

BUKU PANDUAN PRAKTIKUM

ANALISA ZAT GIZI



**PROGRAM STUDI GIZI
FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR HAMKA
TAHUN 2024**



**BUKU PANDUAN PRAKTIKUM
ANALISA ZAT GIZI**

**IZNA NURDIANTY MUHDAR, S.GZ., M.Si
DEBBY ENDAYANI SAFITRI, S.GZ., M.K.M**

**PROGRAM STUDI GIZI
FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF DR HAMKA
2024**

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR

TATA TERTIB PRAKTIKUM

DAFTAR ISI

1. PENGENALAN ALAT ANALISIS ZAT GIZI
2. ANALISIS AIR DALAM BAHAN PANGAN
3. ANALISIS KADAR ABU
4. ANALISIS KARBOHIDRAT KUALITATIF
5. ANALISIS KARBOHIDRAT KUANTITATIF
6. ANALISIS SERAT PANGAN
7. ANALISIS PROTEIN
8. ANALISIS LEMAK
9. ANALISIS VITAMIN LARUT AIR
10. ANALISIS VITAMIN LARUT LEMAK
11. ANALISIS MINERAL
12. ANALISIS ANTOSIANIN
13. ANALISIS ANTIOKSIDAN
14. ANALISIS TANIN

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

PRAKTIKUM 1

PENGENALAN ALAT PRAKTIKUM ANALISIS ZAT GIZI PANGAN

1.1 Lingkup Metode

Praktikum ini dimaksudkan untuk memperkenalkan berbagai alat yang digunakan dalam analisis zat gizi. Termasuk fungsi dan kegunaannya sesuai standar operasional.

1.2 Prinsip

Mengidentifikasi nama-nama alat, fungsi, dan kegunaannya kemudian mahasiswa membuat daftar nama-nama alat lengkap disertai dengan gambarnya.

1.3 Prosedur

1. Tuliskan nama alat yang digunakan dalam analisis zat gizi pangan di **laboratorium...?**
2. Tuliskan prinsip penggunaannya.
3. Lampirkan hasil dokumentasi dalam bentuk makalah.

PRAKTIKUM 2

PENENTUAN KADAR AIR METODE OVEN

2.1 Lingkup Metode

Metode ini digunakan untuk menentukan kadar air secara kuantitatif pada semua bahan makanan kecuali bahan yang tinggi gula dan lemak (>10%). Untuk keamanan gunakan pencapit (tongs) saat penanganan cawan pengering. Kadar air dalam metode ini merujuk pada jumlah air bebas dan bahan volatil yang hilang karena pengeringan pangan dengan temperatur terkendali dalam oven. Hasil dinyatakan dalam gram per 100 gram sampel.

2.2 Prinsip

Bahan dikeringkan dengan pemanasan pada oven sampai didapatkan berat konstan. Kadar air diperlukan untuk menyatakan kadar gizi bahan pangan dalam basis kering. Dalam bahan pangan tertentu, kadar air menunjukkan kualitas pangannya. Standar untuk kadar air suatu bahan pangan ada dalam peraturan pangan, seperti Standar Nasional Indonesia (SNI).

2.3 Bahan/Reagen dan Alat

Alat: Sand acid washed (SiO_2), oven (dapat diterapkan pada suhu terkendali pada $100 \pm 5^\circ\text{C}$), timbangan analitik, desikator dengan silica gelnya, cawan (aluminium, porselain, botol timbang atau wadah yang cocok lainnya), penjapit (tongs), pengaduk kaca (*stirring rod*), *Water bath*.

Bahan: Ikan asin, udang, susu, tahu, atau bahan lain, sesuai ketentuan.

2.4 Prosedur

2.4.1 Persiapan Sampel

1. Tempatkan cawan pada oven pengering pada suhu $100 \pm 5^\circ\text{C}$ sampai berat konstan (1-2 jam).
2. Keluarkan cawan dari oven pengering, kemudian diamkan dalam desikator sekitar 30 menit dan timbang (W_1).
3. Untuk sampel liquid dan semiliquid, siapkan cawan pengering dengan 15-20 gram *acid washed sand* (SiO_2) dan kaca pengaduk.

4. Haluskan atau campur sampel sampai homogen. Segera analisis sampel setelah persiapan. Jika sampel tidak dapat dianalisis pada hari yang sama, simpan dalam botol tertutup dalam *freezer*.
5. Jika sampel digunakan untuk uji vitamin atau zat gizi yang labil lainnya, siram sampel dengan nitrogen sebelum disimpan.

2.4.2 Analisis

1. Untuk sampel kering
Thawing sampel ke suhu ruang. Campurkan sampel dengan menggerakkan botol tertutup ke atas ke bawah sebanyak tiga kali. Timbang akurat 3-4 gram pada cawan yang sudah dikeringkan (W2). Buat 2-3 duplikat.
2. Untuk sampel liquid/basah/bubur
Campurkan sampel secara homogen dan timbang 5-15 gram sampel berbentuk bubur atau 20 gram sampel liquid ke dalam cawan yang telah diberi *acid washed* dan aduk (W2). Untuk sampel liquid, keringkan sampai membentuk pasta di *waterbath* sebelum dimasukkan ke dalam oven.
3. Letakkan cawan dengan sampel dalam oven $100 \pm 5^\circ\text{C}$, 2-3 jam.
4. Pindahkan cawan dengan sampel yang sudah kering ke dalam desikator. Diamkan selama 30 min dan timbang (W3).
5. Ulangi prosedur pemanasan sampai berat konstan. Perbedaan berat antar dua penimbangan tidak boleh lebih dari 5 mg.

2.5 Perhitungan Kadar Air

$$\text{Jumlah Air (g/100g)} = (W2 - W3) / (W2 - W1) \times 100$$

$$\text{Total padatan (\%)} = 100 - \% \text{ jumlah air (w/w)}$$

Keterangan:

W2 = berat cawan + sampel sebelum pengeringan (g)

W2-W1 = berat sampel (g)

W3 = berat cawan + sampel setelah pengeringan (g)

W2-W3 = berat yang hilang (g)

Catatan:

Hasil dinyatakan dalam g/100 gr sampel hingga satu desimal. Hasil diterima jika perbedaan duplikat tidak lebih dari 5% rataannya.

PRAKTIKUM 3

PENENTUAN KADAR ABU SECARA KUANTITATIF

3.1. Lingkup Metode

Penentuan kadar abu untuk bahan pangan mentah, masak, dan olahan.

3.2 Prinsip

Air dan bahan-bahan organik akan hilang dalam pembakaran dengan suatu tinggi ($>550^{\circ}\text{C}$). Residu yang tertinggal adalah mineral dalam bentuk abu putih. Pengabuan pada suhu lebih tinggi (650°C) dapat ‘menguapkan’ garam anorganik seperti klorida alkali, Fe, K, Na, S dan P.

