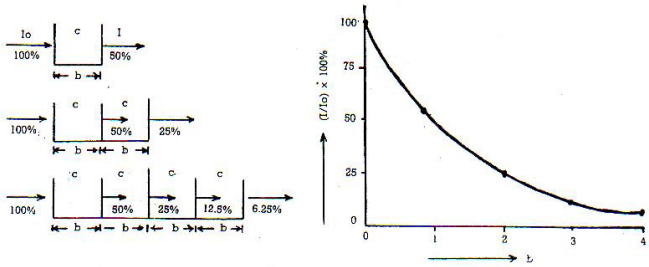
Besarnya perbedaan energi dari tingkat dasar ke tingkat tereksitasi bersifat spesifik untuk setiap molekul. Proses penyerapan terjadi bila besarnya energi radiasi yang diberikan pada zat kimia tersebut sama besarnya dengan energi yang dibutuhkan oleh zat kimia tersebut untuk beralih ke tingkat tereksitasi. Dengan kata lain proses absorpsi radiasi oleh suatu zat kimia tertentu hanya akan terjadi bila radiasi mempunyai panjang gelombang atau frakuensi yang sama pula. Perlu diketahui bahwa molekul-molekul berkecenderungan untuk tidak tetap ada dalam keadaan tereksitasi, namun ingin melepaskan energi yang berlebih. Biasanya energi turun tingkatnya menjadi kalor dengan suatu proses yang berkaitan dengan benturan-benturan dengan molekul-molekul lain. Kadang-kadang energi dipancarkan kembali (emisi) sebagai radiasi dengan panjang gelombang yang lebih panjang, peristiwa ini dikenal sebagai fluorosensi (jika ada penundaan waktu tertentu dalam pemacaran kembali disebut fosforisensi).

Dalam mempelajari sifat kuantitatif dari absorpsi radiasi, berkas radiasi dikenakan pada sampel dan kemudian intensitas radiasi yang diteruskan/ditransmisikan diukur. Sampel dapat berupa gas, lapisan tipis cairan, larutan dalam berbagai pelarut bahkan padat. Kebanyakan pekerja analisa menyangkut larutan, dimana zat yang dianalisa (zat penyerap radiasi) dilarutkan langsung dalam pelarutnya atau sebelumnya mengalami perlakuan

kimia sehingga mampu mengabsorpsi radiasi. Radiasi yang diabsorpsi oleh sampel ditentukan dengan membandingkan intensitas dari berkas radiasi yang diteruskan bila zat penyerap tidak ada dengan intensitas yang diteruskan bila zat penyerap ada. Jika radiasi yang mengenai sampel memiliki energi yang sama dengan yang dibutuhkan untuk menyebabkan terjadinya perubahan energi, maka terjadilah absorpsi.

Hukum Lambert Beer pada Spektsroskopi

Hubungan antara absorpsi radiasi dan panjang jalan medium penyerap (tebal larutan penyerap dalam tabung kuvet) pertama kali dirumuskan oleh Bouguer (1729), meskipun kadang-kadang dianggap berasal dari Lambert (1766). Bila suatu medium penyerap dibagi menjadi lapisan-lapisan imajiner yang sama tebalnya dan suatu berkas radiasi monokhromatik (radiasi dengan satu macam panjang gelombang) diarahkan melewati medium, maka diketahui bahwa tiap lapisan akan menyerap bagian yang sama dari radiasi. Misalnya lapisan pertama menyerap 50%, maka akan diteruskan tinggal 50% dan selanjutnya diserap lagi 50% oleh lapisan kedua sehingga diteruskan tinggal 25% dari intensitas radiasi semula, demikian seterusnya untuk lapisan-lapisan berikutnya. Untuk jelasnya dapat dilihat pada Gambar 8.2.



Gambar 8.2. Kuantitasi proses absorpsi radiasi oleh medium penyerap.

Dari pernyataan di atas yang diperjelas dengan gambar kurva proses absorpsi dapat dijabarkan secara matematis sebagai berikut:

$$-\frac{dI}{db} = k_1 I \ldots\ldots\ldots\ldots(1)$$

Persamaan (I) menyatakan bahwa berkurangnya intensitas, – dI untuk setiap ketebalan medium penyerap, db, adalah berbanding lurus dengan intensitas, I, di mana k adalah suatu tetapan. Persamaan tersebut disusun sebagai berikut :

$$-\frac{dI}{I} = k_1 db \ldots\ldots\ldots\ldots(2)$$

dengan mengintegrasikan antara batas-batas I dan I; serta 0 dan b maka akan diperoleh :

$$-\int_{I_0}^{I} \frac{dI}{I} I_1 \int_0^b db$$

$$-(\mathrm{In}I - \mathrm{In}I_0) = k_1 b$$

$$\mathrm{In}I_0 - \mathrm{In}I = k_1 b$$

$$\mathrm{In}\frac{I_0}{I} = k_1 b \ldots\ldots\ldots\ldots(3)$$

Bila persamaan (3) dituliskan dengan logaritma dasar, maka harga tetapan k_1 berubah dan diberi simbol k_2, di mana k_1= 2,303 k, sehingga persamaan dapat dituliskan :

$$\log\frac{Io}{I} = k_2 b \ldots\ldots\ldots\ldots(4)$$

Dimana : Io = intensitas radiasi yang masuk

I = intensitas radiasi yang diteruskan

k_2 = suatu tetapan

b = tebal medium penyerap

Dari persamaan (4) Nampak bahwa intensitas radiasi yang diteruskan berkurang secara eksponensial jika tebal medium

penyerap bertambah secara aritmatik.

Hubungan antara kadar zat penyerap dan dasarnya adsorpsi radiasi dirumuskan oleh Beer (1819). Hukum Beer analog dengan hukum Bouguer dalam menjabarkan pengurangan eksponensial dari intensitas radiasi yang diteruskan karena peningkatan aritmatik dari kadar zat penyerap, sehingga diperoleh persamaan :

$$\log \frac{I_0}{I} = k_1 c \text{.....(5)}$$

Dimana : k_1 = suatu tetapan

c = kadar penyerap

Apabila persamaan (4) dan (5) digabung pada suatu harga yang sama, amak diperoleh :

$$\log \frac{I_0}{I} = k_2 b = k_3 c \text{.....(6)}$$

Jadi ; k_2 b = k_3 c, atau dituliskan sebagai berikut :

$$\frac{k_2}{c} = \frac{k_1}{b} = a \text{ (a = suatu tetapan)}$$

Maka diperoleh : k_2 = a c dan k_3 = a b, dan apabila disubtitusikan ke persamaan Hukum Bouguer dan Beer didapat :

Hukum Bouguer : $\log \frac{I_0}{I} = k_2 b = a\ b\ c$

Hukum Beer : $\log \frac{I_0}{I} = k_3 b = a\ b\ c$

Maka sekarang diperoleh persamaan baru yaitu :

$$\log \frac{I_0}{I} = a\ b\ c \text{.....(7)}$$

Persamaan (7) tersebut di atas dikenal sebagai Hukum Bouguer-Beer atau Hukun Beer-Lambert atau lebih mudahnya disebut

Hukum Beer.

Log $(\frac{I_0}{1})$ disebut "optical density", OD, atau absorbansi, (A). sedang $\left(\frac{I}{I_0}\right)$ disebut transmitansi, T, yaitu proporsi radiasi yang diteruskan. Bila T dikalikan dengan 100% disebut proses transmitansi, % T. Hubungan absorbansi dengan transmitansi adalah :

$$\log\frac{I_0}{I} = A = -\log T = \log\left(\frac{I}{T}\right) \quad \ldots\ldots\ldots(8)$$

Dengan menggunakan notasi-notasi yang disebut di muka, maka Hukum Beer dapat dituliskan sebagai berikut :

