



BADAN POM

Gula

Tepungku

Crisps

ROTIKU

SLICED
APELOS
SIRUP

SOP

2019

PEDOMAN

EVALUASI MUTU

GIZI DAN NON GIZI PANGAN

DIREKTORAT STANDARDISASI PANGAN OLAHAN
DEPUTI BIDANG PENGAWASAN PANGAN OLAHAN
BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN

**PEDOMAN EVALUASI MUTU
GIZI DAN NON GIZI PANGAN**

**DIREKTORAT STANDARDISASI PANGAN OLAHAN
BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN**

2019

Pedoman Evaluasi Mutu Gizi dan Non Gizi Pangan

Jakarta : Direktorat Standardisasi Pangan Olahan
Deputi Bidang Pengawasan Pangan Olahan, Badan POM, 2019
79 hal : 18,2 cm x 25,7 cm

ISBN: 978-979-3665-42-9

Tim Pakar

Dr. Drs. Rimbawan, PhD
Dr. Ir. Nurheni Sri Palupi, M.Si.
Dr. Zuraidah Nasution, S. TP., M.Sc.

Tim Penyusun

Yusra Egayanti, S.Si., Apt., M.P.
Pratiwi Yuniarti M., STP, MP
Mafira Putri Ramadhani, S.Gz
Hilman Naafi Achmad, S.T

Tim Penyunting

Yusra Egayanti, S.Si., Apt., M.P.
Sofhiani Dewi, STP, M.Si
Pratiwi Yuniarti Martoyo, STP, MP
Ati Widya Perana, SP, MP
Nurul Ikka Sekardani, S.Farm, Apt
Dwi Retno Widyastuti, ST, M.Si
Mafira Putri Ramadhani, S.Gz
Hilman Naafi Achmad, S.T
Nur Lisa Rahmaningtyas, STP
Maditus Sutopo, SH
Asma Zahidah, S.Farm, Apt

Hak Cipta dilindungi Undang-undang

Diterbitkan oleh :

Direktorat Standardisasi Pangan Olahan
Deputi Bidang Pengawasan Pangan Olahan
Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia
Jalan Percetakan Negara Nomor 23
Jakarta - 10560 – Indonesia
Telp: (+6221) 42875584, Fax: (+6221) 42875780
Email: standarpangan@pom.go.id

Dilarang mengutip atau memperbanyak atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku dalam bentuk elektronik, mekanik, fotokopi, rekaman atau cara apapun tanpa izin tertulis sebelumnya dari Badan POM RI.

SAMBUTAN

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah Yang Maha Esa, dengan selesainya buku Pedoman Evaluasi Mutu Gizi dan Non Gizi Pangan. Pedoman ini merupakan panduan untuk mengevaluasi mutu zat gizi dan zat non gizi dalam pangan. Pedoman ini disusun untuk mendukung implementasi/pemenuhan persyaratan jumlah dan mutu zat gizi/non gizi dalam pangan yang diatur dalam Peraturan Kepala Badan POM No. 1 Tahun 2018 tentang Pangan Olahan untuk Keperluan Gizi Khusus (PKGK) khususnya, dan peraturan terkait mutu dan gizi pangan olahan lainnya.

Pedoman ini dapat digunakan sebagai acuan bagi pemangku kepentingan dalam pengawasan produk pangan olahan baik pengawasan sebelum beredar maupun sudah beredar. Pedoman ini juga dapat digunakan sebagai panduan bagi pelaku usaha dalam menganalisis dan mengevaluasi mutu gizi produk pangan termasuk pelaku usaha mikro, kecil, dan menengah. Diharapkan dengan terbitnya pedoman ini, dapat mendukung penerapan/implementasi regulasi dalam rangka menjamin mutu dan gizi pangan. Ucapan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam penerbitan pedoman ini dan semoga pedoman ini dapat bermanfaat bagi seluruh pihak.

Jakarta, 27 Desember 2019

Deputi Bidang Pengawasan Pangan Olahan



Dra. Reri Indriani, Apt., M.Si.

KATA PENGANTAR

Badan POM telah menerbitkan peraturan terkait persyaratan mutu dan kandungan gizi/non gizi pada pangan olahan seperti Peraturan Kepala Badan POM No. 1 Tahun 2018 tentang Pangan Olahan untuk Keperluan Gizi Khusus (PKGK) maupun peraturan terkait mutu dan gizi pangan olahan lainnya. Dalam rangka implementasi peraturan tersebut, disusunlah pedoman evaluasi mutu gizi dan non gizi ini.

Pedoman ini memuat tentang panduan melakukan evaluasi mutu dan analisis kuantitatif zat gizi, baik zat gizi makro, zat gizi mikro, maupun zat non gizi pada pangan olahan. Evaluasi mutu dan analisis kuantitatif memuat prinsip, metode analisis, faktor konversi, dan cara perhitungan. Zat gizi mencakup protein, lemak, karbohidrat, vitamin, dan mineral. Vitamin mencakup vitamin yang larut air dan lemak, sedangkan mineral meliputi kalsium, fosfor, natrium, kalium, klorida, magnesium, zat besi, iodium, seng, dan selenium.

Terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan semoga pedoman dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jakarta, 27 Desember 2019

Direktur Standardisasi Pangan Olahan



Dra. Sutanti Siti Namtini, Apt., Ph.D

DAFTAR ISI

SAMBUTAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
PENDAHULUAN	1
1. Latar Belakang	1
2. Tujuan.....	2
3. Sasaran	2
BAB I.....	3
PROTEIN	3
1. Analisis Kuantitatif	3
1.1 Prinsip Metode	3
1.2 Faktor Konversi Nitrogen	3
2. Evaluasi Mutu.....	4
2.1 Profil Asam Amino.....	4
2.2 Skor Kimia	5
2.3 Lisin Tersedia (<i>Available Lysine</i>)	7
2.4 <i>Protein Efficiency Ratio</i> (PER)	13
2.5 Daya Cerna Protein Sejati (<i>True Protein Digestibility</i>)	16
2.6 Nilai Biologis (NB)	17
2.7 <i>Net Protein Utilization</i> (NPU) Hitung	18
2.8 <i>Protein Digestibility – Corrected Amino Acid Score</i> (PDCAAS)	19
2.9 <i>The Digestible Indispensable Amino Acid Score</i> (DIAAS)	21

BAB II.....	23
LEMAK	23
1. Analisis Kuantitatif	23
1.1 Prinsip Metode	23
2. Evaluasi Mutu	23
2.1 Bilangan Iod	23
2.2 Bilangan Peroksida	24
2.3 Penentuan Asam Thiobarbiturat (TBA).....	25
2.4 Bilangan Asam dan Asam Lemak Bebas (FFA)	26
2.5 Profil Asam Lemak	28
BAB III.....	35
KARBOHIDRAT	35
1. Analisis Kuantitatif	35
1.1 Metode Analisis Total Karbohidrat <i>By</i>	
<i>Difference</i>	35
1.2 Metode Analisis Karbohidrat Tersedia <i>By</i>	
<i>Difference</i>	35
2. Evaluasi Mutu	36
2.1 Indeks Glikemik (IG) dan Beban Glikemik (BG)	36
2.2 Serat Kasar	40
2.3 Analisis Kadar Amilosa.....	41
2.4 Penetapan Serat Pangan	43
2.5 Analisis Serat Pangan Larut dan Tidak Larut	45
2.6 Analisis Pati Resisten	47
BAB IV	52
VITAMIN	52
1. Vitamin Larut Lemak	52
1.1 Vitamin A dan Provitamin A (Karotenoid)	52
1.2 Vitamin D	53
1.3 Vitamin E.....	54

1.4 Vitamin K	55
2. Vitamin Larut Air	56
2.1 Vitamin B ₁ (Thiamin).....	56
2.2 Vitamin B ₂ (Riboflavin).....	56
2.3 Vitamin B ₃ (Niasin).....	57
2.4 Vitamin B ₅ (Asam Pantotenat).....	58
2.5 Vitamin B ₆ (Piridoksin).....	59
2.6 Vitamin B ₇ (Biotin)	59
2.7 Vitamin B ₉ (Folat).....	60
2.8 Vitamin B ₁₂ (Kobalamin).....	61
2.9 Vitamin C	61
BAB V	63
MINERAL.....	63
1. Kalsium	63
2. Fosfor	64
3. Natrium.....	65
4. Kalium	66
5. Klorida.....	66
6. Magnesium	67
7. Zat Besi	68
8. Iodium.....	68
9. Seng.....	69
10.Selenium	69
DAFTAR PUSTAKA.....	70

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Faktor Konversi Nitrogen	4
Tabel 2. Kebutuhan Asam Amino berdasarkan Rekomendasi FAO/WHO (2013).....	5
Tabel 3. Contoh Penetapan Skor Kimia suatu Protein berdasarkan Standar FAO/WHO (2013).....	6
Tabel 4. Komposisi Ransum yang Dianjurkan untuk Penetapan PER	13
Tabel 5. Komposisi Campuran Vitamin untuk Penetapan PER menurut AOAC	14
Tabel 6. Nilai Daya Cerna Protein Sejati Pangan berdasarkan Hasil Penelitian pada Manusia	17
Tabel 7. Nilai PDCAAS Beberapa Pangan Dibandingkan dengan Nilai PER Relatif dan NPR Relatif.....	20
Tabel 8. Koefisien Daya Cerna Protein Sejati.....	22
Tabel 9. Tolak Ukur Jenis Minyak berdasarkan Asam Lemak Bebas	27
Tabel 10. Nama Sistematis dan Nama Umum berdasarkan Panjang Rantai.....	29
Tabel 11. Penamaan Omega berdasarkan Nama Umum, Struktur, dan Ikatan Rangkap.....	32
Tabel 12. Indeks Glikemik Pangan.....	37

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Pangan merupakan kebutuhan manusia yang sangat mendasar karena berpengaruh terhadap eksistensi dan ketahanan hidupnya baik dipandang dari segi kuantitas dan kualitasnya. Sementara itu, kemajuan teknologi, perdagangan internasional, serta perubahan gaya hidup telah membawa perubahan-perubahan yang cepat dan signifikan pada industri pangan. Berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan, bahwa pangan yang aman, bermutu dan bergizi sangat penting peranannya bagi pertumbuhan, pemeliharaan, dan peningkatan derajat kesehatan serta peningkatan kecerdasan masyarakat, sehingga pemerintah berupaya untuk memastikan bahwa pangan yang beredar adalah pangan yang aman, bermutu, dan bergizi.

Dalam rangka menjamin keamanan, mutu, dan gizi pangan, Badan POM telah menerbitkan beberapa peraturan yang salah satunya adalah peraturan terkait pangan olahan untuk keperluan gizi khusus, yaitu Peraturan Kepala Badan POM No. 1 Tahun 2018 tentang Pengawasan Pangan Olahan untuk Keperluan Gizi Khusus, yang mempersyaratkan ketentuan jumlah dan mutu gizi pangan. Pemenuhan gizi pangan bagi kesehatan masyarakat tidak hanya ditentukan oleh jumlah zat gizi yang tersedia dalam pangan, namun mutu gizi juga sangat menentukan manfaat pangan untuk meningkatkan kualitas derajat kesehatan. Mutu gizi yang tidak memadai dapat mempengaruhi status gizi dan derajat kesehatan masyarakat, terlebih produk merupakan pangan untuk keperluan gizi khusus yang ditujukan untuk target konsumen yang rentan yang memerlukan produk untuk meningkatkan kualitas hidup bahkan mempertahankan hidup. Mempertimbangkan hal tersebut, pemerintah dalam hal ini Badan POM memandang perlu untuk menyusun panduan penilaian mutu gizi dan non gizi pangan.

2. Tujuan

Pedoman evaluasi mutu gizi dan non gizi pangan dimaksudkan untuk digunakan sebagai:

- a. Acuan dalam pengawasan produk pangan olahan baik pengawasan sebelum beredar maupun sudah beredar.
- b. Panduan bagi pelaku usaha dalam menganalisis dan mengevaluasi mutu gizi produk.

3. Sasaran

Pedoman evaluasi mutu gizi dan non gizi pangan diharapkan dapat dimanfaatkan oleh:

- a. Tenaga pengawas pangan olahan.
- b. Pelaku usaha pangan olahan.
- c. Penyuluh keamanan pangan.

BAB I

PROTEIN

1. Analisis Kuantitatif

1.1 Prinsip Metode

Pengukuran kadar protein secara kuantitatif dapat dilakukan melalui pendekatan dengan menghitung kadar nitrogen total. Oleh karena itu kadar yang diperoleh seringkali disebut sebagai kadar “*crude*” protein atau protein kasar. Metode yang biasa digunakan untuk menetapkan kadar protein dalam pangan melalui pengukuran nitrogen dengan metode Kjeldahl. Prinsip kerja metode Kjeldahl yaitu destruksi sampel dengan asam sulfat dan katalisator. Hasil destruksi tersebut kemudian didestilasi dengan penambahan basa kuat sehingga menghasilkan amonia. Destilat selanjutnya dititrasi hingga berubah warna. Volume titrasi digunakan untuk menentukan kadar nitrogen. Kadar protein didapat dengan mengalikan kadar nitrogen total dengan faktor konversi. Namun, kadar protein yang didapat merupakan kadar protein kasar karena tidak semua nitrogen yang teranalisis berasal dari protein.

Perhitungan kadar protein adalah sebagai berikut:

$$\% N = \frac{\text{ml HCl (sampel - blanko)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000} \times N \text{ HCl} \times 14,008 \times 100\%$$

$$\text{Kadar Protein} = FK \times \% N$$

FK : Faktor Konversi

1.2 Faktor Konversi Nitrogen

Kadar protein dalam pangan dihitung dengan menggunakan faktor konversi yaitu dengan cara mengalikan jumlah N yang diperoleh dengan faktor konversi.