3.3 Alat dan Bahan

Alat: Tanur (mampu diatur pada suhu $100\text{-}600^{\circ}\text{C}$), oven, *hotplate*, dan pembakaran bunsen atau pemantik listrik, timbangan analitik (kapasitas 200 gram, sensitivitas 0,1 mg), desikator dengan gel silikanya, *water bath*, gegap, cawan porselen atau silika, spatula.

Bahan: Ikan asin, udang, susu, tahu, atau bahan lain sesuai ketentuan.

3.4 Prosedur

1. Masukkan cawan kosong dan tutup ke dalam tanur pada suhu $500\text{-}550^{\circ}\text{C}$, selama 2-3 jam.
2. Turunkan suhu ke 180°C dan pindahkan cawan ke dalam desikator, dinginkan 30 menit, lalu timbang (W_1).
3. Timbang sampel sebanyak 2-4 gram untuk sampel kering dan 10 gram untuk sampel basah. Buat 2-3 duplikat. Catat sebagai W_2 .
4. Untuk sampel kering, panaskan terlebih dahulu pada *hotplate* mulai dari suhu rendah untuk menghindari percikan api. Tambahkan suhu secara bertahap sampai asapnya berhenti.
5. Untuk sampel basah, keringkan dahulu menggunakan *water bath* sampai kering. Setelah kering ikuti langkah poin 4).
6. Panaskan sampel dalam tanur $500\text{-}550^{\circ}\text{C}$ sampai terbentuk residu putih atau hampir putih.
7. Jika sampel tidak putih keseluruhan, lembabkan abu dengan beberapa tetes air (*ion free*) atau asam. Evaporasi air dengan *water bath* lalu ulangi pemanasan dalam tanur selama 30-60 menit sampai berat konstan. Catatan: jika sampel akan digunakan untuk analisis mineral, suhu tidak boleh melebihi 450°C .

8. Turunkan suhu tanur ke 180°C dan pindahkan cawan ke desikator, diamkan 30 menit dan timbang (W3).

3.5 Perhitungan

$$\text{Jumlah Abu (g/100g)} = (W3 - W1) / (W2 - W1) \times 100$$

$$\text{Total padatan (\%)} = 100 - \% \text{ jumlah air (w/w)}$$

Keterangan:

W1 = berat cawan awal (g)

W2 = berat cawan + sampel (g)

W3 = berat cawan + abu (g)

Hasil dinyatakan dalam g/100 gr sampel hingga satu desimal. Hasil diterima jika perbedaan duplikat tidak lebih dari 5% rataannya.

PRAKTIKUM 4

ANALISIS KARBOHIDRAT SECARA KUALITATIF

4.1 Uji Molish

4.1.1 Prinsip

Prinsip percobaan ini yaitu mengetahui adanya karbohidrat secara kualitatif dengan mereaksikan larutan uji dengan pereaksi Molisch yang terdiri atas α -naftol dalam alkohol, kemudian mengalirkan H_2SO_4 pekat secara perlahan sehingga terbentuk cincin berwarna ungu pada batas antar larutan.

4.1.2 Alat dan Bahan

Alat: Tabung reaksi dan pipet tetes.

Bahan: Pereaksi Molisch, H_2SO_4 pekat, amilum, dekstrin, sukrosa, laktosa, maltosa, galaktosa, fruktosa, glukosa, dan arabinosa masing-masing dalam larutan 1%.

4.1.3 Prosedur

1. Sebanyak 2 ml larutan gula 1% diambil
2. Tambahkan dengan 2 tetes larutan Molish.
3. Kemudian alirkan 2 ml H_2SO_4 pekat secara perlahan-lahan melalui dinding tabung reaksi.
4. Lalu amati terbentuknya cincin pada bidang batas antar larutan.

4.2 Uji Benedict

4.2.1 Prinsip

Prinsip percobaan ini yaitu membuktikan adanya gula reduksi melalui reaksi antara larutan uji dengan pereaksi Benedict lalu dipanaskan dan diamati endapan yang terbentuk.

4.2.2 Alat dan Bahan

Alat: tabung reaksi, pipet tetes, penangas air, gegap dan stopwatch

Bahan: amilum, dekstrin, sukrosa, laktosa, maltosa, galaktosa, fruktosa, glukosa, dan arabinosa masing-masing dalam larutan 1%.

4.2.3 Prosedur

1. Sebanyak 5 tetes larutan gula 1% diambil.
2. Tambahkan dengan 15 tetes larutan Benedict.

3. Kemudian dididihkan di dalam penangas air selama 5 menit.
4. Dinginkan dan amati warna endapan yang terbentuk.

4.3 Uji Iodium

4.3.1 Prinsip

Prinsip percobaan ini yaitu membuktikan adanya polisakarida dengan mereaksikan larutan uji dengan larutan iodium dan diamati warna yang terbentuk.

4.3.2 Alat dan Bahan

Alat: tabung reaksi dan pipet tetes.

Bahan: larutan iodium, amilum, dekstrin, sukrosa, laktosa, maltosa, galaktosa, fruktosa, glukosa, dan arabinosa masing-masing dalam larutan 1%.

4.3.3 Prosedur

1. Sebanyak 2 ml larutan gula 1% diambil
2. Tambahkan dengan 3 tetes larutan iodium.
3. Kemudian amati warna yang terbentuk.

4.4 Uji Barfoed

4.4.1 Prinsip

Prinsip percobaan ini yaitu membedakan monosakarida dan disakarida melalui reaksi antara larutan uji dengan pereaksi Barfoed lalu dipanaskan dan diamati warna atau endapannya.

4.4.2 Alat dan Bahan

Alat: tabung reaksi dan pipet tetes, penangas air, gegap dan stopwatch.

Bahan: pereaksi Barfoed, amilum, dekstrin, sukrosa, laktosa, maltosa, galaktosa, fruktosa, glukosa, dan arabinosa masing-masing dalam larutan 1%.

4.4.3 Prosedur

1. Sebanyak 1 ml larutan gula 1% diambil
2. Tambahkan dengan 5 ml larutan Barfoed.
3. Panaskan selama 3-4 menit lalu amati warna dan endapan yang terbentuk.

PRAKTIKUM 4
ANALISIS KARBOHIDRAT SECARA KUANTITATIF
Metode *Luff-Schoorl*

5.1 Prinsip

Prinsip percobaan ini yaitu menetapkan kadar karbohidrat dalam sampel dan menetapkan kadar metode titrasi (sebelum dan sesudah inversi). Dasar penetapan ini adalah hidrolisis pati menjadi gula-gula pereduksi yang kemudian ditetapkan secara *Luff-Schoorl*. Gula-gula pereduksi (glukosa, maltosa) dapat mereduksi Cu^{2+} menjadi Cu^{+} . Kemudian Cu^{2+} yang tidak tereduksi (sisa) dapat dititer secara iodometri, Jumlah Cu^{2+} asli ditentukan dalam suatu percobaan blanko dan dari perbedaannya dapat ditentukan jumlah gula dalam larutan yang dianalisis.