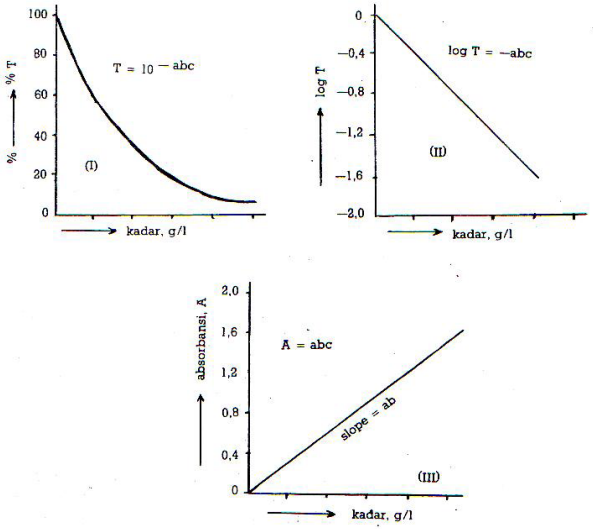
$$A = a\ b\ c \quad \ldots\ldots\ldots(9)$$

$$\log T = -a\ b\ c \quad \ldots\ldots\ldots(10)$$

$$T = 10^{-abc} \quad \ldots\ldots\ldots(11)$$

Tebal medium penyerap, b, biasanya dinyatakan dalam sentimeter, sedang untuk kadar zat penyerap, c, dapat dinyatakan dalam berbagai cara seperti : % (mg/100 ml), molar (M), g/I ataupun cara lain yang menyatakan kadar. Karena itu harga tetapan, a, akan tergantung pada satuan kadar yang digunakan. Bila satuan kadar adalah g/I maka tetapan tersebut disebut absortivitas dengan simbol "a", sedang bila satuan kadar adalah molar, M, tetapannya disebut absortivitas molar dengan simbol "ε" atau "E". Pernyataan lain untuk absortivitas adalah ekstingsi jenis, koefisien ekstingsi Bunsen atau absorpsi jenis. Demikian pula beberapa pengarang lain menamakan absorptivitas molar dengan koefisien ekstingsi molar atau ekstingsi molekular. Maka jelaslah bahwa ε = a x BM (BM adalah berat molekul zat penyerap). Satuan tetapan ε, adalah liter/molem. Harga tetapan α adalah karakteristik

untuk molekul atau ion penyerap dalam pelarut tertentu dan pada panjang gelombang tertentu. Harga ε tidak tergantung pada kadar dan panjang lintasan radiasi. Apabila Hukum Beer seperti pada persamaan (9), (10) dan (11) masing-masing disajikan dalam grafik maka diperoleh gambaran grafik seperti tercantum pada Gambar 8.3.

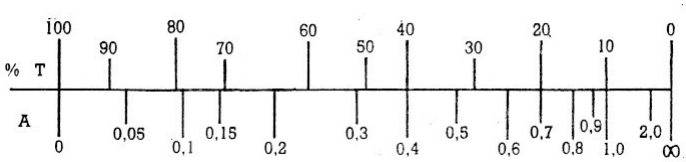


Gambar 8.3 Grafik Hukum Beer

Pada umumnya dalam pekerjaan analisa kimia, orang lebih suka menggunakan hubungan antara absorbansi dan kadar zat yang berupa garis lurus (linier). Jadi apabila tebal medium penyerap tetap (sama) maka besarnya absorbansi berbanding lurus dengan kadar zat.

Pengukuran radiasi yang dikerjakan oleh instrumen spectrometer biasanya sinyal linier yaitu dalam transmitansi. Maka jika ingin dibaca sebagai absorbansi, harus ada sebuah skala logaritma pada skala pembacaannya atau sinyal harus

diubah secara logaritma oleh suatu rangkaian elektronik ataupun mekanik. Perbandingan skala pembacaan dengan transmitansi dan absorbansi ditunjukkan seperti pada persamaan (8).



Gambar 8.4 Perbandingan skala absorbansi dan transmitansi

Dengan hukum Beer ini maka dengan mengukur absorbansi atau transmitansi dapat ditentukan besarnya kadar suatu zat. Bila tebal medium penyerap dan absorptivitas diketahui. Besarnya absorptivitas ditentukan dengan cara mengukur absorbansi suatu zat yang sama pada berbagai kadar yang telah diketahui. Kadar zat dapat dinyatakan dalam berbagai (misalnya, %, molar, g/L, mg/100 mL, dan lain sebagainya).

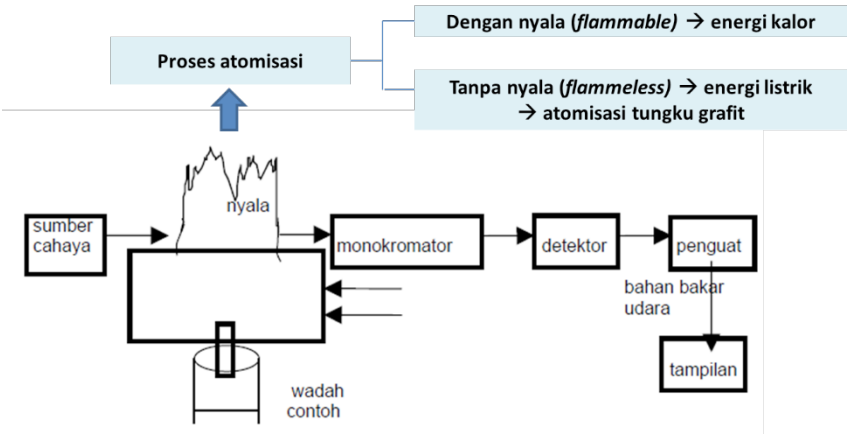
Metode Spektroskopi untuk Analisis Pangan

1) **Spektroskopi Serapan Atom (SSA)**

Prinsip dari analisis menggunakan SSA yaitu penyerapan sinar pada panjang gelombang tertentu (10^{-10} - 10^{-12} *m*) oleh atom logam dalam keadaan bebas. SSA biasa digunakan untuk analisis kuantitatif. SSA inilah yang digunakan untuk mengukur kandungan logam (misal Fe, Al, Cu) yang terkandung pada sampel.

Bila sinar dengan panjang gelombang tertentu dilewatkan pada suatu sel yang mengandung atom-atom bebas maka sebagian sinar tersebut akan diserap dan intensitas penyerapannya akan berbanding lurus dengan banyaknya atom bebas logam yang

berada di dalam sel. Hal ini sesuai dengan Hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert : Bila suatu sumber sinar monokromatik melewati medium transparan, intensitas sinar yang diteruskan akan berkurang dengan bertambahnya ketebalan medium yang mengabsorpsi. Hukum Beer : Intensitas sinar yang diteruskan berkurang secara eksponensi dengan bertambahnya konsentrasi spesi yang menyerap sinar tersebut. Berikut merupakan skema dari mekanisme kerja dari SSA.



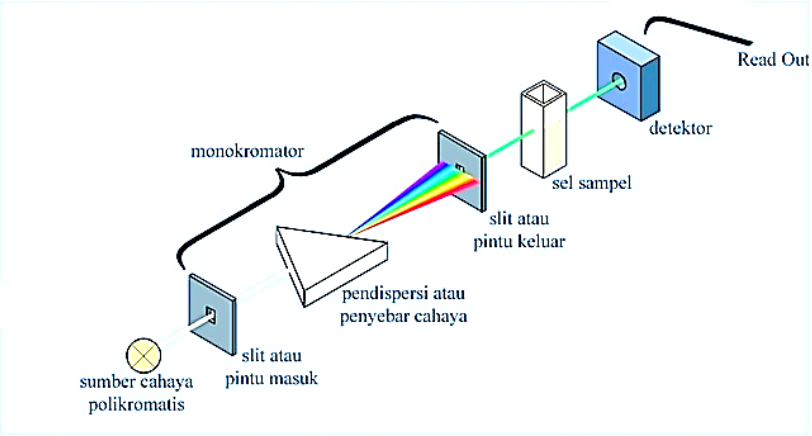
Gambar 8.5 Mekanisme Kerja SSA

Mekanisme kerja dari proses SSA secara garis besar dapat dilihat pada Gambar 8.5. Analisis dengan SSA bermula dari proses atomisasi dari sampel anorganik yang diukur. Proses atomisasi pada SSA bisa terjadi dengan dua cara yaitu dengan nyala *(flammable)* dan tanpa nyala *(flameless)*. Proses atomisasi melalui *flammable* menggunakan energi kalor sedangkan proses *flameless* menggunakan energi listrik. SSA dengan nyala *(flammable)* lebih umum ditemui dalam praktek kegiatan analisis. Sampel yang telah mengalami atomisasi kemudian dilewatkan pada bagian monokromotor yang mengubah sumber cahaya

menjadi monokromatis. Hasil kemudian dideteksi di detektor dan kemudian diperolehlah kuantitatif senyawa anorganik yang diteliti sesuai standar yang digunakan.