Tabel 1. Faktor Konversi Nitrogen

Pangan	Faktor Konversi
Hewani	
Susu	6,38
Daging, ikan, dan telur	6,15
Ayam	5,53
Nabati	
Gandum (utuh)	5,83
Terigu	5,70
Jagung	5,60
Makaroni, spaghetti	5,70
Beras (semua varietas)	5,95
Rye, Barley, dan Oats	5,83
Kacang Tanah	5,46
Kedelai	5,71
Wijen, Biji bunga matahari	5,30
Sayuran dan jamur	4,40
Kelapa	5,30
Pangan lainnya	5,60

2. Evaluasi Mutu

2.1 Profil Asam Amino

Salah satu evaluasi mutu protein dilakukan dengan menentukan profil asam amino esensial (AAE). Penentuan profil asam amino esensial dapat dilakukan menggunakan metode kromatografi antara lain menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT/HPLC) atau Penganalisis Asam Amino (*Amino Acid Analyzer*). Pangan yang mengandung protein bermutu tinggi dinilai berdasarkan kelengkapan komposisi dan jumlah asam amino esensial dibandingkan dengan protein standar. Pola kebutuhan asam amino esensial berdasarkan

kategori usia sesuai dengan rekomendasi dari FAO/WHO (2013) adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Kebutuhan Asam Amino berdasarkan Rekomendasi FAO/WHO (2013)

Asam Amino Esensial	Pola Kebutuhan Asam Amino		
	Bayi (3 – 6 bulan)	Batita (6 – 36 bulan)	Anak dan Dewasa (4 – 50 tahun)
	(mg/g protein)		
Histidin	21	20	16
Isoleusin	55	32	30
Leusin	96	66	61
Lisin	69	57	48
Metionin + Sistin	33	27	23
Fenilalanin + Tirosin	94	52	41
Treonin	44	31	25
Triptofan	17	8,5	6,6
Valin	55	43	40

2.2 Skor Kimia

Metode ini didasari oleh nilai biologis suatu protein dibatasi dengan proporsi relatif asam amino esensial yang terkandung di dalamnya. Metode ini dikembangkan oleh Block dan Mitchell (1946-1947) dengan cara membandingkan setiap asam amino yang terkandung dalam protein tersebut dengan yang terkandung dalam protein telur sebagai protein standar. Kemudian nilai mutu gizi protein dinyatakan oleh asam amino esensial yang paling defisien dibandingkan dengan referensi (telur utuh). Metode ini dapat

digunakan untuk menentukan skor asam amino baik untuk protein tunggal maupun produk campuran. Namun, daya cerna protein yang merupakan aspek penting dalam penentuan kualitas protein tidak diperhitungkan. Selain itu, metode ini juga bergantung pada teknik analisis asam amino serta tidak mempertimbangkan keberadaan komponen lain yang dapat mempengaruhi pencernaan dan utilisasi protein.

Metode skor kimia kemudian disederhanakan oleh McLaughlan dkk. (1959) karena asam amino pembatas (*limiting AA*) dalam sebagian besar pangan adalah lisin, metionin (metionin+sistin), dan terkadang triptofan. Sehingga perhitungan skor kimia hanya dilakukan terhadap asam-asam amino tersebut. Dalam metode ini, skor setiap asam amino esensial dinyatakan sebagai persentase konsentrasi yang dinyatakan sebagai persentase konsentrasi yang terdapat dalam telur utuh (sebagai protein referensi dengan nilai 100), perhitungannya sebagai berikut:

$$\text{Skor Asam Amino} = \frac{\text{Jumlah AAE dalam protein sampel}}{\text{Jumlah AAE dalam protein standar}} \times 100$$

Skor kimia dinyatakan oleh angka skor asam amino yang terendah. Dalam hal ini, apabila metionin merupakan asam amino esensial yang paling defisien, maka hanya kadar metionin saja yang digunakan dalam perhitungan skor.

Tabel 3. Contoh Penetapan Skor Kimia suatu Protein berdasarkan Standar FAO/WHO (2013)

Asam Amino Esensial	Kadar dalam sampel	Referensi FAO/WHO (2013)	Skor asam amino *)	Skor kimia
	(mg/g protein)			
Isoleusin	29	21	100	

Asam Amino Esensial	Kadar dalam sampel	Referensi FAO/WHO (2013)	Skor asam amino *)	Skor kimia
	(mg/g protein)			
Leusin	65	55	100	
Lisin	72	96	75	75
Metionin + Sistin	71	69	100	
Fenilalanin + Tirosin	40	33	100	
Treonin	89	94	95	95
Triptofan	50	44	100	
Valin	22	17	100	

*) Apabila angka perhitungan >100, maka ditulis sebagai 100

Dari tabel tersebut ditunjukkan bahwa asam amino lisin yaitu 75, sedangkan angka terendah kedua adalah treonin yaitu 95. Hal ini berarti bahwa skor kimia sampel protein tersebut adalah 75 dengan asam amino pembatas utama adalah lisin dan asam amino pembatas kedua adalah treonin.

2.3 Lisin Tersedia (*Available Lysine*)

Dalam pengolahan pangan, asam amino dalam protein biasanya bereaksi dengan senyawa lain contohnya dengan gula pereduksi dalam reaksi Maillard. Salah satu asam amino yang paling mudah bereaksi adalah lisin karena mengandung grup amino “bebas” yaitu epsilon-amino yang dapat berikatan dengan senyawa-senyawa lain. Selain itu, analisis lisin penting mengingat beberapa produk pangan seperti sereal mengandung jenis asam amino ini. Reaksi lisin dengan senyawa lain dapat mengakibatkan lisin tersebut tidak dapat dicerna, diserap dan digunakan oleh tubuh, sedangkan lisin merupakan salah satu asam amino esensial dan sering kali

merupakan asam amino pembatas dalam protein nabati terutama sereal. Ketidakterersediaan lisin mempengaruhi mutu protein suatu pangan. Terdapat 3 metode untuk penetapan kadar lisin, yaitu metode FDNB, metode TNBS₁, dan metode TNBS₂.

a) Metode FDNB

a. Prinsip

Dalam metode ini, protein sampel direaksikan dengan 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB). Protein yang telah dinitrofenilasi tersebut, kemudian dihidrolisis dengan asam dan senyawa-senyawa yang tidak reaktif dipisahkan dari turunan dinitrofenil dengan cara ekstraksi menggunakan dietil eter.

Turunan-turunan DNP berwarna yang paling banyak terdapat dalam hidrolisat protein tersebut adalah epsilon-DNP-lisin, alfa-DNP-arginin, delta-DNP-ornitin, dan epsilon-DNP-hidroksilisin. Densitas optik total campuran turunan-turunan tersebut adalah seperti yang ditunjukkan oleh larutan dalam tabung A. Penambahan metil kloroformiat dan asam klorida, diikuti oleh ekstraksi menggunakan dietil eter akan memisahkan epsilon-DNP-lisin dari senyawa-senyawa DNP lainnya yang akan tersebar dalam fase cair larutan dalam tabung B. Perbedaan densitas optik pada panjang gelombang 435 nm antara larutan A dan B adalah densitas optik epsilon-DNP-lisin. Angka ini selanjutnya dibandingkan dengan densitas optik larutan standar epsilon-DNP-lisin-HCl.

b. Pereaksi

- 1) Larutan NaHCO₃ 8%.
- 2) Larutan FDNB (sigma atau fluka) 2,5% dalam ethanol.
- 3) Larutan HCl 1 N; 8,1 N; dan 12 N.
- 4) Larutan NaOH 2,5 N.

- 5) Dietil eter.
- 6) Fenolftalein 40 mg/mL dalam ethanol 60%.
- 7) Larutan Na_2CO_3 1 M; pH 8,5.
- 8) Larutan metil kloroformiat 97% (sigma atau fluka).
- 9) Larutan epsilon-DNP-lisin-HCl (sigma) 0,12% dalam HCl 8,1 N.

c. Prosedur

- 1) Lebih kurang 1 g sampel disuspensikan dalam 10 mL larutan NaHCO_3 8%, kemudian ke dalamnya ditambahkan 15 mL larutan FDNB 2,5%. Campuran ini diaduk selama 2 jam pada suhu ruang.
- 2) Ethanol dalam campuran tersebut diuapkan dengan cara menempatkan campuran dalam penangas air 100°C . Kemudian 30 mL HCl 8,1 N ditambahkan pada residu. Selanjutnya hidrolisis asam terhadap protein dilakukan di bawah refluks selama 16 jam.
- 3) Larutan hidrolisat kemudian disaring dengan kertas saring Whatman nomor 1 dan volume filtrat yang diperoleh ditepatkan menjadi 250 mL dengan air destilata.
- 4) Sebanyak 2 mL filtrat dan 2 mL dietil eter dimasukkan ke dalam tabung reaksi A dan B yang masing-masing telah diberi tanda tera 10 mL. Ekstraksi dilakukan dengan cara mengocok tabung secara hati-hati.
- 5) Setelah ekstraksi, fase eter dihilangkan dengan cara dekantasi dan residu eter dihilangkan dengan cara penguapan, yaitu merendam tabung dalam penangas air 100°C . Ekstraksi dengan dietil eter diulangi lagi sebanyak dua kali.
- 6) Setelah ekstraksi sebanyak tiga kali, volume tabung A ditepatkan menjadi 10 mL dengan penambahan HCl 1 N.

Kemudian densitas optiknya diukur dengan spektrofotometer pada Panjang gelombang 435 nm.

- 7) Kemudian ditambahkan satu tetes fenolftalein ke dalam tabung B, kemudian NaOH tetes demi tetes hingga timbul warna merah. Setelah itu, ditambahkan 2 mL larutan Na_2CO_3 1 M; pH 8,5; dan 50 μL metil kloroformiat. Campuran segera diaduk secara perlahan (dalam ruang asam, metil kloroformiat bersifat iritan terhadap mata).
- 8) Setelah 10 menit, tambahkan 0,75 mL HCl 12 N, kemudian campuran diekstraksi tiga kali dengan 5 mL dietil eter. Selanjutnya volume tabung B ditepatkan menjadi 10 mL dengan menambahkan akuades. Kemudian densitas optiknya diukur pada panjang gelombang 435 nm.
- 9) Perbedaan densitas optik larutan A dan B adalah densitas optik epsilon-DNP-lisin. Nilai ini dibandingkan dengan densitas optik larutan standar epsilon-DNP-lisin-HCl dalam HCl 8,1 N. Kadar lisin tersedia dihitung dalam satuan g/100 g protein (berat kering).

b) Metode (TNBS)₁

a. Prinsip

Protein sampel direaksikan dengan trinitrobenzensulfonat (TNBS). Protein yang telah mengalami trinitrofenilasi tersebut kemudian dihidrolisis dengan asam. Selanjutnya senyawa-senyawa selain epsilon-trinitrofenil-lisin dipisahkan dengan cara ekstraksi menggunakan etil eter. Kemudian densitas optik larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 346 nm. Kadar lisin tersedia (epsilon-TNP-lisin) dihitung dengan menggunakan nilai absorptivitas molar sebesar $1,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

b. Perekasi

- 1) Larutan NaHCO_3 4%; pH 8,5.
- 2) Larutan trinitrobenzensulfonat (TNBS) 1% (dalam akuades).
- 3) Larutan HCl pekat.
- 4) Etil eter.

c. Prosedur

- 1) Sebanyak 10 mg sampel protein yang telah ditepungkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup, kemudian ditambahkan ke dalamnya 1 mL larutan NaHCO_3 4%. Suspensi ditempatkan dalam penangas air bergoyang (*shaker*) pada suhu 40°C selama 10 menit.
- 2) Kemudian ditambahkan ke dalamnya 1 mL larutan TNBS 1%. Reaksi dibiarkan berlangsung selama 2 jam pada suhu 40°C dan kemudian ditambahkan 3 mL HCl pekat.
- 3) Tabung reaksi ditutup rapat, kemudian dipanaskan dalam otoklaf pada suhu 120°C selama 1 jam.
- 4) Didinginkan hingga mencapai suhu ruang, kemudian disaring dan dicuci lima kali dengan 1 mL akuades.
- 5) Filtrat yang diperoleh kemudian diekstrak dengan 10 mL etil eter. Fase eter dipisahkan dengan cara dekantasi dan residu eter dihilangkan dengan cara meletakkan tabung dalam air mendidih selama 5 menit. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali.
- 6) Kemudian fase air diukur densitas optiknya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 345 nm dengan suatu blanko yang diperlakukan sama dengan prosedur di atas, kecuali penambahan HCl pekat ke dalam larutan protein

dilakukan sebelum penambahan TNBS. Blanko juga dapat dibuat seperti di atas namun tanpa ada protein.

- 7) Kadar lisin tersedia (epsilon-TNP-lisin) dihitung dengan menggunakan absorptivitas molar sebesar $1,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

c) Metode (TNBS)₂

a. Prinsip

Sampel protein direaksikan dengan pereaksi TNBS (trinitrobenzensulfonat) seperti halnya pada metode TNBS₁ sehingga prinsipnya sama, kecuali bahwa metode ini hanya dapat digunakan untuk protein yang bersifat larut dalam air.

b. Pereaksi

- 1) Larutan NaHCO₃ 0,47 M.
- 2) Larutan TNBS 34 mM (dalam akuades).
- 3) Larutan HCl pekat.
- 4) Etil eter.
- 5) Larutan standar epsilon-TNP-lisin.

c. Prosedur

- 1) Larutan protein 0,5 mL (90 mg dalam 15 mL larutan NaHCO₃ 0,47 M) dalam tabung hidrolisis vakum ditambahkan 0,5 mL pereaksi TNBS 34 mM dan campuran diinkubasikan selama 2 jam pada suhu 40°C.
- 2) Selanjutnya ditambahkan 1,5 mL HCl pekat, kemudian tabung divakumkan dan ditutup. Selanjutnya hidrolisis asam terhadap protein dilakukan pada suhu 110°C selama 90 menit dalam autoklaf atau panci bertekanan.
- 3) Setelah didinginkan, hidrolisat diencerkan menjadi 25 mL dengan menambahkan akuades. Sebanyak 5 mL alikuot hidrolisat diekstraksi sebanyak empat kali dengan 5 mL etil eter (dilakukan seperti pada metode (TNBS)₁).