5.2 Alat dan Bahan

Alat: Neraca analitik, erlenmeyer asah 300 dan 500 ml, penangas air, tabung reaksi bertutup, corong, labu ukur 500 ml, pipet gondok 10 ml, gelas ukur, buret, pipet tetes, kertas saring, batu didih autoklaf dan stopwatch.

Bahan: HCl 10%, NaOH 40%, Indikator PP, Kalium iodida (KI) 30%, H_2SO_4 25%, Larutan Tio 0,1 N, larutan kanji 0,05% dan larutan Luff, kertas lakmus, aquades.

5.3 Prosedur

1. Timbang dengan teliti lebih kurang 5 gr contoh ke dalam erlenmeyer 500 ml.
2. Tambahkan HCl 10% sebanyak 200 ml dan beberapa butir batu didih.
3. Hubungkan dengan kondensor dan didihkan selama 3 jam atau 1,5 jam menggunakan autoklaf.
4. Setelah dingin, netralkan dengan NaOH 40% (cek dengan lakmus).
5. Masukkan ke dalam labu ukur 500 ml dan tepatkan sampai tanda tera.
6. Saring dengan kertas berlipat kering, lalu pipet sebanyak 10 ml ke dalam erlenmeyer asah 300 ml.
7. Tambahkan 25 ml larutan Luff, 15 ml aquades dan beberapa batu didih.
8. Hubungkan dengan kondensor dan didihkan selama 10 menit tepat lalu segera dinginkan di bawah air mengalir (jangan dikocok).
9. Tambahkan 10 ml larutan KI 30% dan H_2SO_4 25% secara perlahan-lahan dan hati-hati.
10. Titer dengan larutan Tio 0,1N dengan indikator kanji.

11. Blanko dikerjakan dengan menggunakan 25 ml larutan luff dan 10 ml aquades.

5.4 Perhitungan

$(\text{Volume blanko} - \text{Volume Contoh}) \times N \text{ Tio} \times 10 = \text{Jumlah ml Tio } 0,1N$

Jumlah ml Tio 0,1 N setara dengan mg glukosa pada Tabel Luff-Schoorl (Lihat Tabel)

$\text{Kadar glukosa} = (\text{mg glukosa dari Tabel} \times Fp) / \text{Bobot contoh (mg)} \times 100 \%$

$\text{Kadar Karbohidrat (Pati)} = 0,95 \times \text{kadar glukosa}$

Tabel Konversi Luff Schroll

ML. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Glukosa	Galaktosa	Laktosa	Maltose
1	2,4	2,7	3,6	3,9
2	4,8	5,5	7,3	7,8
3	7,2	8,3	11,0	11,7
4	9,7	11,2	14,7	15,6
5	12,2	14,1	18,4	19,6
6	14,7	17,0	22,1	23,5
7	17,2	20,0	25,8	27,5
8	19,8	23,0	29,5	31,5
9	22,4	26,0	33,2	35,5
10	25,0	29,0	37,0	39,5
11	27,6	32,0	40,8	43,5
12	30,0	35,0	44,6	47,5
13	33,0	38,1	48,4	51,6
14	35,7	41,2	52,2	55,7
15	38,5	44,4	56,0	59,8
16	41,3	47,6	59,9	63,9
17	44,2	50,8	63,8	68,0
18	47,1	54,0	67,7	72,2
19	50,0	57,3	71,7	76,5
20	52,1	60,7	75,7	80,9
21	56,1	64,2	79,8	85,4
22	59,1	67,7	83,9	90,0
23	62,2	71,3	88,0	94,6

PRAKTIKUM 6

ANALISIS SERAT PANGAN

6.1 Prinsip

Serat kasar merupakan sisa-sisa sel tumbuhan yang tahan terhadap reaksi hidrolisis enzim-enzim saluran pencernaan. Komponen utama penyusun serat kasar adalah berupa karbohidrat. Karena kandungan nutrisi serat kasar tergolong rendah, oleh sebab itu biasanya digunakan sebagai campuran pakan dalam jumlah yang sedikit, sekitar 7% saja. Bahan yang mengandung serat kasar cukup tinggi antara lain : tepung alfalfa, kulit kedelai, biji padi kering dan gandum. Sedangkan yang tergolong serat kasar rendah antara lain : beras giling, tepung tulang, jagung dan tepung ikan.

6.2 Alat dan Bahan

Alat: Timbangan analitik, tabung reaksi bertutup, pipet tetes, gegep, penangas air, kertas saring, sintered glass no.1, pompa vakum, oven, tanur, desikator.

Bahan: brokoli, larutan NaOH 3,35%, larutan H₂SO₄ 1,25%, alkohol.

6.3 Prosedur

Ambil sekitar 3 g contoh ke dalam tabung reaksi tertutup. Tambahkan 100 ml H₂SO₄ 1,25%, kemudian didihkan selama 3 menit. Tambahkan 100 ml NaOH 3,35%, didihkan selama 30 menit. Saring panas-panas ke dalam *sintered glass* dengan kertas saring yang telah diketahui bobot tetapnya dalam pompa vakum. Cuci residu dengan air panas, dibubuhi H₂SO₄ 1,25% dan bilas dengan alkohol. Keringkan dalam oven 105°C, didinginkan selama 30 menit dalam desikator dan timbang hasilnya sampai bobot tetap.

6.4 Perhitungan

Serat Kasar = $\frac{\text{Bobot endapan (Ks-Kk)}}{\text{Bobot Sampel}} \times 100\%$

Bobot endapan = Ks - Kk

Ks = Kertas setelah disaring

Kk = Kertas sebelum disaring

PRAKTIKUM 7

ANALISIS KUALITATIF PROTEIN

7.1 Uji Xantoprotein

7.1.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk membuktikan adanya asam-asam amino tirosin, triptofan atau fenilalanin dalam protein. Reaksi pada uji xantoprotein didasarkan pada nitration pada benzena yang terdapat pada molekul protein. Jika protein yang mengandung cincin benzena (tirosin, triptofan, fenilalanin) ditambahkan asam nitrat pekat, maka akan terbentuk endapan berwarna putih yang dapat berubah menjadi kuning ketika dipanaskan. Senyawa nitro yang terbentuk dalam suasana basa akan terionisasi dan warnanya berubah menjadi jingga.

7.1.2 Alat dan Bahan

Alat: Pipet tetes, pipet ukur, gelas, penangas air dan gelas beaker.