2) **Spektroskopi UV-Vis**

Prinsip analisis menggunakan spektroskopi UV-Vis yaitu penyerapan sinar UV dan UV-Vis oleh suatu senyawa. Pengukuran dengan instrumen UV-Vis dikhususkan untuk senyawa yang berwarna. Daerah UV yaitu pada serapan 200-350 nm dan daerah UV-Vis pada serapan 350-800 nm. Penyerapan sinar uv-vis mengakibatkan transisi elektronik, hal ini berhubungan dengan perpindahan elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah *(ground state)* ke orbital eksitasi yang berenergi lebih tinggi (*excited state)*. Hukum Lambert Beer juga berlaku di spektro UV-Vis ini. Berikut merupakan sistematika kerja dari spektro UV-Vis.



Gambar 8.6 Mekanisme Kerja Spektro UV-Vis

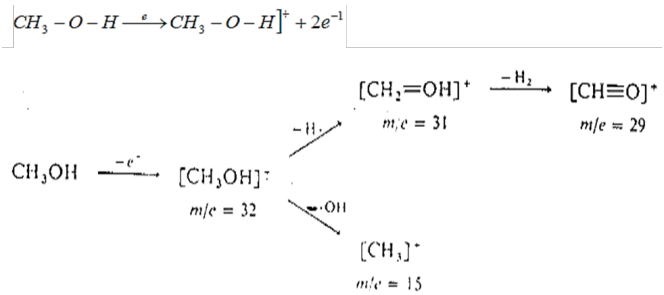
Mekanisme kerja spektro UV-Vis dimula dari pelewatan sumber cahaya polikromatis ke bagian monokromotor untuk

mengubahnya menjadi sinar monokromatis. Sampel yang akan dianalisa dituangkan ke dalam kuvet (sel) yang akan dilewati sinar tersebut. Sinar monokromatis melewati sel yang berisi sampel kemudian hasilnya dideteksi oleh detektor. Hasil pengukuran UV-Vis berupa puncak *(peak)* di lamda tertentu yang bisa digunakan untuk analisis tujuan kualitatif ataupun kuantitatif.

Pada prakteknya, spektro UV-Vis banyak digunakan untuk analisis bahan pangan. Fungsi UV-Vis yang mampu mengukur absorbansi (serapan) dari konsentrasi suatu zat melalui intensitas warna. Analisis kualitatif seperti halnya gula total dengan reagen Anthrone, menghasilkan senyawa kompleks berwarna biru kehijauan. Analisis ini kemudian bisa dikembangkan lebih lanjut untuk tujuan kuantitatif melalui pengukuran UV-Vis. Intensitas warna yang diperoleh, dengan pengukuran awal larutan standar untuk menentukan persamaan regresi, menjadi metode bagaimana konsentrasi suatu zat bisa diperoleh melalui UV-Vis.

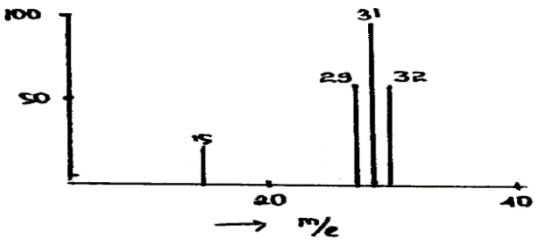
3) **Spektroskopi Massa (MS)**

Prinsip dari alat MS adalah penembakan molekul senyawa menjadi ion-ion positif bertenaga tinggi menjadi suatu ion pecahan, kation radikal, ataupun suatu fragmen. MS *(Mass Spectroscopy)* dihunakan untuk tujuan analisis kualitatif melalui penguatan hipotesis identifikasi suatu sampel berdasarkan massa atom relatifnya (Mr).



Gambar 8.7 Contoh Fragmentasi pada MS untuk Pengukuran Mr Metanol

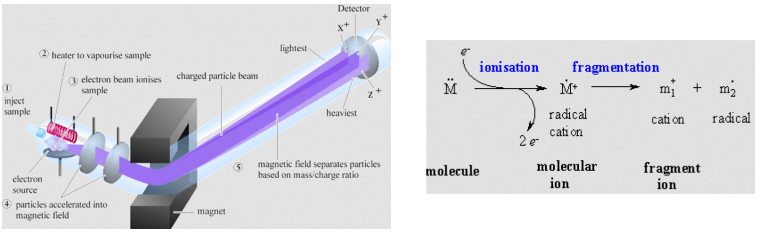
Gambar 8.7 menunjukkan bagaimana senyawa metanol (CH_3OH) mengalami fragmentasi di dalam MS kemudian direkam sebagai fraksi radikal dan juga fraksi positif. Setiap fragmen yang terbentuk diukur oleh alat massa molekulnya (simbol "m/z atau m/e). Spektrum paling ujung *(parents fragmen)* merupakan Mr senyawa sampel secara total.



Gambar 8.8 Spektrum MS dari Metanol

Keberadaan MS sendiri saat ini sudah tidak lagi berdiri sendir sebagai spektroskopi tunggal namun sudah mulai digabung menjadi instrumen GC-MS *(Gass Chromatography-Mass Spectroscopy),* LC-MS *(Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy),* masuk ke dalam bagian HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatography),* ataupun TOF-MS *(Time of Flight-*

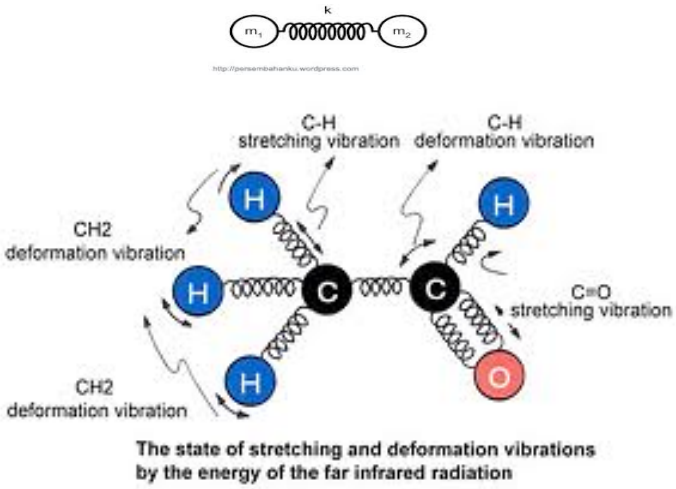
Mass Spectroscopy). Fungsi MS pada instrumen tersebut fokus pada tujuan kualitatif dan kuantitatif sedangkan gandengannya kromatografi fokus pada tujuan pemisahan. Mekanisme kerja instrumen MS dapat dilihat pada Gambar 8.9.



Gambar 8.9 Mekanisme Kerja MS

4) **Spektroskopi Infra Red (IR)**

Spektroskopi IR *(Infra Red)* memiliki prinsip kerja penyerapan sinar inframerah oleh suatu senyawa pada sampel. Pendeteksian penyerapan sinar inframerah berdasarkan vibrasi (getaran) yang dilakukan oleh atom-atom molekul pada sampel. Spektro IR biasa digunakan untuk tujuan analisis kualitatif dengan cara mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa. Hal ini dikarenakan masing-masing gugus fungsi memiliki vibrasi dengan penyerapan sinar inframerah tertentu (Gambar 8.10).



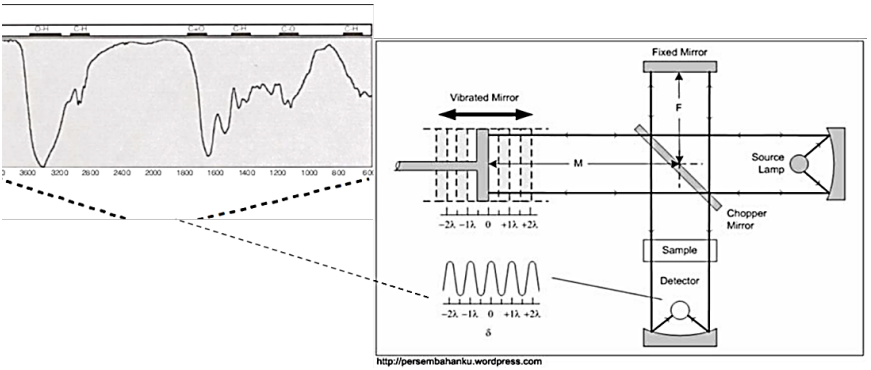
Gambar 8.10 Ilustrasi Getaran pada Suatu Gugus Fungsi

Setiap gugus fungsi memiliki ikatan kimia dengan kemampuan vibrasi yang berbeda, hal inilah yang ditangkap oleh spektro IR. Spektro IR menangkap kekuatan getaran seperti halnya pegas yang bergerak dengan panjang ikatan dan kekuatan tertentu. Hasil pengukuran dengan spektro IR adalah data bilangan gelombang (v) yang digunakan sebagai acuan identifikasi gugus fungsi apa yang dimiliki sampel.