- 4) Densitas optik fase air diukur pada panjang gelombang 346 nm menggunakan blanko seperti pada metode TNBS₁ di atas.
- 5) Kadar lisin tersedia (epsilon-TNP-lisin) dihitung berdasarkan kurva standar yang dibuat dari densitas optik berbagai konsentrasi larutan epsilon-TNP-lisin.

2.4 Protein Efficiency Ratio (PER)

PER merupakan perbandingan antara pertambahan berat badan tikus dengan jumlah protein yang dikonsumsi tikus. Perhitungan PER digunakan untuk menghitung efisiensi suatu protein pangan dalam sintesis protein di dalam tubuh. PER merupakan metode evaluasi nilai gizi protein yang paling banyak digunakan dan sudah diterima sebagai metode resmi untuk menilai mutu gizi protein dalam pelabelan gizi oleh *Food and Drug Administration* (FDA). Prosedur yang digunakan adalah metode dalam AOAC (1984). Komposisi ransum yang digunakan dan komposisi campuran vitamin adalah sebagai berikut:

Tabel 4. Komposisi Ransum yang Dianjurkan untuk Penetapan PER

Bahan Campuran	Jumlah (%)
Protein	$Y = (1,6 \times 100) : (\% N \text{ sampel})^*)$
Minyak biji kapas	$8 - (Y \times (\% \text{ ekstrak eter}) : 100$
Campuran garam	$5 - (Y \times (\% \text{ kadar abu}) : 100$
Campuran vitamin	1
Selulosa	$1 - (Y \times (\% \text{ kadar serat kasar}) : 100$
Air	$5 - (Y \times (\% \text{ kadar air}) : 100$
Sukrosa atau pati jagung	Untuk menjadikan 100%

*) untuk memperoleh kadar protein ransum = 10%

Tabel 5. Komposisi Campuran Vitamin untuk Penetapan PER menurut AOAC

Jenis Vitamin	Jumlah (mg/g ransum)^{*)}
Vitamin A (kering, stabil)	2000 IU
Vitamin D (kering, stabil)	200 IU
Vitamin E (kering, stabil)	10 IU
Vitamin K ₃	0,5
Kolin	200
Asam P-aminobenzoat	10
Inositol	10
Niasin	4
Kalsium pantotenat	4
Riboflavin	0,8
Tiamin-HCl	0,5
Piridoksin-HCl	0,5
Asam Folat	0,2
Biotin	0,04
Vitamin B12	0,003
Glukosa	1000

*) kecuali untuk vitamin A, D, dan E

Tikus yang digunakan adalah tikus jantan yang disapih dari strain yang sama dan berumur 21-23 hari. Variasi berat antar tikus jangan melebihi 10 g. Waktu adaptasi yang diperlukan untuk membawa tikus dari tempat lain yang cukup jauh adalah 3-5 hari. Pengujian PER dilakukan selama 28 hari dengan kasein ANRC (*Animal Nutrition Research Council*) sebagai protein referensi.

Satu kelompok tikus terdiri dari 10 ekor atau lebih dengan perbedaan berat antar grup adalah 5 g atau kurang pada hari pertama percobaan dimulai. Berat tikus dan jumlah ransum yang

dikonsumsi harus dicatat secara berkala yaitu berat badan tikus dicatat setiap dua hari sekali dan jumlah ransum yang dikonsumsi dicatat setiap hari. Tikus harus diberi kandang masing-masing yaitu satu ekor tikus per satu kandang dan diberi ransum serta air minum secara *ad libitum* yaitu tikus diperbolehkan untuk makan atau minum dengan jumlah yang tidak dibatasi.

Perhitungan PER dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$PER = \frac{\text{Pertambahan Berat Badan (g)}}{\text{Jumlah Protein yang Dikonsumsi (g)}}$$

$$PER \text{ Kasein Diperoleh} = \frac{\text{Pertambahan Berat Badan (g)}}{\text{Jumlah Protein yang Dikonsumsi Kelompok Kasein (g)}}$$

$$PER \text{ Uji Diperoleh} = \frac{\text{Pertambahan Berat Badan (g)}}{\text{Jumlah Protein yang Dikonsumsi Kelompok Uji (g)}}$$

Perhitungan harus dilakukan untuk setiap ekor tikus, dimana nilai rata-rata dihitung untuk setiap kelompok. Apabila digunakan kasein selain kasein ANRC, maka nilai PER yang diperoleh dari percobaan distandardisasi sebagai berikut:

$$PER \text{ Kasein Terstandardisasi} = \frac{2,5}{PER \text{ Kasein yang Diperoleh}}$$

$$PER \text{ Sampel Terstandardisasi} = \frac{PER \text{ Sampel yang Diperoleh}}{PER \text{ Kasein yang Diperoleh}} \times 2,5$$

Data PER sampel dapat distandardisasi dengan cara lain, yaitu dihitung sebagai persentase dari PER Kasein. Persentase dari nilai PER Kasein bukan merupakan persentase dari nilai gizi kasein karena PER bukan merupakan fungsi linier. Faktor yang paling berpengaruh terhadap nilai PER adalah kadar protein ransum

sehingga dibuat standardisasi untuk kadar protein ransum adalah 10%.

2.5 Daya Cerna Protein Sejati (*True Protein Digestibility*)

Daya cerna protein sejati ditentukan berdasarkan dua studi keseimbangan nitrogen. Namun, daya cerna protein sejati hanya melihat jumlah nitrogen yang dikonsumsi, jumlah nitrogen feses, dan dikoreksi dengan jumlah nitrogen feses kelompok yang tidak diberikan protein. Daya cerna protein sejati atau *true protein digestibility* merupakan perbaikan dari pencernaan protein semu (*apparent digestibility of protein*). Pencernaan semu tidak memperhitungkan jumlah nitrogen yang diekskresikan dalam feses yang bukan berasal dari protein diet. Oleh karena itu, pencernaan protein semu akan meningkat seiring dengan meningkatnya asupan protein, namun tidak dengan daya cerna protein sejati yang relatif konstan meskipun jumlah protein yang dikonsumsi ditingkatkan. Hal ini membuat daya cerna protein sejati lebih disarankan dalam menilai kualitas protein dibandingkan pencernaan protein semu. Daya cerna protein sejati ditentukan secara biologis menggunakan tikus percobaan. Daya cerna protein sejati dihitung dengan menggunakan rumus:

$$DC \text{ Protein Sejati} = \frac{N \text{ yang dikonsumsi} - (N_{\text{feses}} - N_{\text{metabolik}})}{N \text{ yang Dikonsumsi}} \times 100\%$$

Berikut ini terdapat contoh nilai daya cerna protein sejati beberapa macam pangan untuk keperluan praktis industri pangan, dimana nilai daya cerna protein sejati berikut dapat digunakan sebagai referensi atau dapat digunakan dalam penetapan PDCAAS, sebagai berikut:

Tabel 6. Nilai Daya Cerna Protein Sejati Pangan berdasarkan Hasil Penelitian pada Manusia

Pangan	Daya Cerna Protein Sejati (%)	Pangan	Daya Cerna Protein Sejati (%)
Jagung	85	<i>Oatmeal</i>	86
Biji Kapas	90	<i>Oat, cereal</i>	72
Telur	97	<i>Peanut Butter</i>	95
Daging, Ikan	94	Kacang Tanah	94
Susu, Keju	95	Kacang Kapri (tua)	88
Tepung Kedelai	86	<i>Rice, cereal</i>	75
Isolat Protein Kedelai	95	Beras Putih	88
Tepung Terigu	96	Gluten Terigu	99

2.6 Nilai Biologis (NB)

Nilai biologis merupakan salah satu cara mengetahui kualitas protein yang dibandingkan dengan kebutuhan tubuh. Nilai biologis didapatkan dari perbandingan jumlah nitrogen yang dipertahankan tubuh dengan jumlah nitrogen yang diserap tubuh. Artinya, metode ini menggambarkan seberapa cocok asam amino yang diserap tubuh dapat memenuhi kebutuhan tubuh. Metode ini melibatkan dua penelitian keseimbangan nitrogen. Studi pertama adalah studi tanpa memberikan protein dalam diet hewan coba. Hal ini diperlukan untuk melihat jumlah nitrogen dikeluarkan tubuh melalui feses dan urin yang bukan berasal dari asupan protein. Sedangkan studi kedua

yaitu studi dengan memberikan protein uji pada hewan coba. Metode ini juga dapat dilakukan pada manusia. Adapun kelemahan metode ini yaitu butuh banyak tenaga untuk melakukannya dan relatif lebih mahal. Selain itu, jumlah nitrogen yang dipertahankan tubuh belum tentu dapat diutilisasi dengan baik serta perbedaan tipe pangan yang dikonsumsi antara pada proses pengujian dengan yang biasa dikonsumsi dapat saja berbeda sehingga juga dapat mempengaruhi kualitas protein. Berikut rumus perhitungan nilai biologis:

$$NB = \frac{N \text{ yang Tertinggal dalam tubuh}}{N \text{ yang Diabsorpsi oleh tubuh}}$$

Rumus tersebut kemudian diadopsi oleh Mitchell (1923-1924) karena rumus tersebut memerlukan ketelitian dalam pengumpulan dan pengukuran pangan yang dikonsumsi serta ekskreta (feses dan urine) sehingga sangat sulit dilakukan. Rumus adopsi tersebut adalah:

$$NB = \frac{N \text{ yang dikonsumsi} - (N_{\text{feses}} - N_{\text{metabolik}}) - (N_{\text{urin}} - N_{\text{endogen}})}{Nitrogen \text{ yang Dikonsumsi} - (N_{\text{feses}} - N_{\text{metabolik}})} \times 100$$

2.7 Net Protein Utilization (NPU) Hitung

Net protein utilization (NPU) merupakan metode yang hampir sama dengan nilai biologis. Perbedaan hanya pada pembagi dimana pada metode ini jumlah dikonsumsi sebagai pembanding. Artinya, metode ini menggambarkan bagaimana protein yang dikonsumsi dapat dipertahankan oleh tubuh. NPU sering digunakan oleh industri peternakan dalam menentukan jenis pakan untuk meningkatkan berat daging namun harga relatif lebih murah. NPU merupakan perbandingan antara jumlah nitrogen yang diretensi dalam tubuh dengan jumlah nitrogen yang dikonsumsi, sehingga dapat dihitung

sebagai hasil perkalian antara Nilai Biologis dan Daya Cerna Sejati dengan rumus:

$$NPU = \frac{N \text{ yang dikonsumsi} - (N_{\text{feses}} - N_{\text{metabolik}}) - (N_{\text{urin}} - N_{\text{endogen}})}{N \text{ yang Dikonsumsi}} \times 100$$

2.8 Protein Digestibility – Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)

Metode yang menggabungkan daya cerna protein sejati yang ditetapkan secara biologis (tikus percobaan) dengan skor asam amino esensial dengan nilai terendah (skor kimia). Perhitungan skor asam amino digunakan pola asam amino esensial yang ditetapkan oleh FAO/WHO (2013) pada Tabel 2 sebelumnya.

Prosedur untuk menghitung PDCAAS adalah sebagai berikut:

1) Penetapan kadar protein

Penetapan kadar protein sampel dilaksanakan dengan menggunakan metode Kjeldahl, kemudian dihitung kadar protein sampel dengan cara mengalikan kadar total nitrogen dengan faktor konversi (berdasarkan pada Tabel 1 sebelumnya).

2) Analisis Asam Amino

Profil asam amino esensial sampel dalam satuan mg/g protein diperoleh dari hasil analisis asam amino.

3) Perhitungan Skor Asam Amino

Skor asam amino esensial dihitung dengan rumus:

$$\text{Skor asam amino} = \frac{\text{mg AAE dalam 1 g protein sampel}}{\text{mg AAE dalam 1 g protein standar}} \times 100$$

Protein standar yang digunakan dalam perhitungan skor asam amino ini adalah protein referensi FAO/WHO (2013) pada Tabel 2 sebelumnya.

4) Penetapan Daya Cerna Protein

Daya cerna protein sejati ditentukan secara biologis menggunakan hewan (tikus) percobaan sebagaimana yang

dijelaskan pada subbab 2.5. Daya cerna protein sejati dihitung dengan menggunakan rumus:

$$DC \text{ Protein Sejati} = \frac{N \text{ yang dikonsumsi} - (N_{\text{feses}} - N_{\text{metabolik}})}{N \text{ yang Dikonsumsi}} \times 100\%$$

5) Perhitungan PDCAAS

PDCAAS dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$PDCAAS = \text{Skor AAE Terendah} \times DC \text{ Protein Sejati}$$

Berikut ini terdapat contoh nilai PDCAAS beberapa macam pangan dibandingkan dengan nilai PER dan NPR, sebagai berikut:

Tabel 7. Nilai PDCAAS Beberapa Pangan Dibandingkan dengan Nilai PER Relatif dan NPR Relatif

Produk	PDCAAS	PDCAAS	PER	NPR
	pada Tikus	pada Manusia	Relatif	Relatif
(%)				
Kasein + Metionin	100	100	100	100
Kasein	85	100	80	84
Laktalbumin	100	100	89	91
Laktalbumin (dengan perlakuan)	55	67	0	0
Susu Skim	74	100	77	82
Susu Skim (dipanaskan)	29	31	0	5
Isolat protein kedelai	62	100	56	64
Isolat protein kedelai (dengan perlakuan)	44	49	0	0
Bungkil kedelai (mentah)	58	80	27	44
Bungkil kedelai (dipanaskan)	58	83	63	70
kacang hitam (mentah)	45	72	0	0
kacang hitam (dipanaskan)	51	84	63	70

Produk	PDCAAS pada Tikus	PDCAAS pada Manusia	PER Relatif	NPR Relatif
	(%)			
Tepung Mustard	84	92	0	0
Zein (protein jagung)	1	1	0	0
Zein+Lisin+Metionin+Treonin+Tryptofan	63	71	3	44

2.9 The Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS)

Beberapa kegunaan perhitungan menggunakan DIAAS yaitu 1) mengukur mutu protein pangan campuran dalam diet individu; 2) mendokumentasi mutu asam amino pangan tunggal yang dapat digunakan dalam menyusun diet agar mutu proteinnya meningkat (prinsip komplementasi atau saling melengkapi); dan 3) keperluan regulatori untuk memonitor kecukupan protein dari suatu produk pangan.