Bahan: Larutan albumin 2%, gelatin 2%, larutan HNO₃ pekat, larutan NaOH 10%.

7.1.3 Prosedur

1. Sediakan 2 tabung reaksi yang bersih dan isilah masing-masing dengan larutan albumin dan gelatin 2%. sebanyak 2 ml.
2. Tambahkan 1 ml HNO₃ pekat pada masing-masing tabung. Perhatikan terbentuknya endapan berwarna putih.
3. Panaskan selama 1 menit dan amati terbentuknya warna kuning.
4. Dinginkan masing-masing tabung di dalam gelas beaker yang berisi air, lalu tambahkan NaOH 10% setetes demi setetes melalui dinding tabung hingga terbentuk lapisan.
5. Perhatikan perubahan warna yang terjadi. Reaksi positif bila terbentuk warna jingga/kuning pada dinding batas antara protein dan NaOH.

7.2 Uji Biuret

7.2.1 Prinsip

Prinsip pada uji biuret adalah untuk membuktikan adanya molekul-molekul peptida dari protein. Ion Cu²⁺ (dari pereaksi biuret) dalam suasana basa akan bereaksi dengan polipeptida atau ikatan-ikatan peptida yang menyusun protein membentuk senyawa kompleks berwarna ungu (violet). Reaksi biuret positif terhadap dua buah ikatan peptida atau lebih, tetapi negatif

untuk asam amino bebas atau dipeptida. Biuret adalah senyawa dengan dua ikatan peptida yang terbentuk pada pemanasan dua molekul urea.

7.2.2 Alat dan Bahan

Alat: Pipet tetes, pipet ukur, gegep.

Bahan: Larutan albumin 2%, gelatin 2%, glisin 2%, larutan NaOH 10%, larutan CuSO₄ 0,2%.

7.2.3 Prosedur

1. Sediakan 3 tabung reaksi yang bersih dan isilah masing-masing dengan larutan albumin 2%, gelatin 2% dan glisin 2%. sebanyak 4 ml.
2. Tambahkan 2 ml NaOH 10% dan 6 tetes CuSO₄ 0,2% pada masing-masing tabung.
3. Campurkan/homogenkan dengan baik.
4. Perhatikan perubahan warna yang terjadi.

7.3 Uji Ninhidrin

7.3.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk membuktikan adanya asam-asam amino bebas dalam protein. Semua asam amino- α bebas akan bereaksi dengan ninhidrin (triketohidriden hidrat) membentuk aldehida dengan satu atom C lebih rendah dan melepaskan NH₃ dan CO₂. Di samping itu terbentuk senyawa kompleks berwarna biru, namun prolin dan hidroksiprolin menghasilkan senyawa berwarna kuning yang diduga disebabkan oleh 2 molekul ninhidrin yang bereaksi dengan NH₃ setelah asam amino tersebut dioksidasi.

7.3.2 Alat dan Bahan

Alat: Pipet tetes, pipet ukur, gegep, penangas air dan stopwatch.

Bahan: Larutan albumin 2%, gelatin 2%, pepton 0,5%, dan pereaksi ninhidrin 0,1%.

7.3.3 Prosedur

1. Sediakan 3 tabung reaksi yang bersih dan isilah masing-masing dengan larutan albumin 2%, gelatin 2%, dan pepton 0,5% sebanyak 4 ml.
2. Tambahkan 10 tetes pereaksi ninhidrin 0,1% pada setiap tabung.
3. Panaskan selama 5 menit dan amati perubahan warna yang terjadi.

7.4 Analisis Protein Metode Semi-Mikro Kjeldahl

7.4.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk menganalisis kadar nitrogen total dari bahan pangan yang dikalikan dengan faktor konversi (Tabel 1, Terlampir) untuk mendapatkan kadar proteinnya. Nitrogen dari protein dalam bahan pangan dibebaskan sebagai amoniak melalui proses destruksi menggunakan asam sulfat pekat dengan pemanasan. Kemudian ammoniak diikat oleh asam sulfat pekat menjadi ammonium sulfat. Dalam proses penyulingan dengan penambahan pereaksi NaOH, ammoniak dibebaskan lagi dari ammonium sulfat untuk kemudian diikat oleh asam borat menjadi ammonium borat. Ammonium borat dititrasi dengan larutan HCl standar. Dari titrasi ini total nitrogen yang berasal dari protein dapat diketahui. Dengan mengalikan total nitrogen dengan faktor konversi, maka kadar protein dalam bahan dapat diketahui.

7.4.2 Alat dan Bahan

Alat: Labu Kjeldahl, labu destilasi, erlenmeyer 100 ml, buret, magnetic stirrer dan labu takar 100ml.

Bahan: Tempe, Kasein, CuSO₄ asam laktat 10%, KMnO₄ (1:9), H₂SO₄ pekat, NaOH 40%, Selenium mix, HCl standar, asam borat 2%, aquades dan indikator merah metil, mengsel dan indikator pp serta kertas lakmus.

7.4.3 Prosedur

1. Timbang bahan kira-kira 5-10 gram menurut besarnya kandungan protein. Bahan kemudian dimasukkan dalam labu Kjeldahl.
2. Tambahkan 2,5-5 gram atau 0,5-1 sendok selenium mix, lalu campurkan dengan 5 gram CuSO₄ dan KMnO₄ (1:9) dan 50 ml H₂SO₄ pekat.
3. Panaskan mula –mula dengan api kecil, kemudian besarkan sampai terbentuk larutan yang berwarna jernih kehijauan dan uap SO₂ hilang.
4. Pindahkan dalam labu ukur 100 ml dan encerkan sampai tanda tera.
5. Pipet 10 ml larutan tersebut, masukkan ke dalam labu destilasi dan tambahkan 10 ml NaOH 40% atau lebih, kemudian sulingkan dengan aquades sebanyak 100 ml, tambahkan indikator pp sampai warna merah muda hilang.
6. Destilat ditampung dalam 20 ml larutan asam borat 2%. Lakukan destilasi sampai uap destilat tidak bereaksi basa lagi (uji dengan kertas pH). Setelah selesai destilasi, bilas ujung kondensor dengan air suling/aquades.
7. Tambahkan indikator mengsel sebanyak 3 tetes.

8. Larutan asam borat dititrasi dengan HCl standar 0,0915 N dengan menggunakan indikator metil merah.
9. Amati perubahan warna ungu menjadi biru tua.