Bond type	Approximate $\tilde{\nu}$ (cm^{-1})	Intensity
O−H	3600–3200	strong, broad
N−H	3500–3200	medium
C−H	~3000	
• C_{sp^3}−H	3000–2850	strong
• C_{sp^2}−H	3150–3000	medium
• C_{sp}−H	3300	medium
C≡C	2250	medium
C≡N	2250	medium
C=O	1800–1650 (often ~1700)	strong
C=C	1650	medium
	1600, 1500	medium

Gambar 8.10 Rangkuman Bilangan Gelombang Gugus Fungsi Tertentu

Sampel yang akan dianalisis dihancurkan terlebih dahulu kemudian dimasukkan ke dalam sel KBr. Sel kemudian dilewatkan sinar inframerah. Hasil pengukuran spektro IR dapat dilihat pada Gambar 8.11.



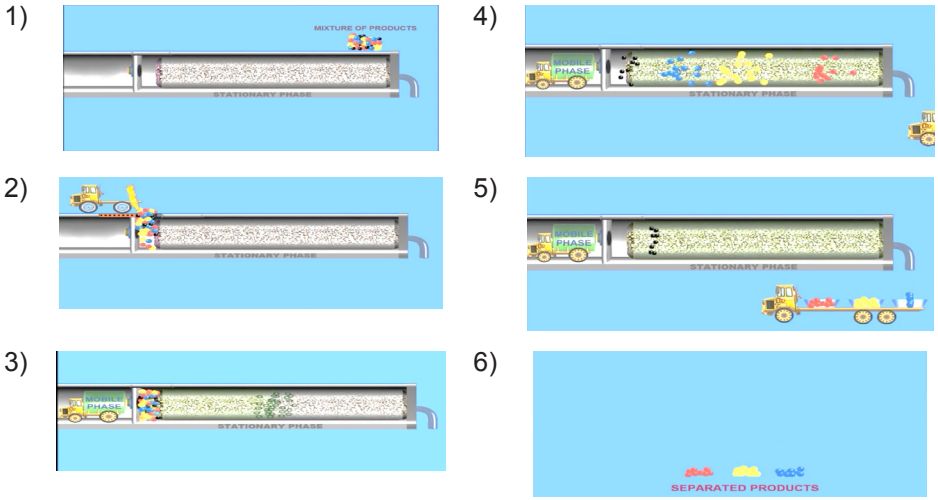
Gambar 8.11 Mekanisme Kerja Spektro IR dan Spektrum Hasil IR

9

Kromatografi

Prinsip Pemisahan dengan Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang didasarkan atas perbedaan afinitas senyawa-senyawa yang sedang dianalisis terhadap dua fasa yaitu, fasa diam (*stationary phase)* dan fasa gerak *(mobile phase)*. Afinitas adalah kecenderungan suatu unsur atau senyawa untuk membentuk ikatan dengan unsur atau senyawa lain. Fasa gerak dan fasa diam pada metode kromatografi merupakan kunci dari pemisahan. Fasa diam pada kromatografi sebagian besar berupa silika yang bersifat polar sedangkan fasa gerak berupa gas ataupun pelarut mulai dari fasa non polar sampai polar. Prinsip pemisahan *like dissolve like* lah yang menjadi kunci dari terjadinya pemisahan. *Like dissolve like* berrarti suatu senyawa akan terpisah berdasarkan kesesuaian dengan kepolaran dari pelarut yang dimiliki. Pada kromatografi pemisahan *like dissolve like* menyebabkan dua interaksi yaitu, interaksi antara sampel dengan fasa diam dan fasa gerak. Hal ini menyebabkan, setiap senyawa dengan kepolaran tertentu akan terpisah dengan waktu yang berbeda. Ilustrasi mekanisme pemisahan pada kromatografi secara dasar dapat dilihat pada Gambar 9.1.



Gambar 9.1 Ilustrasi Pemisahan pada Kromatografi

Berdasarkan Gambar 9.1, berikut penjelasan ilustrasi pemisahan menggunakan kromatografi. Pada tahap ilustrasi (1) menunjukkan bahwa pada sampel bahan alam terdapat berbagai jenis senyawa dengan kepolaran yang berbeda. Perbedaan kepolaran itulah yang dibidik untuk dipisahkan dengan prinsip kromatografi yaitu, perbedaan pemisahan pada fasa diam dan fasa gerak. Terlihat pada tahap (2), sampel dimasukkan ke dalam kolong fasa gerak. Pada prakteknya, kolom fasa gerak ini bisa mewakili kondis kolom gravitasi yang berisi silika (polar). Gambar tahap (3), menunjukkan bahwa fasa gerak (pelarut), dielusikan melewati kolom fasa diam. Pada prakteknya, fasa gerak berupa pelarut yang dielusi meningkat kepolarannya mulai dari non polar hingga sangat polar. Gambar tahap (4) pemisahan mulai terjadi, menghasilkan fraksi warna “merah”, “kuning”, dan “biru”. Terlihat pada gambar tahap (5) bahwa fraksi pemisahan memiliki waktu urutan terpisah yang berbeda. Fraksi warna “merah”lebih dulu terpisah disusul oleh warna “kuning”dan “biru”. Pada prakteknya

hal ini mewakili parameter Rf atau RT *(Retention Time)* pada pemisahan kromatografi yang instrumen. Tahap (6) pada akhir pemisahan dihasilkan 3 komponen. Fasa diam polar, fasa gerak dari non polar ke polar sehingga tingkat kepolaran senyawa yang dihasilkan pada ilustrasi tersebut kepolaran "merah"< "kuning"< "biru". Hal ini dikarenakan fraksi "biru"lebih tertahan di fasa diam karena sama-sama polar (Ingat prinsi *Like dissolve Like)*. Adanya proses "penahanan" dari fraksi diam dan terbawanya senyawa yang kurang polar lainnya pada satu kesatuan sampel inilah yang mengakibatkan proses pemisahan itu terjadi.

Pemisahan dengan kromatografi memiliki beberapa tujuan antara lain :

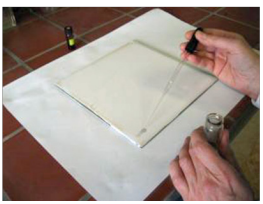
- Identifikasi komponen zat à Analisis kualitatif
- Penetapan kadar suatu komponen zat à Analisis kuantitatif
- Pemurnian suatu zat menjadi senyawa murni à Preparatif sampel.

Analisis dengan Kromatografi

Kromatografi terdiri atas dua jenis yaitu kromatografi non instrumen dan kromatografi instrumen. Kromatografi non instrumen terdiri atas kromatografi preparatif, kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kolom gravitasi (KKG), kromatografi cair vakum (KCV), dan kromatografi radikal (KR). Kromatografi instrumen terdiri atas GC-MS *(Gass Chromatography-Mass Spectroscopy)*, LC-MS *(Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy)*, masuk ke dalam bagian HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatography)*.

1) **Kromatografi Preparatif**

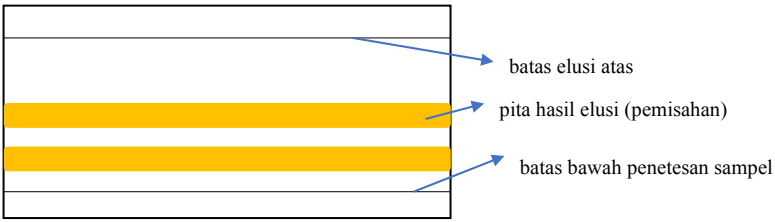
Kromatografi preparatif merupakan teknik pemisahan kromatografi yang paling sederhana. Sesunggunya, teknik ini merupakan *upgrade* dari kromatografi kertas yang menggunakan kertas saring sebagai fasa diamnya. Bertujuan untuk peningkatan efektifitas dalam pemisahan, kromatografi kertas dikembangkan menjadi kromatografi preparatif.



Gambar 9.2 Kromatografi Preparatif

Kromatografi preparatif terdiri atas fasa diam yang dibuat dari kaca biasa dimana di atas kaca tersebut ditambahkan silika (PF 254 = 366). Silika yang dibuat bubur *(slurry)* menggunakan pelarut aquades kemudian dipress di atas plat kaca. Plat kaca dikeringkan dan jadilah fasa diam.

Proses pemisahan dilakukan dengan membuat garis batas bawah dan garis batas atas. Sampel yang akan dipisahkan, diencerkan terlebih dahulu dengan pelarut non polar yang melarutkan kemudian diteteskan secara merata di batas garis bawah elusi dengan menggunakan pipet pasteur dengan pola memanjang.