Digestible indispensable amino acid score (DIAAS) merupakan teknik penilaian mutu protein yang relatif baru. FAO/WHO pada tahun 2013 mengusulkan DIAAS sebagai metode penilaian kualitas protein menggantikan PDCAAS. Hal ini disebabkan oleh penetapan PDCAAS tidak memberikan nilai lebih pada protein dengan kualitas tinggi, kurang mempertimbangkan pada produk yang mengandung zat anti gizi, tidak mempertimbangkan bioavailabilitas asam amino, serta kurang mempertimbangkan pada protein yang daya cernanya rendah namun disuplementasi dengan asam amino pembatasnya. DIAAS didapat dengan membandingkan jumlah asam amino yang dicerna dengan kebutuhan. DIAAS tidak memandang kualitas protein hanya sebatas daya cerna protein saja melainkan ditentukan oleh daya cerna asam amino. Prosedur penetapan DIAAS menurut FAO 2013 sebagai berikut:

- 1) Kadar asam amino ditetapkan dengan AOAC 2005
- 2) Kadar asam amino protein dikalikan dengan koefisien daya cerna asam amino sejati untuk mengestimasi jumlah asam amino yang dicerna (Tabel 8). Metode penetapan daya cerna asam amino sejati juga dapat dilakukan secara langsung dengan merujuk pada bagian prosedur Daya Cerna Protein Sejati.

Tabel 8. Koefisien Daya Cerna Protein Sejati

Asam amino	Koefisien Daya Cerna Sejati
Lisin	0.95
Metionin+sistein	0.94
Treonin	0.90
Triptofan	0.90

- 3) Jumlah asam amino yang dicerna kemudian dibandingkan dengan pola kebutuhan asam amino sesuai kategori umur pada Tabel 2 sebelumnya.
- 4) Skor DIAAS ditetapkan berdasarkan skor terendah.

Rumus untuk menghitung persentase PDCAAS adalah

$$PDCAAS (\%) = \frac{\text{mg asam amino pembatas dalam 1 g protein uji}}{\text{mg asam amino yang sama dalam 1 g protein referensi}} \times 100$$

BAB II

LEMAK

1. Analisis Kuantitatif

1.1 Prinsip Metode

Analisis kadar lemak dalam pangan dapat dilakukan dengan beberapa metode dengan prinsip ekstraksi menggunakan pelarut yang disesuaikan berdasarkan matriks pangan. Beberapa metode yang biasa dilakukan, contohnya metode Soxhlet, Goldfish, Mojonnier, Babcock, Bligh and Dyer, Folch, Gerber, dan sebagainya. Metode yang paling umum dilakukan untuk pangan dalam bentuk padatan adalah metode Soxhlet. Metode ini dilakukan dengan cara melarutkan lemak dalam sampel menggunakan pelarut organik dalam kondisi panas. Setelah pelarut diuapkan, maka lemak yang tersisa ditentukan dengan prinsip gravimetri. Sedangkan untuk pangan cair contohnya produk susu, metode yang biasa digunakan adalah metode Gerber.

2. Evaluasi Mutu

2.1 Bilangan Iod

Salah satu faktor yang menentukan mutu lemak adalah ketidakjenuhan. Ketidakjenuhan dapat ditentukan dengan mengukur bilangan iod (*Iodine Value*). Bilangan iod adalah jumlah (gram) iod yang dapat diikat oleh 100 g lemak. Parameter ini sangat penting di industri minyak sawit dan dapat digunakan sebagai panduan pada proses pengolahan minyak sawit. Bilangan iod (IV) ditentukan dengan metode titrasi menggunakan pelarut. Beberapa metode penentuan IV adalah Wijs, Hanus, Hubl, Hoffman, Green, dan Rosenmund-Kuhnenn. Secara instrumental, IV ditentukan

menggunakan kalorimetri pemindaian diferensial (*differential scanning calorimetry*), resonansi magnetik inti proton (*H-nuclear magnetic resonance*), spektroskopi inframerah dekat (*near infrared spectroscopy*), dan inframerah transformasi fourier (*fourier transform infra red*). Meskipun banyak metode yang telah dikembangkan, Wijs merupakan metode standar dan sangat luas digunakan.

Prinsip metode Wijs adalah penambahan larutan iodin monoklorida dalam campuran asam asetat dan karbon tetraklorida ke dalam sejumlah sampel yang akan diuji. Setelah waktu standar untuk reaksi, penentuan dari halogen yang berlebih dengan penambahan larutan kalium iodida dan iodin yang dibebaskan, selanjutnya dititrasi dengan larutan natrium tiosulfat yang telah distandardisasi. Larutan wijs terdiri dari larutan 16 g iod monoklorida dalam 1000 mL asam asetat glasial yang harus disimpan di tempat yang gelap, sejuk, dan tertutup rapat karena larutan bersifat sangat peka terhadap cahaya. Sedangkan pada metode Hanus menggunakan iodin dalam asetat glasial, namun mengandung iodium bromide (IBr) sebagai pemacu reaksi. Larutan tersebut kemudian dititrasi dengan larutan natrium tiosulfat. Titik akhir titrasi ditandai dengan hilangnya warna biru dari amilum.

2.2 Bilangan Peroksida

Bilangan peroksida adalah salah satu parameter terpenting untuk menentukan derajat kerusakan pada minyak atau lemak akibat proses oksidasi. Hal ini dikarenakan minyak atau lemak adalah ester dari asam-asam lemak dan gliserol. Ikatan rangkap diantara asam lemak yang membentuk ester pada minyak akan menghasilkan minyak tidak jenuh sehingga mudah mengalami kerusakan dengan adanya oksidasi. Proses oksidasi yang dimaksud adalah ketika asam lemak tidak jenuh mengikat oksigen pada ikatan rangkapnya dan membentuk hidroperoksida atau yang dikenal sebagai

peroksida. Pemecahan senyawa peroksida selanjutnya akan membentuk aldehida, keton, dan asam-asam lemak bebas yang diidentifikasi sebagai aroma tidak sedap dari minyak yang digunakan dalam penggorengan berulang. Oleh karena itu, tingkat kerusakan minyak dapat diukur dengan menentukan jumlah senyawa peroksida yang terbentuk dalam minyak.

Penetapan kadar peroksida ditentukan melalui metode titrasi iodometri menggunakan larutan natrium thiosulfat 0,01 N dengan indikator amilum dimana untuk tiap sampel dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Sejumlah sampel dilarutkan dalam campuran asam asetat – kloroform (3:2) yang mengandung KI maka akan terjadi pelepasan iodium (I_2). Iod yang bebas dititrasi dengan natrium thiosulfat menggunakan indikator amilum sampai warna biru hilang. Oleh karena, peroksida pada minyak tidak stabil dan akan segera membentuk senyawa aldehid atau keton maka perlu dilakukan titrasi blangko. Titrasi blangko ini bertujuan untuk kalibrasi dengan mengurangi kesalahan yang disebabkan oleh pereaksi, pelarut, atau kondisi percobaan.

2.3 Penentuan Asam Thiobarbiturat (TBA)

Uji asam Thiobarbiturat (TBA) ini dipakai untuk menentukan adanya ketengikan. Uji ini berdasarkan atas terbentuknya pigmen berwarna merah sebagai hasil dari reaksi kondensasi antara 2 molekul TBA dengan 1 molekul malonat dialdehida. Persenyawaan malonaldehida secara teoritis dapat dihasilkan oleh pembentukan diperoksida pada gugus pentadiena yang disusul dengan pemutusan rantai molekul atau dengan cara oksidase lebih lanjut dari 2-enol yang dihasilkan dari penguraian monohidro peroksida.

Lemak yang tengik mengandung aldehid dan sebagian besar adalah malonaldehid. Malonaldehid sendiri merupakan produk akhir dari peroksidasi lemak, sebagai proses degradasi asam lemak tidak

jenuh ganda (asam arakhidonat). Uji TBA ini merupakan uji yang spesifik untuk hasil oksidasi asam lemak tidak jenuh (PUFA) dan baik diterapkan untuk uji terhadap lemak pangan yang mengandung asam lemak dengan derajat ketidakjenuhan lebih tinggi. Hal tersebut terjadi pada kasus bahan yang mengandung asam lemak dengan derajat ketidakjenuhan yang lebih tinggi dari asam linoleat yang dapat mempengaruhi stabilitas aroma.

Jumlah malonaldehid dapat ditentukan dengan cara didestilasi terlebih dahulu. Malonaldehid kemudian direaksikan dengan thiobarbiturat sehingga terbentuk kompleks berwarna merah. Intensitas warna merah sesuai dengan jumlah malonaldehid dan absorbansi dapat ditentukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 528 nm. Angka TBA dinyatakan dengan mg malonaldehid/kg minyak. Semakin besar angka TBA maka minyak semakin tengik.

2.4 Bilangan Asam dan Asam Lemak Bebas (FFA)

Bilangan asam adalah ukuran dari jumlah asam lemak bebas, serta dihitung berdasarkan berat molekul dari asam lemak atau campuran asam lemak. Bilangan asam dinyatakan sebagai jumlah mg KOH yang digunakan untuk menetralkan asam lemak bebas yang terdapat dalam 1 g minyak atau lemak. Bilangan asam yang besar menunjukkan asam lemak bebas yang besar pula, yang berasal dari hidrolisa minyak atau lemak, ataupun karena proses pengolahan yang kurang baik. Semakin tinggi bilangan asam, maka semakin rendah kualitasnya.

Asam lemak bebas adalah asam lemak yang berada sebagai asam bebas tidak terikat sebagai trigliserida. Asam lemak bebas dihasilkan oleh proses hidrolisis dan oksidasi biasanya bergabung dengan lemak netral. Reaksi ini akan dipercepat dengan adanya faktor-faktor panas, air, keasaman, dan katalis (enzim). Semakin

lama reaksi ini berlangsung, maka semakin banyak kadar asam lemak bebas yang terbentuk.

Penentuan bilangan asam dipergunakan untuk mengukur jumlah asam lemak bebas yang terdapat dalam minyak atau lemak. Besarnya bilangan asam tergantung dari kemurnian dan umur dari minyak atau lemak tersebut.

Rumus angka asam

$$\text{Angka Asam} = \frac{\text{ml KOH} \times \text{N KOH} \times \text{BM KOH}}{\text{bobot contoh (gram)}}$$

Kadang-kadang juga dinyatakan derajat asam yaitu banyaknya mL KOH 0,1 N yang diperlukan untuk menetralkan 100 g minyak atau lemak, dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Derajat asam} = \frac{100 \times \text{ml KOH} \times \text{N.KOH}}{\text{bobot contoh (gram)}}$$

Selain itu, sering dinyatakan sebagai kadar asam lemak bebas (%FFA), dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{kadar asam lemak bebas (\%FFA)} = \frac{\text{ml KOH} \times \text{N KOH} \times \text{BM} \times 100\%}{\text{bobot contoh (gram)} \times 1000}$$

Asam lemak bebas ditentukan sebagai kandungan asam lemak yang terdapat paling banyak dalam minyak tertentu. Sehingga asam lemak bebas digunakan sebagai tolak ukur jenis minyak tertentu, seperti pada tabel 9 berikut:

Tabel 9. Tolak Ukur Jenis Minyak berdasarkan Asam Lemak Bebas

Sumber minyak	Asam lemak terbanyak	Berat Molekul
Sawit	Palmitat	256
Inti sawit	Laurat	200
Susu	Oleat	282
Jagung, Kedele	Linoleat	278

Hubungan kadar asam lemak (%FFA) dengan angka asam sebagai berikut:

$$\text{Angka Asam} = \frac{BM\ KOH}{BM\ asam\ lemak\ bebas/10} \times \%FFA$$

Keterangan:

Angka asam = faktor konversi x %FFA

Faktor konversi untuk Oleat = 1,99

Faktor konversi untuk Palmitat = 2,19

Faktor konversi untuk Laurat = 2,80

Faktor konversi untuk Linoleat = 2,01

2.5 Profil Asam Lemak

Proses pengujian profil asam lemak dengan menggunakan kromatografi gas. Sampel yang akan di uji di ekstraksi terlebih dahulu menggunakan pelarut petroleum eter. Hasil ekstraksi di bagi menjadi 2, yaitu satu bagian dilakukan transesterifikasi dengan BF₃/metanolat dan bagian yang lain di hidrolisis menggunakan basa NaOH. Asam lemak hasil transesterifikasi diidentifikasi menggunakan GC-MS.

Metil ester asam lemak hasil transesterifikasi dipisahkan menjadi fraksi-fraksinya dengan metode distilasi fraksinasi sehingga didapatkan isolat murni dari asam lemak omega (3, 6, dan 9). Isolat murni tersebut diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi gas. Komponen-komponen asam lemak hasil transesterifikasi dipisahkan dengan kromatografi kolom. Pelarut yang digunakan dalam kolom ditentukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fraksi-fraksi yang dihasilkan dari kromatografi kolom diidentifikasi dengan gas kromatografi.