7.4.4 Perhitungan

$\% \text{Total Nitrogen} = ((\text{ml contoh}) \times \text{N HCl} \times \text{fp} \times 14) / \text{mg bobot contoh} \times 100\%$

$\% \text{protein} = \% \text{total Nitrogen} \times \text{faktor konversi}$

Fp = faktor pengenceran

$\% \text{ Kadar Protein} = (V1 \times N \times 0,014 \times 6,25) / \text{gram contoh} \times 100\%$

PRAKTIKUM 8
PENENTUAN KADAR LEMAK KASAR
METODE EKSTRAKSI KERING

7.1 Prinsip

Prinsip metode ekstraksi kering adalah untuk mengeluarkan lemak (senyawa-senyawa larut lemak lainnya) dari sampel yang telah kering berat dengan menggunakan pelarut bebas air. Pelarut yang digunakan harus benar-benar bebas air agar bahan-bahan yang larut air tidak terekstrak dan terhitung sebagai lemak dan keaktifan pelarut tersebut tidak berkurang. Alat yang digunakan adalah Soxhlet.

Keuntungan dari metode ini yaitu amat sederhana, bersifat universal dan mempunyai ketepatan yang baik. Kelemahannya adalah membutuhkan waktu yang lama (ekstraksi 2-6 jam); menggunakan pelarut yang mudah terbakar dan adanya zat lain yang ikut terekstraksi sebagai lemak. Dalam metode ini, lemak diekstraksi dengan pelarutnya diuapkan, lemaknya ditimbang dan dihitung persentasenya.

7.2 Alat dan Bahan

Alat: Alat ekstraksi Soxhlet lengkap dengan kondensor dan labu lemak, alat pemanas listrik atau penangas uap, oven, dan timbangan analitik.

Bahan: Kacang tanah dan petroleum eter/etanol, kapas wool bebas lemak/kertas saring.

7.3 Prosedur

1. Siapkan labu lemak yang ukurannya sesuai dengan alat ekstraksi Soxhlet yang akan digunakan.
2. Keringkan labu lemak dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit, dinginkan dalam desikator selama 15 menit dan timbang bobotnya sebagai bobot (A).
3. Timbang 5 gram sampel (S) tepat langsung dalam saringan timbel yang sesuai umurannya. Kemudian tutup dengan kapas wool yang bebas lemak. Alternatif lain, sampel dapat pula dibungkus dengan kertas saring.
4. Masukkan pelarut lemak ke dalam labu lemak secukupnya.
5. Masukkan selongsong yang telah berisi sampel ke dalam alat ekstraksi soxhlet.
6. Pasanglah alat ekstraksi sesuai petunjuk asisten.
7. Panaskan labu lemak dan lakukan ekstraksi selama 3-4 jam.

8. Setelah selesai, pelarutnya disulingkan kembali dan labu lemak diangkat dan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai tidak ada penurunan berat lagi (dicapai bobot tetap).
9. Dinginkan dalam desikator selama 20-30 menit dan timbang sebagai bobot (B).
10. Hitung persentase lemak yang dihasilkan.

7.4 Perhitungan

$$\% \text{ Lemak} = (B - A) / S \times 100\%$$

Keterangan: (B-A) : adalah berat sampel setelah penimbangan

S : Berat sampel

PRAKTIKUM 9

PENENTUAN KADAR VITAMIN LARUT AIR (Vitamin B1, B6 dan C)

9.1 Vitamin B1

9.1.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk membuktikan adanya vitamin B1 secara kualitatif. Vitamin B1 atau thiamin mengandung sistem dua cincin, yaitu inti pirimidin dan thiazol. Dalam tanaman, terutama sereal, vitamin B1 terdapat dalam keadaan bebas, sedangkan dalam jaringan hewan terdapat sebagai koenzim, yaitu thiamin pirofosfat (TPP). Vitamin bersifat larut dalam air, tetapi tidak larut dalam pelarut lemak. Dalam larutan netral atau alkalis, thiamin mudah rusak, sedangkan dalam keadaan asam tahan panas. Thiamin stabil pada pemanasan kering, tetapi mudah terurai oleh zat-zat pengoksidasi dan terhadap radiasi sinar ultraviolet.

9.1.2 Alat dan Bahan

Alat: Alat pemanas, tabung reaksi, pipet ukur dan pipet tetes.

Bahan: Larutan thiamin 1%, larutan KI 5%, larutan Bismuth Nitrat $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, larutan Pb-asetat 10%, dan larutan NaOH 6N.

9.1.3 Prosedur

Prosedur A

1. Masukkan 10 tetes larutan thiamin 1% ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 10 tetes larutan Pb-asetat 10% dan 1 ml NaOH 6N.
3. Campurlah dengan baik, kemudian perhatikan timbulnya warna kuning yang terjadi.
4. Selanjutnya, panaskan, sehingga akan timbul endapan warna coklat-hitam yang menandakan larutan positif mengandung vitamin B1.

Prosedur B

1. Ke dalam tabung reaksi, masukkan 10 tetes larutan thiamin 1%.
2. Tambahkan 10 tetes larutan Bismuth Nitrat $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$.
3. Campurlah dengan baik, kemudian tambahkan pula 2 tetes larutan KI 5%.
4. Perhatikan perubahan warna yang terjadi. Timbulnya warna endapan merah jingga berarti larutan positif mengandung vitamin B1.

9.2 Vitamin B6

9.2.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk membuktikan adanya vitamin B6 secara kualitatif. Vitamin B6 terdiri atas tiga bentuk senyawa yaitu piridoksin, piridoksal dan piridoksamin. Ketiga bentuk vitamin B6 terdapat pada hewan maupun tumbuhan, terutama pada beras atau gandum. Piridoksin stabil terhadap pemanasan, alkali dan asam. Piridoksal dan piridoksamin mudah rusak oleh pemanasan, udara dan cahaya. Dari ketiga bentuk vitamin B6, hanya piridoksin yang paling tahan terhadap pengaruh pengolahan dan penyimpanan.

9.2.2 Alat dan Bahan

Alat: Alat pemanas, tabung reaksi, pipet ukur dan pipet tetes.

Bahan: Larutan piridoksin-HCl 1%, larutan CuSO₄ 2%, larutan NaOH 3N, larutan Besi (III) klorida, FeCl₃ 1%.

9.2.3 Prosedur

Prosedur A

1. Masukkan 10 tetes larutan piridoksin 1% ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 4 tetes larutan CuSO₄ 2% dan 20 tetes NaOH 3N.
3. Amati perubahan warna yang terjadi. Bila terbentuk warna biru-ungu berarti larutan positif merupakan vitamin B6.

Prosedur B

1. Masukkan 10 tetes larutan piridoksin 1% ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 3-5 tetes larutan FeCl₃.
3. Amati perubahan warna yang terjadi. Timbulnya warna jingga sampai merah tua berarti larutan positif merupakan vitamin B6.