Gambar 9.3 Skema Plat Kromatografi Preparatif

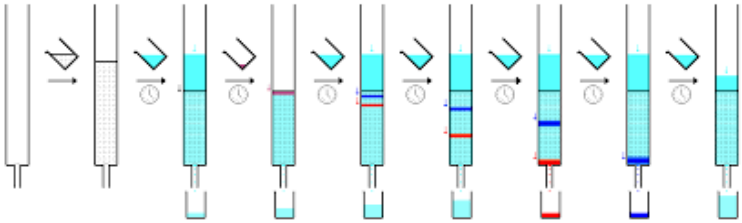
Plat yang telah ditetesi sampel kemudian dimasukkan ke dalam chamber (Gambar 9.2) kemudian pelarut akan bergerak (mengelusi sampel). Sampel akan terpisah berdasarkan perbedaan afinitas pada plat (fasa diam) dan pelarut (fasa gerak). Fraksi yang polar akan berada di bawah (tertahan fasa diam karena silika bersifat polar) sedangkan fraksi yang lebih non polar akan terpisha lebih ke atas. Setelah terbentuk pita, silika dikerok berdasarkan warna atau gradiasi warna yang dihasilkan. Kerokan kemudian dicuci dengan pelarut yang sesuai dan disaring. Filtrat yang diperoleh dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dan diperoleh ekstrak.

Pemisahan dengan kromatografi preparatif sangat sederhana namun memiliki kelemahan yaitu, hasil pemisahan yang diperoleh tidak terlalu banyak karena sampel yang dijerapkan ke fasa diam hanya sebatas tetesan pada plat pasteur tersebut. Pemisahan kemudian disempurnakan dengan pemisahan kolom gravitasi.

2) Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

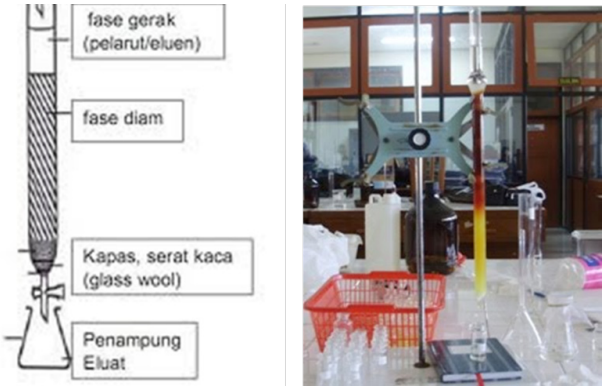
Kromatografi kolom gravitasi merupakan teknik pemisahan yang paling sering digunakan. Sesuai namanya, teknik ini menggunakan kolom yang berisi silika (7734) sebagai fasa diamnya. Sampel yang akan dipisahkan diteteskan di atas kolom

kemudian dielusi (dilewatkan pelarut) sampai terjadi pemisahan. Hasil pemisahan berupa pita-pita seperti hal ny apada kromatografi preparatif. Hanya saja dengan pemisahan KKG ini, fraksi bergerak seiring bergeraknya tetesan eluen akibat gaya gravitasi. Hasil pemisahan tiap pita ditampung kemudian diperolehlah ekstrak hasil pemisahan.



Gambar 9.4 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

Pita yang turun terlebih dahulu memiliki waktu retensi yang lebih pendek. Pita ini adalah fraksi sampel yang lebih non polar (karena yang polar tertahan di silika). Hasil pemisahan inilah yang menjadi cikal bakal parameter data RT pada kromatografi instrumen yang digunakan *library* alat tersebut untuk mendeteksi identititas senyawa yang berhasil dipisahkan.

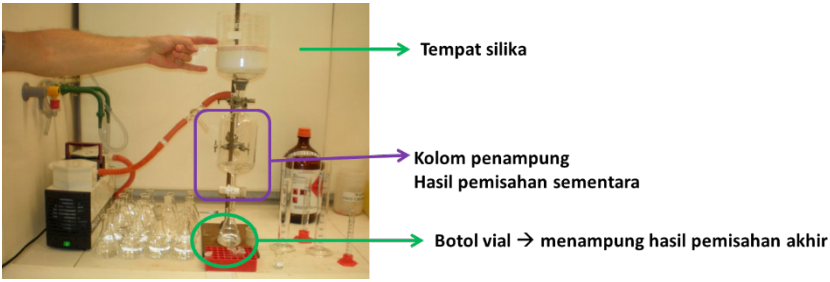


Gambar 9.5 Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

Pemisahan dengan KKG mengandalkan menetesnya pelarut dengan gravitasi sehingga kecepatan pemisahan relatif lama. Jumlah sampel yang dipisahkan juga tidak terlalu banyak sehingga pemisahan dengan KKG lebih cocok untuk kegiatan isolasi dan pemurnian dibandingan pemisahan awal saat diperoleh ekstrak kasar dari hasil maserasi (perendaman sampel). Alasan inilah yang kemudian digunakan sebagai pengembangan terciptanya Kromatografi Cair Vakum (KCV).

3) Kromatografi Cair Vakum (KCV)

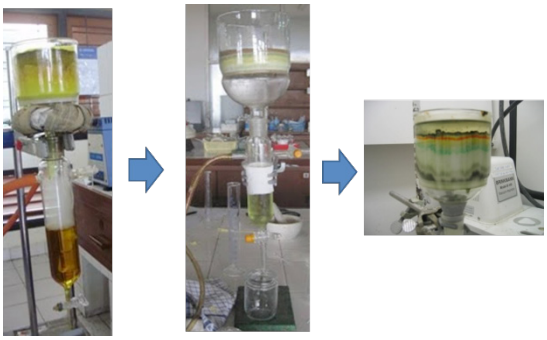
Pada saat suatu bahan alam akan dipisahkan menjadi fraksi-fraksi bahkan sampai diperoleh senyawa murni, tahapan awal yang harus dilakukan adalah partisi atau fraksinasi ekstrak kasar hasil maserasi. Maserasi adalah proses ekstraksi awal simplisia yang akan dipisahkan. Ekstrak yang akan dipisahkan pastinya memiliki massa yang besar sehingga membutuhkan kolom yang diameternya besar dan kecepatan elusinya tinggi. Berdasarkan tujuan tersebut, muncullah KCV sebagai solusi fraksinasi atau partisi ekstrak kasar awal.



Gambar 9.6 Pemisahan dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Silika (7731) disiapkan terlebih dahulu pada kolom KCV yang berdiameter besar. Preparasi silika ini harus dilakukan dengan

baik agar tidak ada ruang kosong antara silika yang dihasilkan. Pada Gambar 9.6 dapat dilihat bahwa terdapat kolom penampung hasil pemisahan sementara karena saat pelarut dituangkan di atas kolom, pelarut akan turun dengan cepat karena adanya tarikan dari penghisap (vakum). Pemisahan ditampung pada botol-botol. Permainan pemilihan sistem pelarut sangat menentukan keberhasilan dari pemisahan dengan KCV ini. Pelarut yang digunakan sama prinsipnya, dari non polar ke polar.



Gambar 9.7 Hasil Pemisahan dengan KCV

4) **Kromatografi Radikal (KR)**

Ketika kegiatan isolasi dilakukan, pilihan kromatografi non instrumen KKG tidak terlalu efektif dari segi waktu. Tujuan isolasi sampai diperoleh senyawa murni membutuhkan teknik pemisahan *upgrade* dari kromatografi kolom yang lebih unggul dari segi efektefitas waktu dan hasil pemisahan. Berdasarkan hal inilah, muncullah teknik kromatografi radial (KR).

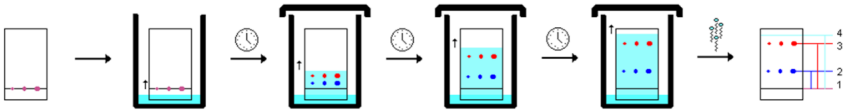
Gambar 9.8 Kromatografi Radial (KR)

Fasa diam yang digunakan adalah silika (7733) yang berpendar jika disorot di bawah sinar lampu UV 254 dan 366 nm. Fasa diam ini berupa silika yang dipress di plat kacara lempengan bulat seperti CD yang disebut kromatoton. Plat ini akan ditetesi sampel dari lubang atas tengah, fasa gerak akan mengalir melalui infus. Kromatotor akan berputas sehingga pemisahan relatif cepat dibandingkan kromatografi kolom grafitasi. Hasil pemisahan dapat diamati secara baik dengan menggunakan lampu UV. Senyawa akan terlihat seperti pita hitam sehingga pemisahan bisa dikontrol secara baik. Permainan penggunaan sistem eluen (pelarut) sangat menentukan keberhasilan pemisahan ini. Pemisahan dengan KR sangat cocok sampai tahap pemurnian hingga diperoleh isolat murni.