Asam lemak adalah asam monokarboksilat berantai lurus yang terdapat di alam sebagai ester di dalam molekul lemak atau trigliserida. Asam lemak pembentuk lemak dapat dibedakan berdasarkan jumlah atom C (karbon), ada atau tidaknya ikatan rangkap, jumlah ikatan rangkap serta letak ikatan rangkap. Profil asam lemak dikategorikan berdasarkan 3 kelompok, sebagai berikut:

a) Berdasarkan Panjang Rantai

- 1) Asam lemak rantai pendek adalah asam lemak dengan ekor alifatik yang memiliki jumlah karbon lima atau kurang (misalnya, asam butirat).
- 2) Asam lemak rantai sedang adalah asam lemak dengan ekor alifatik yang memiliki jumlah karbon 6 sampai 12, yang bisa membentuk trigliserida rantai sedang.
- 3) Asam lemak rantai panjang adalah asam lemak dengan ekor alifatik yang memiliki jumlah karbon 13 sampai 20 karbon.
- 4) Asam lemak rantai sangat panjang adalah asam lemak dengan ekor alifatik yang memiliki jumlah karbon sama dengan 22 karbon atau lebih.

Tabel 10. Nama Sistematis dan Nama Umum berdasarkan Panjang Rantai

Rantai	Nama Sistematis	Nama Umum
4	Butanoat (butanoic)	Butirat (Butyric)
6	Heksanoat (hexanoic)	Kaproat (Caproic)
8	Oktanoat (octanoic)	Kaprilat (Caprylic)
10	Dekanoat (decanoic)	Kaprat (Capric)
12	Dodekanoat (dodecanoic)	Laurat (Lauric)
14	Tetradekanoat (tetradecanoic)	Miristat (Myristic)
16	Heksadecanoat (hexadecanoic)	Palmitat (Palmitic)

Rantai	Nama Sistematis	Nama Umum
18	Oktadekanoat (octadecanoic)	Stearat (Stearic)
20	Eicosanoat (eicosanoic)	Arakhidat (Arachidic)
22	Docosanoat (docosanoic)	Behenat (Behenic)
24	Tetracosanoat (tetracosanoic)	Lignoserat (Lignoceric)

b) Berdasarkan Tingkat Kejenuhan

Berdasarkan struktur kimianya, asam lemak dibedakan menjadi asam lemak jenuh yaitu asam lemak yang tidak memiliki ikatan rangkap. Sedangkan asam lemak yang memiliki ikatan rangkap disebut sebagai asam lemak tidak jenuh, dibedakan menjadi asam lemak tidak jenuh tunggal (MUFA) memiliki 1 (satu) ikatan rangkap, dan asam lemak tidak jenuh ganda (PUFA) dengan 1 atau lebih ikatan rangkap.

Asam lemak esensial merupakan sebutan bagi asam lemak yang tidak dapat dibuat sendiri oleh suatu spesies hewan (termasuk manusia), atau dapat dibuat tetapi tidak mencukupi kebutuhan minimal yang diperlukan untuk memenuhi fungsi fisiologinya. Hal ini terjadi karena spesies yang bersangkutan tidak memiliki atau memiliki tetapi kurang fungsional, enzim yang bertanggung jawab dalam melakukan sintesis asam lemak tersebut. Asam lemak esensial sebenarnya terdiri dari asam linoleat (AL), asam linonenat (ALN), serta asam arakidonat (AA). Asam lemak ini tidak dapat dibuat oleh tubuh baik dari asam lemak lain maupun dari karbohidrat ataupun asam amino.

Asam lemak omega-3 adalah asam lemak tidak jenuh ganda yang mempunyai ikatan rangkap banyak, ikatan rangkap pertama terletak pada atom karbon ketiga dari gugus metil omega, ikatan rangkap berikutnya terletak pada nomor atom karbon ke-3 dari ikatan rangkap sebelumnya. Gugus metil omega adalah gugus terakhir dari rantai asam lemak. Asam lemak omega-3 ini turunan dari prekursoranya, yaitu asam lemak esensial linoleat dan linolenat. Asam lemak esensial tidak bisa dibentuk dalam tubuh dan harus dipasok langsung dari makanan. Kemudian prekursor itu masuk dalam proses elongasi dan desaturasi yang menghasilkan tiga bentuk asam lemak omega-3 sebagai berikut: ALA (asam alfa-linolenat (C18:3, n-3)), EPA (eikosapentaenoat (C20:5, n-3)), serta DHA (dokosaheksaenoat (C22:6, n-3). Induk dari asam lemak omega-3 adalah asam alfa-linolenat (ALA). ALA dengan bantuan enzim delta-6-desaturase dapat berubah menjadi asam stearidonat kemudian oleh enzim delta-5-desaturase dikonversi tubuh menjadi asam eikosapentaenoat (EPA) dan oleh enzim delta-4-desaturase diubah menjadi asam dokosaheksaenoat (DHA). DHA (asam dokosaheksaenoat) atau yang di kenal sebagai omega-3. Proses pembuatan DHA maupun AA difasilitasi oleh enzim desaturase dan elongase. Omega 3 terbanyak pada ikan adalah EPA dan DHA yang dapat menyembuhkan penyakit arterosklerosis (penyempitan dan pengerasan pembuluh darah), trombosis dan penyakit tulang atau persendian, asma dan mencegah proses penuaan.

Asam lemak omega-6 adalah asam lemak tidak jenuh ganda yang memiliki ikatan ganda pertamanya pada posisi ke-6. Sifat fisik dan kimia, metabolisme, pencernaan, penyerapan, serta sekresi sama dengan lemak. Asam arakidonat adalah salah satu jenis dari asam lemak omega-6, selain itu ada juga

asam linolenat. Sumber makanan asam lemak omega-6 terdapat pada daging, unggas, telur, alpukat, sereal, gandum, margarin, minyak nabati, minyak biji rami, minyak kedelai, minyak biji kapas, minyak bunga matahari, minyak jagung, biji labu, biji bunga matahari, biji kenari, kacang mete, kadang kedelai, dan kacang-kacangan lain.

Asam lemak omega-9 adalah keluarga asam lemak tidak jenuh yang memiliki kesamaan ikatan karbon-karbon rangkap pada posisi ke-9 yaitu, ikatan ke-9 dari ujung metil asam lemak. Asam lemak ini merupakan jenis MUFA yang memiliki daya perlindungan untuk menurunkan LDL kolesterol darah, meningkatkan HDL kolesterol yang lebih besar dibanding omega-3 dan omega-6, serta lebih stabil dibanding PUFA. Asam lemak omega-9 dapat mencegah penyakit jantung koroner (teruji secara laboratoris dan epidemilogis), dimana penelitian yang dilakukan selalu menggunakan minyak dengan kadar asam lemak jenuh yang rendah (sekitar 5%). Dua asam lemak omega-9 penting dalam industri yaitu asam oleat (18: 1, n - 9), yang merupakan komponen utama dari minyak zaitun, minyak macadamia dan lemak tidak jenuh tunggal lainnya; dan Asam erucic (22: 1, n - 9), yang ditemukan dalam lobak, biji bunga dinding, dan biji sesawi.

Tabel 11. Penamaan Omega berdasarkan Nama Umum, Struktur, dan Ikatan Rangkap

Nama umum	Struktur	Ikatan rangkap	Penamaan Omega
Linoleat	18:2 (n-6)	9, 12	Omega-6
Y-Linolenat	18:3 (n-6)	6, 9, 12	Omega-6
α-Linolenat	18:3 (n-3)	9, 12, 15	Omega-3

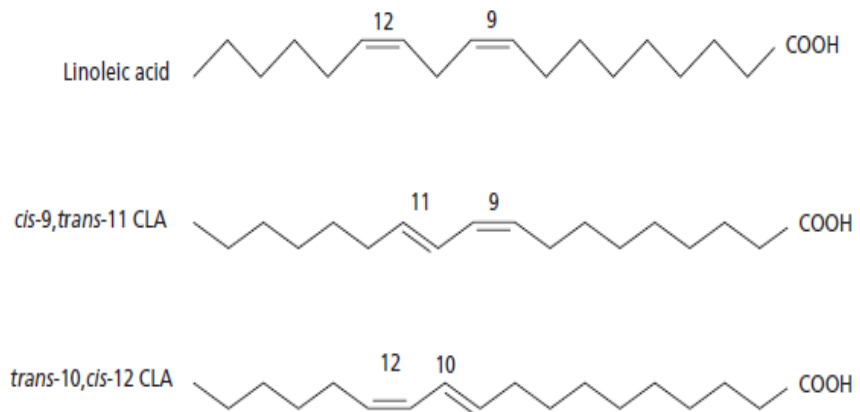
Nama umum	Struktur	Ikatan rangkap	Penamaan Omega
Stearidonat	18:4 (n-3)	6, 9, 12, 15	Omega-3
Arachidonat	20:4 (n-6)	5, 8, 11, 14	Omega-6
Eicosapentaenoat	20:5 (n-3)	5, 8, 11, 14, 17	Omega-3
Docosapentaenoat	22:5 (n-3)	7, 10, 13, 16, 19	Omega-3
Docosahexaenoat	22:6 (n-3)	4, 7, 10, 13, 16, 19	Omega-3
Asam Oleat	18:1 (n-9)	9	Omega-9
Asam Elaidat	18:1 (n-9)	9	Omega-9
Asam Gondoat	20:1 (n-9)	11	Omega-9
Asam Mead	20:3 (n-9)	5, 8, 11	Omega-9
Asam Nervonat	24:1 (n-9)	13	Omega-9

c) Kandungan asam lemak *trans* (TFA)

Lemak *trans* adalah salah satu jenis lemak tidak jenuh yang umum ditemukan secara alami maupun buatan. Ikatan rangkap dapat berupa ikatan *cis* maupun *trans*. Dalam produksi makanan, lemak *cis* tidak jenuh merupakan input dari proses hidrogenasi untuk memproduksi lemak jenuh seluruhnya atau parsial yang mampu meleleh pada temperatur yang diinginkan. Lemak *trans* adalah zat pengotor yang muncul dari isomerisasi pada hidrogenasi parsial. *Cis* dan *trans* adalah istilah yang mengacu pada susunan dua kelompok substituen antara kedua ikatan. Pada susunan *cis*, kelompok substituen antara kedua ikatan pada sisi yang sama berikatan rangkap dua. Pada susunan *trans* kelompok substituen antara kedua ikatan pada sisi yang berlawanan berikatan rangkap dua.

Hasil hidrolisis trigliserida akan menghasilkan asam lemak jenuh dan tidak jenuh berdasarkan ada tidaknya ikatan rangkap rantai karbon di dalam molekulnya. Asam lemak tidak jenuh yang

terdapat di dalam minyak dapat berada dalam dua bentuk yaitu isomer *cis* dan *trans*. Asam lemak tidak jenuh alami biasanya berada sebagai asam lemak *cis*, hanya sedikit bentuk *trans*. Jumlah asam lemak *trans* (*trans fatty acid* – TFA) dapat meningkat di dalam pangan berlemak terutama margarin akibat dari proses pengolahan yang diterapkan seperti hidrogenasi. Selain proses hidrogenasi, TFA juga terbentuk selama pengolahan minyak dan menggoreng. Menggoreng adalah proses pemasakan dengan cara merendam pangan ke dalam minyak goreng pada suhu 163-196°C. Proses penggorengan pada suhu tinggi (200-250°C) merusak ikatan rangkap pada asam lemak tidak jenuh sehingga hanya tinggal asam lemak jenuh saja. Hal tersebut berisiko membuat kolesterol darah semakin tinggi. Meskipun lemak *trans* dapat dikonsumsi, tetapi konsumsi yang berlebihan akan meningkatkan resiko penyakit jantung koroner. Sehingga direkomendasikan konsumsi lemak *trans* untuk dikurangi. Lemak *trans* paling banyak terdapat pada produk kue olahan.



BAB III

KARBOHIDRAT

1. Analisis Kuantitatif

1.1 Metode Analisis Total Karbohidrat *By Difference*

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk menentukan jumlah karbohidrat dalam suatu bahan secara kimiawi, fisik, serta biokimiawi menggunakan enzim. Analisis kimia kandungan karbohidrat dalam pangan pada umumnya dilakukan untuk menentukan komposisinya. Analisis fisik karbohidrat biasanya digunakan untuk menentukan karakteristik fisik karbohidrat seperti kekentalan, stabilitas, tekstur, daya lengketnya, dan sebagainya. Sedangkan analisis biokimiawi karbohidrat banyak dilakukan misalnya untuk menentukan kemampuan karbohidrat untuk dapat dicerna dalam saluran pencernaan.

Prinsip penentuan total karbohidrat menggunakan metode *by difference* dilakukan dengan cara perhitungan yang didahului dengan penentuan kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak. Metode ini adalah metode yang paling mudah karena merupakan perhitungan kasar (analisis proksimat), dimana karbohidrat tidak ditentukan berdasarkan analisis, namun secara perhitungan. Adapun perhitungannya dapat dilakukan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Kadar Total Karbohidrat (\%)} = 100\% - (\% \text{ kadar air} + \% \text{ kadar abu} + \% \text{ kadar protein} + \% \text{ kadar lemak})$$

1.2 Metode Analisis Karbohidrat Tersedia *By Difference*

Pada prinsipnya penentuan karbohidrat tersedia (*available carbohydrate*) dapat dilakukan menggunakan metode *by difference* dengan cara perhitungan yang didahului dengan penentuan kadar

air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak dan kadar serat kasar. Adapun perhitungannya dapat dilakukan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Kadar Karbohidrat Tersedia (\%)} = \\ 100\% - (\% \text{ kadar air} + \% \text{ kadar abu} + \% \text{ kadar protein} \\ + \% \text{ kadar lemak} + \% \text{ kadar serat kasar}) \end{aligned}$$

2. Evaluasi Mutu

Karbohidrat atau Hidrat Arang adalah suatu zat gizi yang fungsi utamanya sebagai penghasil energi, dimana setiap gramnya menghasilkan 4 kalori. Karbohidrat dapat dilihat dari sisi sifat terhadap kandungan gula darah (indeks glikemik) dan fungsi sebagai serat pangan.