9.3 Vitamin C

9.3.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk membuktikan adanya vitamin C secara kualitatif. Vitamin C di alam terdapat dalam dua bentuk, yaitu bentuk teroksidasi (asam askorbat) dan bentuk tereduksi (asam dehidroaskorbat). Keduanya memiliki keaktifan sebagai vitamin C. Sumber vitamin C sebagian besar berasal dari sayur-sayuran berwarna hijau dan buah-buahan terutama yang masih segar. Vitamin C larut dalam air dan agak stabil dalam larutan asam

tetapi mudah dioksidasi terutama bila dipanaskan. Proses oksidasi akan dipercepat dengan adanya tembaga, oksigen dan alkali.

9.3.2 Alat dan Bahan

Alat: Alat pemanas, tabung reaksi, pipet ukur dan pipet tetes.

Bahan: Larutan asam askorbat 1%, pereaksi benedict dan larutan NaHCO_3 5%, larutan FeCl_3 1%, dan kertas lakmus.

9.3.3 Prosedur

Prosedur A

1. Masukkan 5 tetes larutan asam askorbat 1% ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 15 tetes pereaksi.
3. Panaskan di atas api kecil sampai mendidih selama 2 menit.
4. Perhatikan adanya endapan yang terbentuk. Warna hijau kekuningan sampai merah bata menandakan larutan positif merupakan vitamin C.

Prosedur B

1. Masukkan 10 tetes larutan asam askorbat 1% ke dalam tabung reaksi.
2. Netralkan larutan (pH netral = 8) menggunakan NaHCO_3 5%.
3. Tambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 .
4. Amati warna yang terjadi. Adanya warna merah-ungu berarti vitamin C positif.

PRAKTIKUM 10

PENENTUAN KADAR VITAMIN LARUT LEMAK (Vitamin A dan D)

10.1 Vitamin A

10.1.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk membuktikan adanya vitamin A secara kualitatif. Vitamin A adalah suatu alkohol dengan berat molekul yang tinggi. Sumber vitamin A adalah karoten dan karotenoid yang banyak terdapat dalam bahan-bahan nabati sebagai provitamin. Dalam jaringan hewan, vitamin A diperoleh dalam bentuk retinol. Vitamin A stabil di bawah atmosfer, tetapi cepat kehilangan aktivitasnya bila dipanaskan dengan adanya oksigen, terutama pada suhu tinggi, vitamin A dapat rusak bila dioksidasi atau dehidrogenasi.

Penentuan adanya vitamin A dapat dilakukan dengan 2 metode, yakni dengan pereaksi *Carr-Price* atau pereaksi Trikloroasetat (TCA). Vitamin A dengan pereaksi *Carr-Price* akan memberikan warna biru, kemudian berubah menjadi merah coklat. Intensitas warna biru sebanding dengan banyaknya vitamin A yang terkandung dalam suatu bahan. Oleh karena itu, reaksi dapat dijadikan dasar penentuan kuantitatif vitamin A secara kolorimetri.

10.1.2 Alat dan Bahan

Alat: Tabung reaksi, pipet ukur, pipet tetes, sudip/sendok.

Bahan: Minyak ikan, asam asetat anhidrid, kloroform, asam trikloroasetat (TCA), dan kristal SbCl_3 .

10.1.3 Prosedur

Prosedur A

1. Masukkan 10 tetes minyak ikan ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 15 tetes kloroform, kemudian campurlah dengan baik.
3. Tambahkan 4 tetes asam asetat anhidrid.
4. Selanjutnya, bubuhkan sepucuk sendok kristal SbCl_3 ke dalam tabung reaksi.
5. Perhatikan perubahan warna yang terjadi. Terbentuknya warna biru yang akan berubah menjadi merah coklat berarti vitamin A positif.

Prosedur B

1. Masukkan 10 tetes minyak ikan ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 4 ml pereaksi *Carr Price* (TCA dalam kloroform).

3. Campurkan dengan baik,
4. Perhatikan perubahan warna yang terjadi. Terbentuknya warna biru kehijauan menandakan larutan positif vitamin A.

10.2 Vitamin D

10.2.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk membuktikan adanya vitamin D secara kualitatif. Terdapat dua jenis vitamin D yang penting di alam, yaitu vitamin D₂ (*Viosterol/Ergokalsiferol*) yang banyak terdapat dalam minyak hati ikan dan vitamin D₃ (*Kolekalsiferol*) yang banyak bersumber dari bahan nabati seperti ragi dan jamur. Secara umum, vitamin D stabil terhadap pemanasan, asam dan oksigen. Vitamin D secara lambat dapat didestruksi bila lingkungannya alkalis, terutama bila terdapat udara dan cahaya. Pemanasan dengan hydrogen peroksida (H₂O₂) tidak merusak vitamin D, tetapi vitamin A akan rusak.

10.2.2 Alat dan Bahan

Alat: Alat pemanas/bunsen, tabung reaksi, pipet ukur, pipet tetes, sudip/sendok.

Bahan: Minyak ikan, larutan H₂O₂ 5%, kloroform, larutan TCA, asam asetat anhidrid, dan kristal SbCl₃.

10.2.3 Prosedur

1. Masukkan 10 tetes minyak ikan ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 10 tetes larutan H₂O₂ 5%, kemudian kocok selama 1 menit.
3. Panaskan diatas api kecil perlahan-lahan sampai tidak ada gelembung-gelembung gas keluar. Usahakan jangan sampai mendidih.
4. Dinginkan tabung di bawah air kran.
5. Selanjutnya, lakukan uji dengan pereaksi *Carr Price* seperti pada penentuan vitamin A prosedur B.
6. Amati perubahan yang terjadi. Adanya warna jingga-kuning berarti vitamin D positif.

PRAKTIKUM 11

PENENTUAN KADAR MINERAL (Mineral Fe)

11.1 Prinsip

Prinsip uji ini adalah untuk menentukan kandungan mineral bahan makanan, bahan harus dihancurkan/didestruksi terlebih dahulu. Cara yang biasa dilakukan yaitu pengabuan kering dan pengabuan basah. Pemilihan cara tersebut tergantung pada sifat zat organik dalam bahan, sifat zat organik yang ada dalam bahan, mineral yang akan dianalisis serta sensitivitas cara yang digunakan.

Pengabuan kering dapat diterapkan pada hampir semua analisis mineral kecuali merkuri dan arsen. Cara ini membutuhkan sedikit ketelitian dan mampu menganalisis bahan lebih banyak daripada pengabuan basah. Pengabuan kering dapat dilakukan untuk menganalisis bahan lebih banyak daripada pengabuan basah. Pengabuan kering dapat dilakukan untuk menganalisis kandungan Ca, P, dan Fe, akan tetapi kehilangan K dapat terjadi apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi. Oleh karena itu untuk menganalisis K harus dihindari pemakaian suhu lebih tinggi dari 480°C. Suhu 450°C tidak dapat digunakan jika akan menganalisis kandungan seng. Penggunaan suhu yang terlalu tinggi juga akan menyebabkan beberapa mineral menjadi tidak larut (misal timah putih).