Gambar 9.9 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Radial di bawah Lampu UV-Vis

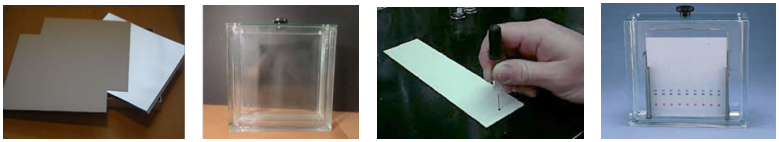
5) **Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Hasil pemisahan dari kromatografi kolom ataupun radial selalu membutuhkan satu tahapan untuk mengecek hasil. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) inilah yang digunakan sebagai teknik melihat hasil pemisahan kromatografi lainnya karena plat yang digunakan sebagai fasa diam mampu berpendar. Hasil pemisahan akan nampak seperti spot hitam jika dilihat di bawah sinar UV 254 nm ataupun 365 nm.



Gambar 9.10 Mekanisme Pemisahan dengan KLT

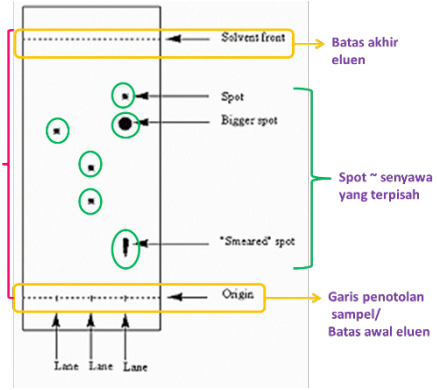
Pemisahan dengan KLT menggunakan fasa diam plat KLT dan fasa gerak pelarut non polar yang kemudian naik menjadi polar. Alat yang dibutuhkan adalah *chamber glass*. Teknik pemisahannya seperti kromatografi preparatif namun untuk KLT hasil pemisahan tidak untuk dikerok namun hanya sebatas identifikasi hasil.



Gambar 9.11 Pemisahan dengan KLT

Pemisahan dengan KLT dapat dilihat pada Gambar 9.11. Plat yang digunakan adalah plat khusus (Silika gel GF 254). Silika gel dengan pengikat dan indikator fluoresensi. Jenis silika gel ini biasanya berfluoresensi kehijauan jika dilihat pada sinar ultra violet panjang gelombang pendek. Plat ini bisa ditemui dengan ukuran dasar 20 x 20 cm. Plat tersebut biasanya dipotong menjadi 4 bagian (5 cm) dimana lebarnya dipotong menyesuaikan

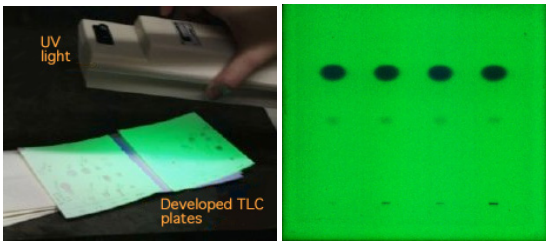
dengan jumlah sampel yang akan dianalisis. Saat memotong, pembuatan garis batas dilakukan menggunakan pensil pada halaman balik aluminium sehingga tidak merusak lempengan silika. Saat memotong juga menggunakan *cutter,* bukan gunting, untuk menjaga agar plat tidak berlekuk. Setelah dipotong, KLT digaris tipis menggunakan pensil, penggunaan bolpoin memang dihindari karena tinta bolpoin akan ikut terelusi. Pembuatan garis batas elusi dapat dilihat pada Gambar 9.12. Setiap sampel ditotolkan pada titik dengan jarak 0,5 cm dan dielusi pada *chamber* yang telah berisi pelarut.



Gambar 9.12 Pembagian Batas Elusi pada Plat KLT

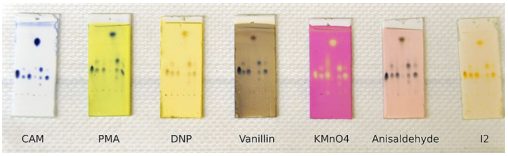
Setelah proses elusi, akan dihasilkan spot yang dapat berpendar di bawah sinar UV. Daerah 365 nm (berpendar biru) digunakan untuk mengecek senyawa yang tidak memiliki ikatan rangkap (non fenolik seperti golongan terpenoid biasanya nampak di sini) ataupun daerah 254 nm (berpendar hijau) digunakan untuk mengecek senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Spot senyawa akan terlihat warna hitam. Spot yang bundar dan hanya satu pada 3 sistem eluen yang berbeda menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah senyawa murni. Plat kemudian bisa

disemprot dengan reagen penampak noda untuk menunjukkan skrinning awal memprediksi jenis golongan metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya.



Gambar 9.13 Plat KLT Hasil Pemisahan di Bawah Lampu UV

Reagen penampak noda yang digunakan bermacam-macam. Berikut beberapa reagen penampak noda yang biasa digunakan dalam pemisahan KLT.



CAM = Ceric Ammonium Molybdate - Hanessian's Stain

PAA = Phosphomolybdic acid

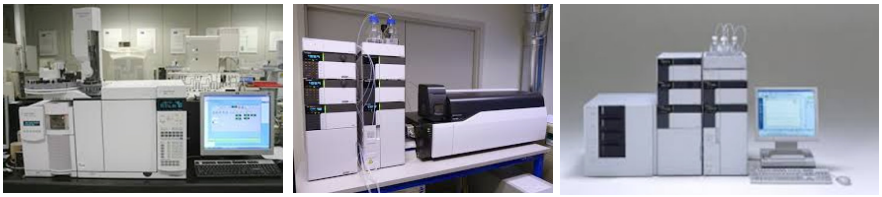
DNP = 2,4-Dinitrophenylhydrazine

Gambar 9.14 Hasil Penyemprotan Reagen Penampak Noda

6) **Kromatografi Instrumen**

Kromatografi instrumen tersambung ke dalam sistem komputer. Kegiatan analisa pangan biasa menggunakan GC-MS *(Gass Chromatography-Mass Spectroscopy),* LC-MS *(Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy),* HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatography)*. Ketiga jenis kromatografi instrumen ini memiliki prinsip yang hampir sama namun berbeda di fasa diam dan geraknya. Fasa diam tergantung spec masing-masing alat

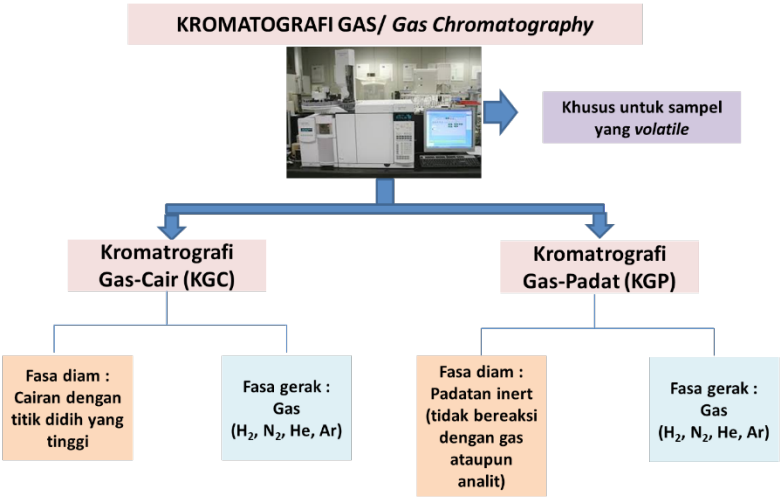
namun untuk fasa gerak bisa ditelusur dari namanya. Ketiganya bergandengan dengan MS dimana prinsip alat ini telah dibahas di topik spektroskopi.