2.1 Indeks Glikemik (IG) dan Beban Glikemik (BG)

Indeks Glikemik (IG) adalah nilai yang mencerminkan laju peningkatan kadar glukosa darah setelah mengonsumsi pangan yang mengandung karbohidrat, semakin tinggi IG maka semakin tinggi kadar glukosa darah setelah pangan dikonsumsi, kenaikan kadar glukosa darah tidak semata ditentukan oleh IG tetapi juga oleh jumlah karbohidrat yang dikonsumsi (beban glikemik/*glycemic load*). Prinsip pengukuran indeks glikemik adalah dengan cara membandingkan luas daerah di bawah kurva antara pangan yang diukur indeks glikemiknya dengan glukosa murni, dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Indeks Glikemik} = \frac{\text{Luas area di bawah kurva respon glukosa darah setelah mendapat pangan yang diukur IG}}{\text{Luas area di bawah kurva respon glukosa darah setelah mendapat pangan yang diukur glukosa murni}}$$

Indeks glikemik pangan dipengaruhi oleh proses pengolahan, kadar gula, kadar amilosa dan amilopektin, kadar lemak dan protein pangan, kadar anti gizi pangan serta kadar serat pangan.

Beban glikemik (BG) untuk menilai dampak konsumsi karbohidrat dengan memperhitungkan IG pangan. BG didefinisikan sebagai IG pangan yang dikalikan dengan kandungan karbohidrat dari pangan. BG dapat mencerminkan kualitas dan kuantitas karbohidrat serta interaksinya dalam bahan pangan. BG lebih mencerminkan ukuran saji, sehingga lebih realistis dibandingkan dengan IG.

Tabel 12. Indeks Glikemik Pangan

No	Jenis Pangan	Indeks Glikemik ¹	Takaran Saji	Kadar Karbohidrat (gram) per Saji
1.	Jagung manis (Kanada)	48-70	150 g	33
2.	Beras putih, didihkan (India)	69	150 g	43
3.	Jagung	59	-	-
4.	Beras Basmati putih, didihkan	58	150 g	38
5.	<i>Parboiled rice</i> , amilosa 12% (Bangladesh, var BR2)	51	150 g	38
6.	Ketan amilosa, 0-2% (Australia)	88	150 g	43
7.	Beras Bangladesh, amilosa 28%	37	150 g	39
8.	Beras putih instan, ditanak 1 menit (Kanada)	46	150 g	42
9.	Beras putih instan, ditanak 6 menit (Australia)	87	150 g	42

No	Jenis Pangan	Indeks Glikemik ¹	Takaran Saji	Kadar Karbohidrat (gram) per Saji
10.	Terigu biji utuh (Kanada)	42	50 g	33
11.	Roti terigu	56	30 g	20
12.	Ubi kayu rebus	29-45	150 g	36
13.	Kentang panggang	73-97	150 g	30
14.	Ubi jalar	54-68	150 g	28
15.	<i>Barley</i>	24-26	150 g	42
16.	<i>Millet</i> (didihkan)	61-81	150 g	36
17.	<i>Millet</i> (bubur tepung)	107	-	-
18.	Beras Yasmin, dimasak dengan <i>rice cooker</i> (Golden Food, Thailand)	99-119	150 g	42
19.	Roti tepung beras (amilosa rendah, <i>Calrose rice</i>)	63-81	30 g	12
20.	<i>Corn meal</i> (didihkan dengan air)	68	150 g	13
21.	Roti <i>Oat bran</i> (Australia)	44	30 g	18
22.	Talas	54-56	150 g	8
23.	Yam	29-45	150 g	36
24.	Tapioka	60-80	250 g	18
25.	Mi instan	6-48	180 g	40
26.	Makaroni (didihkan 5 menit)	45	180 g	49
27.	Spageti (didihkan 5 menit)	32	180 g	48
Kacang-Kacangan				
28.	Kedelai	42	50 g	33

No	Jenis Pangan	Indeks Glikemik ¹	Takaran Saji	Kadar Karbohidrat (gram) per Saji
29.	Kacang hijau	56	30 g	20
30.	Kacang tanah	29-45	150 g	36
31.	Kacang merah	73-97	150 g	30
32.	Kacang buncis, didihkan 8 menit	24-32	150 g	25
Buah-Buahan				
33.	Apel	40	120 g	15
34.	Nanas	51-67	120 g	16
35.	Semangka	59-85	120 g	6
36.	Pepaya	58-60	120 g	17
37.	Pir	36-40	120 g	11
38.	Strawberry (Australia)	33-47	120 g	3
39.	Pisang	65-75	120 g	23
40.	Aprikot (Italia)	57	120 g	9
Gula				
41.	Fruktosa	17-24	10 g	10
42.	Glukosa	96-102	10 g	18
43.	Madu	50-60	25 g	10
44.	Laktosa	44-48	10 g	10
45.	Maltosa	93-117	10 g	10
46.	Sukrosa	63-73	10 g	10
Minuman, Jus				
47.	Cola-cola, minuman berkarbonasi (Australia)	46-60	250 mL	26
48.	Fanta, minuman berkarbonasi (Australia)	62-74	250 mL	34

No	Jenis Pangan	Indeks Glikemik ¹	Takaran Saji	Kadar Karbohidrat (gram) per Saji
49.	Yakult	40-52	65 mL	12
50.	Lucozade (sparkling glucose drink, UK)	85-105	250 mL	42
51.	Jus wortel, segar	35-51	250 mL	23
52.	Jus nanas	46	250 mL	34
53.	Jus tomat	34-42	250 mL	9
54.	Jus anggur	48	250 mL	31
55.	Susu, full fat	23-31	250 mL	12
56.	Susu skim (Kanada)	27-37	250 mL	13
57.	Susu kental manis (Australia)	55-67	250 mL	136
58.	Susu sapi fermentasi (Swedia)	11	250 mL	

¹ Pangan acuan: Glukosa (IG=100)

2.2 Serat Kasar

Dalam pangan, serat merupakan senyawa non gizi yang terdiri dari dua jenis yaitu serat pangan (*dietry fiber*) dan serat kasar (*crude fiber*). Serat memang bukan senyawa gizi, namun perannya sangat diperlukan dalam mendukung proses metabolisme di dalam tubuh karena kemampuannya dalam mengikat air, selulosa dan pektin. Serat akan membantu mempersingkat waktu transit sisa metabolisme pangan melalui saluran pencernaan untuk disekresikan keluar dalam bentuk feses. Tanpa bantuan serat yang mempunyai kemampuan mengikat air, feses akan relatif keras dan lebih lama melintasi usus untuk dapat diekskresikan keluar. Selain itu,

kekurangan serat juga dapat mengakibatkan lambannya gerakan-gerakan peristaltik usus besar.

Serat pangan (*dietary fiber*) dibedakan dengan istilah serat kasar (*crude fiber*). Serat kasar adalah bagian dari pangan yang tidak dapat dihidrolisis oleh asam atau basa kuat, bahan-bahan kimia yang digunakan untuk menentukan kadar serat kasar yaitu asam sulfat (H_2SO_4 1,25%) dan natrium hidroksida (NaOH 3,25%) dan bersifat tidak larut dalam air. Sedangkan serat pangan adalah bagian dari pangan yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim-enzim pencernaan. Serat pangan adalah serat yang tetap ada dalam kolon atau usus besar setelah proses pencernaan, baik yang bersifat larut maupun yang tidak larut dalam air.

Serat kasar merupakan komponen yang sangat penting dalam penilaian kualitas pangan karena akan menentukan nilai gizinya. Selain itu, kandungan serat kasar dapat digunakan untuk mengevaluasi suatu proses pengolahan, misalnya dalam proses penggilingan atau proses pemisahan antara kulit dan kotiledon dalam biji-bijian, persentase serat dapat dipakai untuk menentukan tingkat kemurniaan bahan atau efisiensi suatu proses.

Serat kasar merupakan residu dari pangan setelah diperlakukan dengan asam dan alkali kuat encer dan mendidih, sehingga komponen karbohidrat, protein, dan zat-zat lain akan terhidrolisis dan larut. Setelah disaring dan dicuci dengan air panas yang mengandung asam dan alkohol, residu yang berupa serat kasar dapat dikeringkan dan ditimbang hingga bobot konstan.

2.3 Analisis Kadar Amilosa

- 1) Pembuatan Kurva Standar Larutan Amilosa
 - a. Sebanyak 40 mg amilosa murni dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Ke dalam labu tersebut kemudian ditambahkan 1 mL etanol 95 % dan 9 mL larutan NaOH 1 N.

Labu takar kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 95 °C selama 10 menit. Setelah didinginkan, larutan amilosa yang terbentuk ditambah dengan air destilata sampai tanda tera. Larutan amilosa ini digunakan sebagai larutan stok amilosa standar. Dari larutan stok amilosa standar tersebut dipipet 1, 2, 3, 4, dan 5 mL untuk dipindahkan masing-masing ke dalam labu takar 100 mL.

- b. Masing-masing labu takar tersebut kemudian ditambahkan 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mL larutan asam asetat 1 N. Sebanyak 2,0 mL larutan iod (0,2 g I₂ dan 2 g KI yang dilarutkan dalam 100 mL air destilata) dipipet ke dalam setiap labu, lalu ditambahkan air destilata hingga tanda tera. Larutan dibiarkan selama 20 menit dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Persamaan dan kurva standar dibuat sebagai hubungan antara kadar amilosa (sumbu x) dan absorbansi (sumbu y).

2) Analisis Kadar Amilosa

- a. Sebanyak 100 mg tepung sampel dimasukkan dalam labu takar 100 mL, lalu ditambahkan 1 mL etanol 95% dan 9 mL larutan NaOH 1 N. Selanjutnya, labu takar tersebut dipanaskan dalam penangas air pada suhu 95°C selama 10 menit. Setelah didinginkan, larutan tepung sampel ditambahkan air destilata sampai tanda tera dan dihomogenkan. Dari labu takar ini dipipet 5 mL larutan tepung sampel dan dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL, kemudian ditambahkan 1 mL larutan asam asetat 1 N dan 2 mL larutan iod dan ditambah air destilata hingga tanda tera. Larutan sampel diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang sebelum dianalisis absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Kadar amilosa (dalam %)

ditentukan dengan menggunakan persamaan kurva standar larutan amilosa.

b. Perhitungan Kadar Amilosa

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

Keterangan:

C = Konsentrasi amilosa (mg/mL)

V = Volume akhir sampel (mL)

FP = Faktor pengencer

W = Berat sampel (mg)

2.4 Penetapan Serat Pangan

Serat pangan didefinisikan sebagai bagian dari komponen pangan nabati yang tidak dapat dicerna oleh saluran pencernaan manusia. Definisi ini diperluas lagi sehingga seluruh polisakarida dan lignin yang tidak dapat dicerna oleh saluran pencernaan manusia termasuk ke dalam serat pangan. Didasarkan atas fungsinya di dalam tanaman, serat pangan dibagi menjadi tiga fraksi utama, yaitu (a) Polisakarida struktural, terdapat dalam dinding sel dan terdiri dari selulosa dan polisakarida non-selulosa (hemiselulosa dan substansi pektat); (b) Non-polisakarida struktural, sebagian besar terdiri dari lignin; dan (c) Polisakarida non struktural, termasuk gum dan *mucilage* serta polisakarida lainnya seperti karagenan dan agar dari alga dan rumput laut.

Berbagai metode telah dikembangkan untuk menganalisis serat pangan, akan tetapi metode Van Soest dan berbagai modifikasinya masih banyak digunakan orang karena lebih mudah dan relatif lebih cepat. Dengan menggunakan metode ini dapat ditentukan kadar serat detergen asam (SDA) dan serat detergen netral (SDN). SDA sebagian besar terdiri dari selulosa dan lignin dan sebagian kecil hemiselulosa dan substansi pektat, oleh karena itu SDA dianggap

hanya terdiri dari selulosa dan lignin. SDN terdiri dari selulosa hemiselulosa dan lignin.

Penetapan kadar komponen serat pangan lainnya dapat ditentukan dengan metode lain. Penetapan lignin umumnya ditentukan dengan metode Klason, sedangkan substansi pektat dengan metode spektrofotometri. Dengan menggunakan metode-metode di atas maka hampir seluruh komponen serat pangan masing-masing dapat ditentukan. Kadar hemiselulosa diperoleh dengan menghitung selisih kadar SDN dengan kadar SDA. Kadar selulosa diperoleh dengan menghitung selisih kadar SDA dan kadar lignin. Sedangkan serat pangan total dihitung dengan menjumlahkan kadar SDN dengan kadar substansi pektat.

2.4.1 Penetapan Serat Detergen Asam (SDA)

Sampel diekstrak dengan larutan SDA (setiltrimetilamonium bromida dalam H_2SO_4 1 N) sehingga seluruh komponen selain komponen SDA larut. Komponen yang tidak larut kemudian disaring, dikeringkan, ditimbang, dan dikoreksi dengan kandungan mineral yang ada dalam komponen tersebut dengan cara menyabunkanya sehingga yang tertinggal hanya mineralnya saja.

2.4.2 Penetapan Serat Detergen Netral (SDN)

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

2.4.3 Penetapan Lignin

Sampel di ekstrak terlebih dahulu dengan larutan SDA sehingga seluruh komponen selain selulosa dan lignin larut. Selulosa yang ada dalam residu kemudian dihidrolisa dengan menggunakan H_2SO_4 72% sehingga yang tertinggal dalam residu hanya lignin.

2.4.4 Penetapan Substansi Pektat

1) Metode Kolorimetrik

Penetapan kadar substansi pektat ditentukan berdasarkan metode kolorimetrik McCready dan McComb (1952) yang telah dimodifikasi oleh Blumenkrantz dan Arboc-Hansen (1973). Penetapan ini didasarkan atas reaksi antara 0-hidroksi difenil dengan anhidrogalakuronat yang menghasilkan warna yang dapat diukur pada panjang gelombang 520 nm.