11.2 Alat dan Bahan

Alat: Spectrophotometer Uvi-Ligth, erlenmeyer, pipet volume, cawan porselin, spatula, labu ukur, dan gelas piala.

Bahan: Air suling, abu kacang tanah, reagen HNO_3 pekat, HCL 3 N, standar Fe, dan air suling.

11.3 Prosedur

1. Basahi sampel (hasil pengabuan) dalam cawan porselen.
2. Ditambahkan 1-2 ml HNO_3 (pekat), digoyang-goyangkan dengan tangan
3. Bila pengabuan sempurna dan abu berwarna putih lanjutkan ke tahap selanjutnya (tahap 7).
4. Bila abu masih hitam, partikel-partikel besar dipecahkan dengan pengaduk gelas, dan pengaduknya dibilas dengan sedikit air suling.
5. Keringkan abu dalam cawan diatas di atas penangas air/plat pemanas pada suhu di bawah 100°C.

6. Pindahkan cawan ke tanur (suhu di bawah 250°C) dan dinaikkan suhu sampai $450-500^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Bila abu masih tetap hitam diulangi tahap sebelumnya hingga diperoleh abu yang bebas dari karbon.
7. Keluarkan cawan dari tanur dan dinginkan. Basahi abu dengan 1 ml air suling dan kemudian ditambahkan 1-2 ml HNO_3 pekat.
8. Panasi cawan di atas penangas air / plat pemanas sehingga abu hampir kering.
9. Larutkan abu dengan 10 ml HCl 3N, diaduk dengan pengaduk gelas, dan kemudian dipanaskan hingga hampir mendidih.
10. Dinginkan dan pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu takar 100 ml atau 50 ml.
11. Bilas cawan paling sedikit 3 kali, bila perlu panaskan pada plat pemanas.
12. Bila ada endapan putih dari silikat dilakukan dekantasi dan kemudian dituangkan cairannya perlahan-lahan agar endapannya sebanyak mungkin tertahan dan tertinggal di dalam cawan.
13. Ditepatkan hingga tanda garis dengan air suling dan larutan dikocok.

PRAKTIKUM 12

ANALISIS AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

12.1 Prinsip

Salah satu metode penentuan aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*) (Mollineux 2004). Metode ini memperlihatkan karakteristik spektrum di mana absorbansi maksimum berada pada λ 520 nm dalam solven organik. Dalam mekanisme pengujian aktivitas antioksidan, antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH secara langsung dan memulihkannya melalui transfer elektron maupun hidrogen.

12.2 Alat dan Bahan

Alat: Gelas kimia, labu volumetrik, timbangan analitik, pipet ukur, tabung tertutup, shaker, alat sentrifuse, alat rotaporator, tabung reaksi dan pipet tetes dan inkubator, spektrofotometer.

Bahan: Larutan DPPH 0,4 mM, larutan metanol pro analisis (p.a), air bebas ion.

12.3 Prosedur

1. Pembuatan larutan 0,4 mM DPPH dilakukan dengan cara menimbang 16 mg DPPH (BM=394,33) dan dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a, dihomogenkan kemudian ditempatkan dalam botol gelap.
2. Selanjutnya lakukan pembuatan larutan blanko dengan cara memipet larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 ml lalu masukkan ke dalam labu volumetrik 5 ml ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas kemudian homogenkan.
3. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan cara menimbang 10 mg sampel menggunakan timbangan analitik, dilarutkan dengan metanol p.a sampai 10 ml (1000ppm) dalam tabung tertutup.
4. Larutkan sampel kemudian diaduk dengan menggunakan shaker selama 2 jam.
5. Selanjutnya dipisahkan filtrat dan residu sampel menggunakan alat sentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit.
6. Lakukan pemisahan filtrat dengan residu secara berulang sampai warna filtrat bening.
7. Filtrat kemudian dipekatkan dengan alat rotaporator.
8. Hasil dari pemekatan filtrat selanjutnya ditambahkan metanol pa hingga mencapai volume 5 ml.

9. Filtrat yang telah melalui prosedur di atas kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 20 µl lalu tambahkan larutan DPPH (1 mM sebanyak 1 ml dan tambahkan air bebas ion sampai volume mencapai 5 ml.
10. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C atau suhu ruang selama 30 menit.
11. Reaksi dilakukan di ruangan redup (gelap), selanjutnya serapannya diukur pada panjang gelombang 516 nm.

12.4 Perhitungan

Satuan aktivitas antioksidan dinyatakan dalam *Half Maximal Inhibitory Concentration* (IC50).

Persen efektivitas penghambatan (%) = $(1 - \text{Asampel } 516\text{nm} / \text{Akontrol } 516\text{ nm}) \times 100$

IC50 dihitung melalui persamaan *linier equation* kurva persen penghambatan berupa $y = ax + b$;

IC50 (x) = $(y - b) / a$, dengan $y = 50$

Pengkategorian aktivitas antioksidan (Omisore *et al.* 2005).

moderate antioxidant activity $\geq 0,05 \text{ mg/ml}$

high antioxidant activity $< 0,05 \text{ mg/ml}$

PRAKTIKUM 13

ANALISIS TANIN SECARA KUALITATIF

13.1 Prinsip

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, antidiare, antibakteri dan antioksidan. Senyawa tanin merupakan senyawa polifenol yang berada di tumbuhan, makanan dan minuman. Dapat larut dalam air dan pelarut organik. Analisis kualitatif dilakukan dengan penambahan pereaksi FeCl_3 dan larutan gelatin untuk menentukan apakah sampel mengandung tanin. Mula-mula penambahan pereaksi FeCl_3 terbentuk warna hijau kehitaman atau biru tinta pekat menunjukkan adanya senyawa tanin.

13.2 Alat dan Bahan

Alat: Tabung reaksi, gelas ukur, evaporator, shaker, timbangan analitik, blender, ayakan,

Bahan: Biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang dikirim dari Mesir, aquabidestilata, asam tanat p.a, etanol 70%, FeCl_3 5%, folin denis p.a, gelatin 1%, heksan, NaCl 2% dan Na_2CO_3 jenuh.

13.3 Prosedur

13.3.1 Penyiapan Sampel

Sampel yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan dari kotoran dan dicuci dengan air bersih, kemudian diangin-anginkan ditempat yang tidak terkena langsung sinar matahari. Setelah kering, sampel diserbukkan, kemudian diayak. Sampel siap untuk diekstraksi.

13.3.2 Metode Ekstraksi

Sampel biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang telah diserbukkan ditimbang sebanyak 1 kg dimasukkan dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70%. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 24 jam ditempat terlindung dari sinar matahari langsung sambil sesekali diaduk. Selanjutnya disaring, dipisahkan antara ampas dan filtratnya. Ampas diekstraksi kembali dengan n-heksan yang baru dengan jumlah yang sama. Ekstrak n-heksan yang diperoleh diuapkan cairan penyarinya menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak heksan kental.