(a) (b) (c)

Gambar 9.15 (a) GC-MS, (b) LC-MS, (c) HPLC

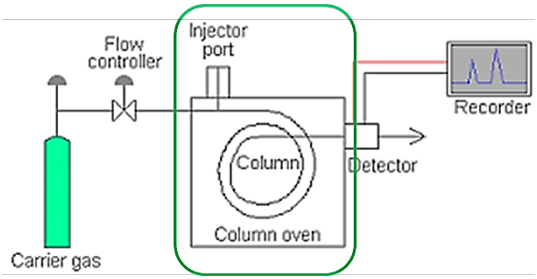
GC-MS dan LC-MS memiliki prinsip kerja yang hampir sama namun berbeda di fasa gerak yang digunakan. Sesuai namanya, GC-MS *(Gass Chromatography-Mass Spectroscopy),* merupakan kromatografi instrumen yang memiliki fasa gerak berupa gas. Fasa gerak berupa gas inilah yang menyebabkan sampel yang cocok untuk dianalisis pada GC-MS adalah senyawa volatil (mudah menguap). Fasa herak yang biasa digunakan pada GC-MS yaitu, gas H_2, gas N_2, gas He, dan gas Ar. LC-MS *(Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy),*sesuai namanya menggunakan fasa gerak pelarut. Keberadaan LC-MS sesungguhnya telah dioptimalkan dengan munculnya HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatography)* sehingga pada prakteknya, para analis lebih memilih menggunakan HPLC yang lebih cepat dibandingkan LC-MS. Berbeda dengan GC-MS yang memiliki karakter gas khusus untuk senyawa volatil sehingga GC-MS tetap menjadi pilihan sesuai dengan karakter sampel yang akan diuji.



Gambar 9.16 Skema Prinsip GC-MS

Mekanisme kerja GC-MS, sampel diinjeksikan ke dalam alat. Sampel yang akan dianalisis baiknya dipreparasi terlebih dahulu untuk mendapatkan senyawa volatilnya. Preparasi bisa menggunakan distilasi ataupun ektraksi soxhlet dengan pelarut non polar. Sampel yang diinjeksi kemudian mengalami pemisahan sepertihalnya prinsip dasar kromatografi. Fasa volatil akan terbawa fasa gerak pada GC-MS. Hasil pemisahan kemudian dianalisis di bagian MS untuk mendapatkan peak. Peak yang diperoleh dibedakan dengan RT *(retention time)* yang menunjukkan waktu saat keluar dari fasa diam (kolom). *Library* GC-MS menyimpan database yang kemudian memberikan rekomendasi nama senyawa yang dihasilkan dari proses pemisahan dengan mencocokkan data RT dan m/z (massa molekul) hasil analisis MS. Peak yang dihasilkan bisa digunakan untuk tujuan kualitatif dan juga kuantitatif. Kualitatif dengan adanya rekomendasi senyawa dari *Library* GC-MS sedangkan luas peak bisa digunakan untuk

mengukur konsentrasi senyawa yang dipisahkan. Analisis larutan standart terlebih dahulu bisa dilakan untuk beberapa tujuan sehingga mempermudah kemudahan analisis kualitatif.



Gambar 9.17 Mekanisme Kerja GC-MS

HPLC *(High Perfomance Liquid Chromatography)* atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) memiliki prinsip kerja dasar seperti halnya kromatografi kolom, hanya saja tidak lagi menggunakan gaya gravitasi. Analisis HPLC dapat digunakan untuk memisahkan sampel yang yang berifat non volatil, tidak tahan suhu tinggi, dan juga senyawa anorganik.

Gambar 9.18 Skema Prinsip HPLC

Pada prakteknya, analisis HPLC sangat baik digunakan untuk analisis kualitatif dan juga kuantitatif senyawa yang sudah dipisahkan dengan kromatografi non instrumen seperti protein dan karbohidrat. Lipid dan turunannya juga sangat baik dipisahkan dengan HPLC untuk mendapatkan data kualitatif dan juga kuantitatif asam lemak penyusunnya. Protein yang memang susah diisolasi, dapat dianalisis menggunakan HPLC untuk mendapatkan data asam aminonya.

DAFTAR PUSTAKA

AOAC, 2004. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Association of Official Analytical Chemist. Washington.

Badan Standardisasi Nasional. 1992. Cara Uji Makanan dan Minuman. BSN. Jakarta.

Belton, P. S. 2005. Extraction of Organic Analytes from Foods : A Manual of Methods. Cambridge : Royal Society of Chemistry.

Cifuentes, A. 2012. Review Articles : Present, Future, and Foodomics. International Scholarly Research Network. doi:10.5402/2012/801607.

Cruz, R. M. S., Khmelinskii, I., Viera, M. C. 2014. Methods in Food Analysis. CRC Press. New York.

Fessenden, R. J. dan Fessenden, J. S. 1986. Organic Chemistry. Wadsworth., Inc. California.

Franca, A. S. dan Nollet, L. 2018. Food & Analysis Properties. Taylor & Francis. New York.

Folch, J., Lees, M., dan Stanley, G H.S. 1957. A Simple Method for Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Issues. *J. Biol. Chem.* 226 : 497.

Jacobs, M. 1962. The Cmeical Analysis of Foods and Food Products (3rd Ed.) D. Van Nostrand Company, Inc. New York.

Nielsen, S. S. 2010. Food Analysis (4th Ed.). Springer. New York.

Otles, S. 2005. Methods of Analysis Food Components and Additives. Taylor & Francis. New York.

Pico, Y. 2008. Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier. Oxford.

Sikorsi, Z. 2006. Chemical and Functional Properties of Food Components (3rd Ed.). Taylor & Francis Inc. United States, Bosa Roca.

Sediaoetomo, A. D. 2000. Ilmu Gizi. Jakarta : Dian Rakyat.

Otles, S. 2009. Handbook of Food Analysis Instruments. CRC Press, Taylor & Francis. New York.

Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 2003. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty, Yogyakarta.

Sun, D. W. 2009. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Academic Press is an Imprint of Elsevier. San Diego.

Synder, L. R. dan Kirkland, J. J. 1979. Introduction to Modern Liquid Chromatography (2nd Ed.). Wiley-Interscience. New York.

Wetzel, D. L. B. & Charalambous, G. 1998. Instrumental Methods in Food and Beverage Analysis. Elsevier. Netherlands.

Winarno, F. G. 2004. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

RIWAYAT HIDUP

Prof. Dr. Ir. Noor Harini, MS. lahir pada tanggal 21 April 1961 di Madiun, Jawa Timur. Pendidikan Dasar hingga Menengah diselesaikan di kota Madiun yaitu Sekolah Dasar Negeri Panti Yogo, SMP Negeri II dan SMA Negeri III. Gelar Sarjana Pertanian ditempuh di Institut Pertanian Bogor dari Jurusan Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga - Fakultas Pertanian, lulus pada tahun 1985. Gelar Magister ditempuh di Jurusan Ilmu-ilmu Pertanian, Minat Ilmu Tanaman, Spesialisasi Teknologi Pasca Panen, Universitas Gadjah Mada lulus tahun 1993. Sedangkan gelar Doktor di bidang Teknologi Hasil Pertanian diperoleh dari Universitas Brawijaya, lulus pada tahun 2007. Pada tahun 2009 memperoleh gelar akademik tertinggi yaitu Guru Besar (Profesor) di bidang Teknologi Hasil Pertanian.

Sejak tahun 1986 sampai sekarang mengabdi sebagai Dosen tetap KOPERTIS (sekarang LLDikti/ Lembaga Layanan Pendidikan Tinggi) Wilayah VII Jawa Timur, ditempatkan di Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian-Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang. Berbagai kegiatan pelatihan, workshop dan kursus telah diikuti diantaranya adalah Workshop on Genetic Diversivity Analysis by PCR, RFLP and Isoenzym Technique, Analisa Kromatografi, Skrining Senyawa Bioaktif yang Dipandu dengan BioAssay, GMP dan HACCP untuk Industri Pangan Berskala Kecil dan Menengah, Keterjaminan Mutu Perguruan Tinggi (*Quality Assurance*), Pemanfaatan Hasil Penelitian yang Berpotensi Paten, Kultur Jaringan dan lain-