2) Metode Gravimetrik

Pektin yang telah diekstrak dari bahan nabati disaponifikasi dengan alkali dan diendapkan sebagai kalsium pektat dengan penambahan kalsium khlorida dan suasana asam. Endapan kalsium pektat dicuci sampai bebas klorida, dikeringkan kemudian ditimbang.

2.5 Analisis Serat Pangan Larut dan Tidak Larut

Serat pangan merupakan bagian dari pangan nabati yang sebagian besar dalam melintasi saluran usus tanpa dipecah atau dicerna. Terdapat dua jenis serat pangan, yaitu serat pangan larut dan tidak larut. Serat pangan termasuk pektin dan gum, sedangkan serat pangan yang tidak larut meliputi selulosa dan hemiselulosa. Sebagian besar tanaman mengandung, baik serat larut maupun

tidak larut dalam jumlah yang bervariasi. Serat pangan merupakan komponen penting dalam diet sehat dan berperan penting dalam sistem metabolisme tubuh.

Serat larut akan membentuk gel yang dapat meningkatkan daya cerna melalui beberapa cara. Serat larut dapat mengurangi kadar kolesterol dan gula darah. Serat larut dapat membantu mengontrol glukosa darah, sehingga dapat mengurangi risiko diabetes. Serat yang tidak larut akan mengikat air sehingga akan meningkatkan volume dan melunakkan feses, sehingga lebih mudah untuk disekresikan. Serat tidak larut dapat membantu meningkatkan kesehatan dan mendukung sensitivitas insulin, sehingga seperti serat larut, dapat membantu mengurangi risiko diabetes.

Serat pangan dapat berperan untuk mendukung kesehatan usus, dimana para peneliti semakin banyak belajar memainkan peran dalam banyak masalah kesehatan di seluruh tubuh. Jumlah serat pangan yang tepat dapat mengontrol berat badan, mengontrol dan mungkin mencegah hipertensi, membantu menyeimbangkan kadar kolesterol dalam darah, mengatur pergerakan usus dan mencegah wasir, mengatur gula darah, mengatur sinyal kejenuhan tubuh, lebih rendah risiko kanker usus besar, risiko kanker payudara lebih rendah, risiko diabetes lebih rendah, membutuhkan lebih banyak mengunyah serta membantu pencernaan.

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke labu erlenmeyer, sampel ditambahkan 12,5 mL buffer sodium fosfat 0,1 M pH 6 dan 50 μ L enzim α -amilase. Selanjutnya, sampel diinkubasi selama 15 menit pada suhu 100°C. Setelah itu, sampel didinginkan dan ditambahkan 20 mL air destilata (dilakukan penambahan pH 1.5 menggunakan HCl). Sampel kemudian ditambahkan 50 mg pepsin dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 40°C. Setelah itu, sampel ditambahkan 20 mL air destilata (dilakukan penambahan pH 6,8 menggunakan NaOH). Sebanyak 50 mg pankreatin ditambahkan pada sampel dan

diinkubasi selama 60 menit pada suhu 40°C. Sampel selanjutnya dilakukan penyetelan pH hingga mencapai pH 4,5 menggunakan HCl dan disaring menggunakan kertas saring Whatman nomor 1. Residu sampel selanjutnya dicuci menggunakan 2 x 10 mL air destilata. Pada analisis serat pangan tidak larut (SPTL), residu sampel dicuci menggunakan 2 x 10 mL etanol 95% dan 2 x 10 mL aseton. Lalu, residu tersebut dikeringkan pada suhu 105°C selama 1 malam. Residu yang telah dikeringkan dimasukkan ke desikator dan ditimbang. Setelah ditimbang, residu ditanur selama 5 jam pada suhu 550°C dan kembali dimasukkan ke desikator dan ditimbang. Sedangkan, pada analisis serat pangan larut (SPL), filtrat dan air cucian yang diperoleh digabung dan ditepatkan hingga 100 mL. Selanjutnya, filtrat tersebut ditambahkan 400 mL etanol 95% (suhu 60°C) dan dipresipitasi selama 1 jam. Setelah itu, campuran filtrat tersebut disaring dan dicuci menggunakan 2 x 10 mL etanol 78%, 2 x 10 mL etanol 95%, dan 2 x 10 mL aseton. Residu yang diperoleh kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 1 malam. Residu yang telah dikeringkan dimasukkan ke desikator dan ditimbang. Setelah ditimbang, residu ditanur selama 5 jam pada suhu 550°C dan kembali dimasukkan ke desikator dan ditimbang.

$$IDF \text{ atau } SDF = \frac{D1 - I1 - B1}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

D1 = Bobot sampel setelah dikeringkan (g)

I1 = Bobot sampel setelah ditanur (g)

B1 = Bobot abu blanko (g)

W = Berat sampel (g)

2.6 Analisis Pati Resisten

Pati resisten (RS) didefinisikan sebagai sejumlah pati atau produk olahan pati yang tidak dapat diserap di usus halus manusia normal. Hal ini disebabkan pati bersifat resisten terhadap hidrolisis

enzim pencernaan manusia sehingga memiliki pengaruh positif bagi tubuh seperti mencegah kanker kolon, memiliki efek hipoglikemik, dan dapat berperan sebagai prebiotik. Menurut Gropper dan Smith (2013), pati resisten merupakan jenis serat yang memiliki efek fungsional yang dapat difermentasi di dalam kolon. Konsumsi pati resisten sebanyak 20 g per hari sangat dianjurkan untuk kesehatan kolon. Baik bahan pangan mentah maupun pangan olahan dapat mengandung sejumlah pati resisten bergantung pada sumber pati dan proses pengolahannya. Rasio amilosa dengan amilopektin, perlakuan panas, pendinginan, dan penyimpanan juga dapat mempengaruhi kadar pati resisten dalam pangan. Berdasarkan sumber dan proses pengolahannya, pati resisten terdiri dari 5 tipe, yaitu RS1, RS2, RS3, RS4, dan RS5.

RS1 merupakan pati yang secara fisik tidak dapat dicerna karena terperangkap matriks pangan. RS2 terdapat secara alami dalam pangan, namun sifat resistensinya berasal dari susunan kimiawi rantai pati. Resistensi RS2 dapat diturunkan melalui proses gelatinisasi yang mampu memecah kristal RS2. RS3 merupakan golongan pati yang terbentuk selama proses pengolahan pangan. Pembentukannya melibatkan proses retrogradasi dari pati yang sudah mengalami gelatinisasi sebelumnya. Penyusunan ulang rantai pati selama retrogradasi menghasilkan ikatan yang kompak dan resisten terhadap aktivitas enzim amilolitik. RS4 terbentuk dari perlakuan dengan bahan kimia yang mengakibatkan pemutusan dan penyusunan ulang pati membentuk struktur yang resisten terhadap hidrolisis enzim amilolitik. Sementara RS5 merupakan golongan pati resisten yang terbentuk dari interaksi amilosa dengan asam lemak atau monogliserida.

Pati Resisten Tipe 3. Menurut Jacobash et al. (2006), pada prinsipnya produksi pati resisten tipe 3 melalui tiga tahapan yaitu pemutusan cabang, gelatinisasi, dan retrogradasi pati natif.

Pemutusan cabang α -1,6 inter-klaster dari rantai amilopektin dan degradasi fraksi amilosa rantai panjang menghasilkan fraksi amilosa rantai pendek dengan bobot molekul rendah yang dapat meningkatkan pembentukan RS3. Tujuan gelatinisasi adalah pembengkakan granula pati melalui pemanasan menggunakan air berlebih sehingga amilosa keluar dari granula sebagai gulungan polimer dalam larutan. Pati yang telah tergelatinisasi selanjutnya didinginkan sehingga terjadi retrogradasi. Selama retrogradasi, polimer tersebut kembali membentuk *double helix* yang distabilkan dengan adanya ikatan hidrogen.

Metode yang dapat digunakan untuk modifikasi pati menjadi RS3 di antaranya yaitu metode pemanasan-pendinginan (*autoclaving-cooling*) dan *heat moisture treatment* T (HM). Faktor-faktor penting dalam modifikasi pati menggunakan metode pemanasan-pendinginan yaitu suhu pemanasan lebih tinggi dari suhu gelatinisasi (80-130 °C) agar pati dapat tergelatinisasi sempurna, penyimpanan pada suhu rendah sekitar 4°C menstimulasi terjadinya retrogradasi, dan suhu pengeringan gel pati yang dihasilkan setelah proses pemanasan-pendinginan selesai dilakukan. Begitu pula pada metode modifikasi HMT, modifikasi fisik dilakukan dengan perlakuan panas, menggunakan suhu di atas suhu gelatinisasi (80-130°C) pada kadar air yang terbatas (<35% b/b), sehingga melibatkan pengaturan kadar air dan perlakuan panas.

Pati resisten tipe 3 merupakan jenis pati resisten yang paling banyak digunakan sebagai bahan baku pangan fungsional berbasis RS. Hal ini disebabkan oleh RS3 relatif lebih tahan panas dibandingkan RS tipe lainnya, sehingga mampu mempertahankan sifatnya selama proses pengolahan pangan. Menurut Jacobash et al. (2006), pati resisten tipe 3 merupakan RS yang sesuai untuk dijadikan prebiotik. Kandungan pati resisten diukur dengan menggunakan metode Reshmi et al. (2017) dengan sedikit

modifikasi. Sebanyak 50 mg sampel mie instan yang sudah ditepungkan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 15 mL. Setelah itu, sebanyak 5 mL buffer KCl-HCl pH 1,5 ditambahkan (penambahan pH dilakukan dengan penambahan HCl 2 M atau NaOH 0,5 M) dan dihomogenisasi. Kemudian, sampel dilakukan penambahan 0.1 mL pepsin (1 g pepsin/10 mL buffer KCl-HCl) dan dihomogenisasi. Setelah itu, sampel diinkubasi dalam penangas air pada suhu 40°C selama 60 menit dengan pengadukan konstan. Selanjutnya, sampel diangkat dari penangas air dan didinginkan dengan air mengalir. Sebanyak 4,5 mL buffer fosfat pH 6,9 ditambahkan pada sampel (penyetelan pH dilakukan dengan penambahan HCl 2 M atau NaOH 0,5 M) dan dihomogenisasi. Kemudian, sebanyak 0,5 mL α -amilase (15,2 mg α -amilase/ mL buffer fosfat) ditambahkan dan dihomogenisasi. Setelah itu, sampel diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37°C selama 16 jam dengan pengadukan konstan.

Selanjutnya, sampel disentrifus 3660 rpm selama 15 menit dan dipisahkan supernatannya. Residu sampel kemudian ditambahkan 10 mL air destilata dan disentrifugasi kembali, lalu dipisahkan supernatannya. Setelah itu, residu sampel ditambahkan 3 mL air destilata dan ditambahkan 1.5 mL KOH 4 M, lalu dihomogenisasi dan didiamkan dalam suhu ruang selama 30 menit dengan pengadukan yang konstan. Residu sampel kemudian ditambahkan sebanyak 2.75 mL HCl 2 M dan 1.5 mL buffer CH₃COONa pH 4.75 (penyetelan pH dilakukan dengan penambahan 2 M HCl atau 0.5 M NaOH). Setelah itu, ditambahkan 40 μ L amiloglukosidase dan dihomogenisasi. Residu sampel diinkubasi dalam penangas air pada suhu 60°C selama 45 menit.

Setelah selesai diinkubasi, residu disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya dalam labu takar. Kemudian, residu dicuci dengan 10 mL air destilata dan

disentrifugasi kembali. Setelah itu, supernatan yang diperoleh dari sentrifugasi yang kedua dicampurkan dengan supernatan yang diperoleh dari sentrifugasi pertama. Kurva standar glukosa disiapkan pada konsentrasi 10-60 ppm. Selanjutnya, sebanyak 1 mL dari air, sampel, dan standar dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 2 mL DNS (asam dinitrosalisilat). Sampel dihomogenisasi, dan didiamkan selama 10 menit dalam penangas air pada suhu 100°C. Selanjutnya, sampel ditambahkan air destilata sebanyak 10 mL. Sampel dan standar diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Konsentrasi pati resisten pada sampel dinyatakan dalam mg glukosa x 0.9.

BAB IV

VITAMIN

1. Vitamin Larut Lemak

1.1 Vitamin A dan Provitamin A (Karotenoid)

Metode standar untuk analisis kuantitatif vitamin A (retinol) dan provitamin A (karotenoid) dalam pangan adalah menggunakan prinsip kromatografi cair (HPLC) dan sampel harus disaponifikasi terlebih dahulu. Baik sampel pangan maupun komponen standar, keduanya harus disaponifikasi menggunakan larutan campuran etanol dan air yang bersifat basa. Dengan demikian, lemak dalam jaringan pangan dikonversi menjadi asam lemak dan retinol ester juga terkonversi menjadi retinol. Selanjutnya, pelarut yang telah mengandung retinol dianalisis secara kuantitatif menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor *ultraviolet* (UV) dan dibaca pada panjang gelombang 313, 325, atau 328 nm. Konsentrasi vitamin A dihitung berdasarkan perbandingan antara *peak height* atau *peak area* antara sampel pangan dan standar.

Analisis karotenoid juga dapat dilakukan menggunakan KCKT dengan detektor UV-Vis, dan dibaca pada panjang gelombang 450 nm. Langkah-langkah pencegahan harus diambil sepanjang prosedur analisis untuk mencegah terjadinya perubahan kimiawi pada vitamin A dan karotenoid karena kedua zat gizi tersebut bersifat sensitif terhadap sinar ultraviolet, udara, suhu tinggi, kelembapan, serta faktor-faktor pro-oksidan lainnya. Langkah-langkah tersebut yaitu selalu menggunakan alat gelas sepanjang analisis karena tidak mudah bereaksi, menggunakan kondisi vakum atau dengan *nitrogen flushing* pada langkah yang sesuai, meminimalkan paparan cahaya sepanjang proses analisis, serta menghindari paparan suhu tinggi atau kenaikan suhu yang

signifikan sepanjang analisis. Selain itu, penambahan antioksidan pada tahap awal analisis juga disarankan untuk melindungi komponen dari reaksi oksidasi.