13.3.3 Uji Kualitatif Tanin

Sebanyak 2 gram ekstrak etanol biji jintan hitam diekstraksi aquades panas kemudian didinginkan. Setelah itu ditambahkan 1 ml NaCl 2% dan disaring. Filtrat dibagi 2 bagian A dan B. Filtrat A

ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 5%. Positif tanin apabila terbentuk warna hitam kebiruan. Filtrat B diambahkan gelatin. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya tanin

13.3.4 Kandungan tanin total

Kandungan tanin total ditentukan berdasarkan penambahan reagen pembentuk warna, yaitu folin denis. Pembentukan warnanya berdasarkan reaksi reduksi oksidasi, di mana tanin sebagai reduktor dan folin denis sebagai oksidator. Prinsip dari metode folin denis adalah terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur serapannya pada daerah sinar tampak.

13.3.5 Penetapan Kadar Tanin

Pembuatan Larutan Standar Asam Tanat 1000 ppm 0,1 gram asam tanat dilarutkan dalam 100 ml aquades. Larutan standar ini harus selalu dibuat baru tiap kali akan melakukan pengujian (Cunniff, 1996). Dibuat seri pengenceran 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Diambil masing-masing 1 ml dari seri pengenceran dan dimasukkan ke dalam wadah labu tentukur 10 ml yang berisi 7,5 ml aquabidestilata. Ke dalam labu tersebut ditambahkan 0,5 ml pereaksi folin denis, didiamkan 3 menit dan ditambahkan 1 ml larutan Na_2CO_3 jenuh, diinkubasi selama 15 menit. Kemudian serapannya dibaca pada panjang gelombang 740 nm.

13.3.6 Penetapan panjang gelombang serapan maksimum

Diambil salah satu konsentrasi larutan baku, diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

13.3.7 Pembuatan Kurva Baku

Kurva baku dibuat dengan menghubungkan konsentrasi larutan standar dengan hasil serapannya yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 740 nm.

13.3.8 Penetapan Kadar Tanin

Sebanyak 0,5 gram maserat ditimbang dan dilarutkan dengan aquabidestilata sampai 10 ml. Jika belum larut sempurna bisa dibantu dengan alat yang berfungsi untuk menghomogenkan larutan. Dipipet 1,0 ml sampel dengan seksama, dimasukkan ke dalam wadah berukuran 10 ml yang telah berisi 7,5 ml aquabidestilat. Ditambahkan 0,5 ml pereaksi folin denis, didiamkan selama 3 menit, ditambahkan 1,0 ml larutan Na_2CO_3 jenuh. Diinkubasi selama 15 menit, kemudian dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum. Dihitung dengan menggunakan kurva baku yang telah didapat sehingga diketahui konsentrasi dari sampel yang diukur.

PRAKTIKUM 14
ANALISIS KADAR ANTOSIANIN TOTAL
(Wrolstad, Durst, dan Lee 2005)

14.1 Prinsip

Kadar antosianin total diukur dengan metode perbedaan pH, yaitu dengan mengukur absorbansi sampel pada pH 1 dan pH 4,5 menggunakan panjang gelombang 510 nm dan 700 nm. Kadar antosianin dihitung sebagai sianidin 3-glukosida dengan koefisien 26.900 L/mol.cm dan berat molekul 449,2

14.2 Alat dan Bahan

Alat: Gelas kimia, timbangan analitik, tabung reaksi, pipet tetes, shaker, alat sentrifuse, inkubator, spektrofotometer.

Bahan: Larutan buffer sodium klorida 0,025M, buffer sodium asetat 0,4M, asam klorida, asam asetat,

14.3 Prosedur

14.3.1 Penggunaan Buffer

1. Pengukuran sampel pada pH 1 menggunakan buffer sodium klorida 0,025 M.
2. Pengukuran sampel pada pH 4,5 menggunakan buffer sodium asetat 0,4 M.
3. Pengaturan pH dalam buffer sodium klorida menggunakan asam klorida.
4. Pengaturan pH dalam buffer sodium asetat menggunakan asam asetat.

14.3.2 Preparasi Sampel

1. Timbang sebanyak 10 g sampel lalu masukkan dalam tabung reaksi.
2. Sampel disentrifuse 3000rpm selama 15 menit.
3. Pisahkan filtrat dari endapannya.
4. Tambahkan methanol sebanyak 25ml.
5. Kocok selama 2 jam.
6. Ulangi hingga filtrat tak berwarna.
7. Filtrat dievaporasi hingga kering.

14.3.3 Determinasi Sampel

1. Sebanyak 4 ml sampel ditambahkan 1 ml buffer sodium klorida, baca pada λ 510 nm dan 700 nm.
2. Sebanyak 4 ml sampel ditambahkan 1 ml buffer sodium asetat, baca pada λ 510 nm dan 700 nm.

14.4 Perhitungan

Kadar antosianin total dihitung dengan metode perbedaan pH dengan rumus:

$$\text{Abs} = [\text{A510} - \text{A700}]_{\text{pH1}} - [\text{A510} - \text{A700}]_{\text{pH 4,5}}$$

Konsentrasi antosianin total sebagai sianidid 3-glukosida dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi antosianin total (mg/L)} = (\text{Abs} \times 449,2 \times \text{fp} \times 1000) / 26900 \times 1\text{cm}$$

DAFTAR PUSTAKA

1. Sirajuddin, Saifuddin. 2009. *Pedoman Praktikum Analisis Bahan Makanan*. Universitas Hasanuddin: Makassar.
2. Poedjiadi, Anna, dkk. 2007. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI-Press: Jakarta.
3. Minarno, Eko Budi dan Liliek Hariani. 2008. *Gizi dan Kesehatan*. UIN-Malang Press: Malang.
4. Almatsier, Sunita. 2004. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama: Jakarta.
5. Sudarmadji, Slamet. Haryono, bambang dan Suhardi. 2005. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Penerbit Liberty Yogyakarta bekerja sama dengan pusat antar universitas pangan dan gizi universitas gadjah mada: Yogyakarta.
6. Anonim. 2009. *Zat Besi (Fe)*. www.nutrisibali.com. Diakses tanggal 29 November 2009.
7. Mollyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J.Sci.Technol.* 26:211-219.
8. Omisore N,O,A. Adewumi C,O., Iwalewa E,O., Ngadjuni B,T., Adenowo, T,K., Abegaz, B,M., Ojewole, J, A., Watchueng, J. (2005). Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Braz J Med Biol Res.* 38: 1087-1094
9. Lee, J., Durst, RW., & Wrolstad, RE. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88(5): 1269-1278.