lain. Tahun 1993 sampai dengan 1995 menjabat sebagai Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Malang. Selain itu pernah menjadi Staf Ahli Badan Pengembangan Sumberdaya Manusia (BPSDM) dan Kepada Divisi Kendali Mutu Sumberdaya Manusia Akademik serta Kepala Badan Kendali Mutu Akademik (BKMA) Universitas Muhammadiyah Malang pada tahun 2009-2018. Peneliti pada Pusat Studi Wanita dan Kemasyarakatan (PSWK), Peneliti Kemeristekdikti sejak tahun 2004-2020, Mitra Bestari pada berbagai Jurnal Penelitian (Agritech UNEJ, Protein, Tropika) serta Reviewer pada program Pengabdian kepada Masyarakat. Saat ini berperan sebagai Auditor Halal dan Kepala Bidang Litbang dan Kerjasama pada LP POM MUI (Lembaga Pengkajian Pangan, Obat-obatan dan Kosmetika - Majelis Ulama Indonesia) Jawa Timur serta Asesor Sertifikasi Dosen (Serdos) dan Beban Kerja Dosen (BKD), KemenristekDikti, RI. Berbagai penghargaan pernah didapatkan diantaranya sebagai Dosen Berprestasi tingkat Nasional (DospresNas) pada tahun 2008, Lomba Inovasi dalam rangka Hari Kekayaan Intelektual Se-dunia ke-10, Ditjen HKI, DepkumHAM pada tahun 2010 dan pengharaan dengan Evaluasi Pembelajaran kategori Baik Sekali pada Tahun Akademik 2010/2011. Saat ini juga sebagai anggota PATPI (Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia), anggota PERMI (Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia) cabang Malang. Berbagai penulisan buku ajar dan buku petunjuk praktikum telah disusun khususnya di bidang Pangan dan Teknologi Hasil Pertanian. Demikian juga berbagai karya ilmiah hasil penelitian telah dihasilkan dan dipublikasi dalam bentuk jurnal, prosiding, HaKI dan berbagai presentasi di berbagai Konferensi, Seminar, Simposium, Lokakarya tingkat Nasional dan Internasional. Juga berperan dalam perumusan kebijakan publik dan pengabdian

kepada masyarakat rutin dilakukan, demikian juga dengan aktivitas sebagai Pemateri di berbagai forum serta kepanitiaan dan Trainer di bidang SDM (Sumberdaya Manusia), Penjaminan Mutu di tingkat LLDikti (Lembaga Layanan Pendidikan Tinggi) Wilayah VII Jawa Timur, juga Direktorat Penjaminan Mutu, Belmawa, KemenristekDikti. Fasilitator SPMI (Sistem Panjaminan Mutu Internal), PEKERTI (Peningkatan Ketrampilan Teknik Instruksional) dan AA (*Applied Approach*), Tim PAK (Penilaian Angka Kredit) Dosen serta Juri Dospres di tingkat internal UMM dan tingkat LLDikti Wilayah VII Jawa Timur.

RIWAYAT HIDUP

Renita Marianty, STP., MS. lahir pada tanggal 23 Maret 1982 di Bogor, Jawa Barat. Pendidikan Dasar hingga Menengah diselesaikan di kota Bogor yaitu Sekolah Dasar Negeri Pengadilan, SMP Negeri4 dan SMU Negeri I. Gelar Sarjana Pertanian ditempuh di Institut Pertanian Bogor dari Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi - Fakultas Teknologi Pertanian pada tahun 2004. Gelar Magister ditempuh di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya lulus tahun 2010.

Berbagai pengalaman kerja telah diperoleh diantaranya di PT. Nestlé Indonesia Pabrik Kejayan, Jawa Timur, Departemen QA/QC pada tahun 2003 dan 2004, Konsultan Perencanaan Keuangan PT. AXA Financial Indonesia pada tahun 2008, Tenaga Pengajar Fakultas Pertanian-Peternakan, Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan. Universitas Muhammadiyah Malang tahun 2010-2011 dan saat ini aktif sebagai Konsultan Perencanaan Keuangan PT.Prudential Life Assurance. Berbagai pengalaman penelitian telah dilakukan diantaranya Produksi Kefir Susu Sapi (Pengaruh Waktu Fermentasi dan Formulasi Penambahan Gula), Karakterisasi Fosfolipid Terstruktur dari Fosfolipid Kasar Serat Sawit dengan Konsentrat Asam Lemak Omega 3 dari Minyak Hasil Samping Pengolahan Ikan melalui Reaksi Asidolisis Enzimatis, Aplikasi Pengendalian Proses secara Statistika pada Proses Produksi Susu Bubuk Instant di PT Nestlé Indonesia, Pabrik Kejayan, Jawa Timur, Produksi Velva dari Buah Tropikal

Indonesia sebagai Alternatif pengganti Es Krim. Selain itu berbagai pengalaman training, seminar dan simposium telah diikuti seperti Seminar Nasional ke 3 Penelitian Ilmu Pengetahuan Alam, Seminar Internasional Bioteknologi dan Kongres KBI ke 5, Seminar Internasional "International Challenges in Knowledge Development", Program Pascasarjana Universitas Brawijaya, Malang, sebagai Peserta pada "Natural Pigments Conference for South-East Asia 2010", Universitas Ma Chung, Malang, Simposium Internasional "Natural Product Compounds, Derivatization and Its Bioactivities", Seminar Nasional "Milk : Is it Safe for Our Health" IAAS, Seminar Nasional "Pengembangan Agroindustri Berbasis Sumberdaya Lokal untuk Mendukung Ketahanan Pangan, Universitas Brawijaya. Seminar *Quality Assurance* (ISO 9000-series), Institut Pertanian Bogor, Peserta training *Good Laboratory Practices* (GLP) dan Training HACCP di Industri Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Berbagai penghargaan telah didapatkan seperti Pemenang ke 3 Kompetisi Presentasi Bahasa Inggris pada peringatan Ulang Tahun LIA Bogor ke 43 dan Dosen dengan kategori "Excellent" berdasarkan penilaian mahasiswa di Universitas Muhammadiyah Malang pada tahun 2011.

Buku ini merupakan rangkuman dari bahan ajar dalam perkuliahan dan praktikum serta berbagai artikel yang ditulis oleh kedua Penulis selama beberapa tahun terakhir.

RIWAYAT HIDUP

Lahir pada tanggal 23 Juli 1990 di Malang, Jawa Timur. Menempuh sekolah di SD Lowokwaru II Malang, SMP Negeri 3 Malang, SMA Negeri 3 Malang. Kuliah Sarjana diselesaikan di Universitas Negeri Malang dengan mengambil program studi Kimia pada tahun 2008-2012. Lulus S1 kemudian mendapatkan Beasiswa Caldos Dikti. Beasiswa digunakan untuk menyelesaikan jenjang Magister di Institut Teknologi Bandung dengan mengambil program studi Kimia Organik Bahan Alam pada tahun 2013-2015. Lulus Magister tahun 2015 kemudian kembali ke Malang dan mengajar di Universitas Muhammadiyah Malang program studi Teknologi Pangan. Saat ini sedang mendalami penelitian pangan fungsional dan halal science. Sejak Juni 2019 lulus mendapatkan sertifikat sebagai penyelia halal (Tersertifikasi MUI-HC IPB Bogor) dan saat ini bergabung di Halal Center UMM.

Beberapa penelitian telah dilakukan antara lain Isolasi, Karakterisasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksana–Etil Asetat Jamur Tiram Putih *(Pleurotus ostreatus)*; Kajian Fitokimia Daun Jungrahab *(Baeckea frutescens)* dan Aktivitas Sitotoksiknya terhadap Sel Leukemia Murin P-388; Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Salam *(Syzygium polyanthum)* dan Uji Bilangan Peroksida-nya Terhadap Minyak Goreng Curah; Kajian Konsentrasi Yeast *(Saccharomyces cerevisae)*, dan Suhu Proofing pada Pembuatan Roti; Formulasi Media Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat CBPW (Cassava Banana

Peel Whey) dan Aplikasinya Terhadap Soyghurt; dan Eksplorasi Flavor Compound pada Tempe Hasil Fermentasi dari Ragi Isolat Usar Daun Jati dan Daun Pisang.

Program pengabdian kepada masyarakat yang pernah dilakukan antara lain Peningkatan Produksi Roti Melalui Peningkatan Pemahaman Teknik Fermentasi *(Proofing)* dan Penyediaan Fasilitas pada UMM Bakery, Penyuluhan Pentingnya Pemahaman Halal dan Sertifikasi Produk Halal pada Pembentukan Kampung, Pemanfaatan Rambut Jagung Sebagai Bahan Pembuatan Teh Herbal yang Kaya akan Manfaat.

Buku yang pernah ditulis yaitu, buku antologi "The Silk (Sutera) : Kumpulan Pengalaman Mahasiswa Indonesia dan Tiongkok" (Editor : Tonny Dian Effendi). Beberapa kegiatan yang pernah diikuti antara lain Simposium Nasional Kimia Bahan Alam XXII, Pelatihan Aplikasi Analisis Persamaan Struktural (SPSS & AMOS), Seminar Nasional Kimia dan Pembelajarannya (SNKP), Halal Seminar and Workshop ITS 2018 "Implementation of Science for Halal Testing Purpose by DNA and Protein Based Methods", One Day Seminar "SNI Update for Microbiology and Halal Analysis", Bimtek dan Bazar Wisata Halal, Food Safety & HACPP Training, dan Pelatihan dan Uji Kompetensi Penyelia Halal.