Kebutuhan vitamin A dinyatakan sebagai *retinol equivalent* (RE) karena vitamin A tidak hanya terdiri dari retinol. RE didefinisikan sebagai 1 μg *all-trans* retinol yang setara dengan 6 μg *all-trans* β -karoten atau 12 μg campuran berbagai karotenoid. Dalam perhitungan molar, 1 μg RE dinilai setara dengan 3,5 nmol retinol atau 11,2 nmol β -karoten. Kebutuhan vitamin A dalam sehari dinyatakan dalam RE per hari.

1.2 Vitamin D

Metode standar yang digunakan untuk analisis vitamin D adalah uji biologis berdasarkan derajat kalsifikasi tulang. Prinsip analisis ini melibatkan kondisi kekurangan vitamin D sehingga terbatas hanya pada hewan uji. Meskipun telah banyak kemajuan yang dicapai dalam pengembangan metode analisis vitamin D secara kimiawi, namun metode-metode tersebut tetap memiliki kekurangan dalam hal sensitivitas dan selektivitas apabila dibandingkan dengan uji biologis. Oleh karena itu, metode kimiawi tidak dapat mendeteksi kandungan vitamin D yang rendah dalam sampel. Sedangkan metode kimiawi memiliki keuntungan dari segi waktu pengerjaan apabila dibandingkan dengan metode biologis, sehingga ia masih kerap digunakan untuk sampel-sampel pangan yang diketahui memiliki kandungan vitamin D yang cukup tinggi.

Penggunaan KCKT maupun kromatografi cair kinerja ultra (KCKU) telah dicantumkan dalam beberapa metode resmi AOAC untuk penetapan kandungan vitamin D dalam berbagai sampel, misalnya dalam suplemen, minyak, dan produk susu. Kromatografi cair menawarkan beberapa kelebihan dalam analisis seperti kemampuan untuk mendeteksi komponen turunan vitamin D yang

berbeda serta sensitivitas detektor yang digunakan. Detektor yang biasa digunakan untuk analisis vitamin D adalah detektor UV atau spektrometri massa (SM). Sampel dihomogenisasi dan dicampur dengan larutan standar yang mengandung isotop berlabel dan kemudian disaponifikasi menggunakan campuran etanol dan kalium hidroksida. Prosedur dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan pelarut n-heptana. Ekstrak kemudian dibersihkan menggunakan kolom ekstraksi fase padat (*Solid Phase Extraction*). Eluen (cairan pelarut) yang dihasilkan kemudian diuapkan hingga kering sebelum dilarutkan kembali dalam metanol dan dianalisis menggunakan KCKT/KCKU dengan kolom C18.

Nilai vitamin D diperoleh secara relatif terhadap konsentrasi standar yang digunakan. Total vitamin D diperoleh dari jumlah vitamin D₂ dan D₃ dan dinyatakan dalam satuan μg . Kebutuhan konsumsi harian akan vitamin D dapat juga dinyatakan sebagai *International Unit* (IU) per hari, di mana 1 IU setara dengan 25 μg vitamin D dan 40 IU adalah setara dengan 1 μg vitamin D.

1.3 Vitamin E

Terdapat beberapa jenis vitamin E yang terdapat dalam sampel pangan, dengan mayoritas berasal dari grup tokoferol seperti α , β , γ , δ -tokoferol, dan grup tokotrienol seperti α -tokotrienol. Prinsip analisis vitamin E mirip dengan analisis vitamin A (retinol), sampel harus disaponifikasi terlebih dahulu sebelum diekstrak dan dianalisis dengan sistem kromatografi cair. Sampel pangan melalui tahapan saponifikasi terlebih dahulu sebelum diekstraksi dengan heksana dan diinjeksi ke sistem KCKT–dengan fase normal yang dihubungkan dengan detektor fluoresensi. Vitamin E dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 290 nm dan panjang gelombang emisi 330 nm.

Pada sampel padat berbasis lemak seperti margarin, ekstrak harus dipastikan telah bersih dari air dengan cara menambahkan

MgSO₄ sebelum dianalisis menggunakan KCKT. Sementara untuk sampel lemak cair misalnya minyak goreng, sampel dilarutkan langsung dalam heksana dan diinjeksi ke sistem KCKT. Vitamin E sangat sensitif terhadap oksidasi sehingga saponifikasi sebaiknya dilakukan dengan sistem refluks dan menggunakan bantuan senyawa antioksidan seperti *pyrogallol* serta keseluruhan prosedur analisis dihindarkan dari paparan cahaya langsung. Kandungan vitamin E dalam sampel pangan dinyatakan dalam satuan mg. Namun, karena vitamin E tidak hanya terdiri dari tokoferol sehingga kebutuhan vitamin E dinyatakan sebagai *tocopherol equivalent* (TE). Satu TE setara dengan 1 mg α -tokoferol dalam pangan, sementara bentuk-bentuk isomer lainnya dikonversi ke TE dengan cara mengalikannya ke 1 mg α -tokoferol menggunakan faktor aktifitas relatif, contohnya 0,5 untuk β -tokoferol, 0,1 untuk γ -tokoferol, dan 0,3 untuk α -tokotrienol.

1.4 Vitamin K

Terdapat beberapa senyawa yang merupakan bagian dari keluarga vitamin K yang secara umum dibagi menjadi dua kelompok yaitu vitamin K₁ (filokuinon) dan vitamin K₂ (menakuinon). Seperti vitamin-vitamin larut lemak lainnya, vitamin K sesuai untuk dianalisis menggunakan prinsip kromatografi cair. Sebelum dapat diekstraksi menggunakan heksana, sampel pangan yang mengandung vitamin K seperti contohnya susu, dicerna secara enzimatis terlebih dahulu untuk mengurai lemak dan memisahkan kandungan asam lemaknya. Ekstrak kemudian dianalisis menggunakan KCKT dengan detektor fluoresensi dan kolom C18 atau C30. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 243 nm dan panjang gelombang emisi 430 nm. Sampel dibandingkan dengan standar eksternal untuk kuantifikasi. Kandungan vitamin K dalam sampel pangan dinyatakan dalam satuan μ g. Kebutuhan vitamin K dinyatakan sebagai μ g

filokuinon karena bentuk vitamin K yang utama terdapat dalam pangan adalah filokuinon.

2. Vitamin Larut Air

2.1 Vitamin B₁ (Thiamin)

Prinsip analisis thiamin yang digunakan oleh AOAC dan AACC adalah analisis dengan kuantifikasi spektrometri atas senyawa dengan pendaran biru (tiokrom) yang dihasilkan dari oksidasi ekstrak thiamin oleh kalium ferisianida pada kondisi alkali. Sampel yang mengandung thiamin diekstraksi, kemudian dihidrolisis secara enzimatis, dimurnikan (menggunkan prinsip pemisahan kromatografi apabila diperlukan), dan dianalisis serta dibandingkan dengan larutan thiamin standar. Deteksi thiamin dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 365 nm dan panjang gelombang emisi 435 nm.

Tiokrom sangat sensitif terhadap cahaya sehingga langkah-langkah analisis yang dilakukan setelah proses oksidasi thiamin harus dilaksanakan dalam kondisi cahaya minimum. Selain itu, langkah deteksi pendaran cahaya setelah proses oksidasi juga harus dilakukan sesegera mungkin. Kadar thiamin dalam sampel pangan dinyatakan dalam satuan mg, sedangkan kebutuhan thiamin dinyatakan dalam satuan mg per hari.

2.2 Vitamin B₂ (Riboflavin)

Sampel yang mengandung riboflavin diekstraksi, dimurnikan, dan dianalisis secara fluorometris. Analisis akan komponen individual dari total riboflavin dalam sampel pangan, yaitu koenzim flavin mononukleotida dan flavin adenina dinukleotida dapat dilakukan menggunakan prinsip kromatografi cair menggunakan detektor fluoresensi. Vitamin B₂ sangat sensitif terhadap radiasi UV

sehingga semua langkah analisis dilakukan pada kondisi cahaya minimal.

Selain itu, terjadinya oksidasi yang sempurna menggunakan permanganat juga diperlukan untuk menyingkirkan senyawa-senyawa yang dapat mengganggu hasil akhir, sehingga dapat diperoleh hasil yang dapat dipercaya. Deteksi riboflavin dalam ekstrak sampel dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 440 nm dan panjang gelombang emisi 565 nm. Meskipun vitamin B₂ diklasifikasikan sebagai vitamin larut air, namun tidak larut dengan cepat dalam air. Oleh karena itu, saat menyiapkan larutan standar, harus dipastikan bahwa semua standar riboflavin yang disiapkan telah terlarut dengan sempurna. Kandungan riboflavin dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg dan kebutuhan riboflavin dinyatakan dalam satuan mg per hari.

2.3 Vitamin B₃ (Niasin)

Niasin di sumber nabati berada dalam bentuk asam nikotinat. Sedangkan sumber hewani mengandung niasin dalam bentuk koenzim nikotinamida adenina dinukleotida (NAD) dan nikotinamida adenina dinukleotida fosfat (NADP). Jenis analisis yang lebih tepat dalam menggambarkan jumlah niasin aktif dalam sampel adalah uji mikrobiologi karena dapat merespon niasin baik dalam bentuk asam nikotinat, nikotinamida, maupun bentuk-bentuk koenzim lain dari niasin. Namun, pelaksanaan uji mikrobiologi membutuhkan waktu yang lama serta keahlian dan teknik yang memadai agar hasilnya akurat. Metode analisis yang lebih praktis untuk digunakan dalam menguji kandungan niasin dalam pangan adalah metode kolorimetri, spektrofotometri, maupun KCKT.

Uji mikrobiologi terhadap niasin dapat dilakukan menggunakan *Lactobacillus plantarum*. Secara umum, kandungan niasin dalam sampel pangan selaras dengan tingkat kekeruhan kultur inokulum.

Sedangkan metode kolorimetri dilakukan menggunakan sianogen bromida dan Asam sulfanilat, di mana metode ini memberikan hasil lebih cepat dibandingkan dengan metode mikrobiologi, namun memberikan hasil yang kurang spesifik dan kurang sensitif. Oleh karena itu, metode analisis niasin masih terus dikembangkan dengan prinsip metode analisis yang banyak digunakan adalah kromatografi cair. Metode KCKT dapat dilakukan dengan menggunakan detektor UV. Proses pembersihan atau pemurnian ekstrak harus dilakukan dengan teliti karena ekstrak yang kurang bersih dapat mengganggu deteksi komponen yang dilakukan pada kisaran panjang gelombang yang berdekatan (paling tinggi adalah panjang gelombang 260 nm untuk asam nikotinat. Selain detektor UV, analisis juga dapat dilakukan dengan detektor SM. Kandungan niasin dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg dan kebutuhan niasin dinyatakan sebagai nilai *niasin equivalents* (NE) yang setara dengan mg niasin dan 60 mg triptofan.

2.4 Vitamin B₅ (Asam Pantotenat)

Analisis kandungan asam pantotenat dalam pangan dapat dilakukan dengan metode mikrobiologi maupun menggunakan prinsip kromatografi cair. Metode klasik yang dapat digunakan untuk menganalisis kandungan vitamin B₅ dalam sampel pangan adalah uji mikrobiologi dengan *Lactobacillus casei*. Namun, seperti uji mikrobiologi lainnya, metode ini memerlukan waktu yang lama dan memerlukan keahlian yang memadai. Alternatif lainnya yang dapat dipilih untuk analisis vitamin B₅ yaitu menggunakan prinsip kromatografi cair yaitu kromatografi cair (KC), KCKT, maupun KCKU dengan menggunakan detektor UV, fluorometris, ataupun SM. Dalam metode kromatografi cair dengan kromatografi cair kinerja ultra – spektrometri massa (KCKU-SM), sampel dapat diekstraksi menggunakan buffer amonium asetat, kemudian difiltrasi, dan

akhirnya diinjeksikan ke sistem kromatografi. Kandungan vitamin B₅ dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg dan kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan mg per hari.

2.5 Vitamin B₆ (Piridoksin)

Vitamin B₆ secara alami terdapat dalam 3 bentuk: piridoksin, piridoksamin, dan piridoksal. Penentuan kadar vitamin B₆ dalam sampel pangan dapat dilakukan secara mikrobiologi maupun kimiawi. Metode mikrobiologi menggunakan kapang *Saccharomyces uvarum*. Namun, analisis secara kimiawi menggunakan KCKT lebih sering digunakan karena relatif lebih praktis. Vitamin B₆ dapat dianalisis menggunakan instrumen KCKT. Metode kromatografi cair dilakukan berdasarkan prinsip isokratik yang dapat memisahkan ketiga bentuk utama vitamin B₆. Tahap ekstraksi sangat penting dilakukan sebelum analisis vitamin B₆ dengan menggunakan pelarut asam trikloroasetat (TCA) dan asam perklorat karena cukup efektif dalam tahap ekstraksi. Kemudian dilanjutkan dengan proses enzimatik menggunakan asam fosfatase dan β -glukosidase sehingga bentuk piridoksin bebas dan bentuk β -glikosidik piridoksin dapat terpisah dan mudah untuk dianalisis. Semua bentuk vitamin B₆ bersifat sensitif terhadap cahaya sehingga proses analisis dilakukan pada paparan cahaya minimum atau dengan menggunakan cahaya kekuningan untuk menghindari terjadinya fotodegradasi. Kandungan vitamin B₆ dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg dan kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan mg per hari.

2.6 Vitamin B₇ (Biotin)

Analisis biotin sering dilakukan dengan tiga jenis metode, yaitu bioasai, *avidin-binding assay*, dan asai turunan fluoresensi. Bioasai menggunakan *L. plantarum* merupakan metode klasik dalam analisis

kadar biotin, namun sering dinilai kurang praktis. Hasil yang lebih cepat dapat diperoleh dengan menggunakan prinsip *avidin-binding assay* dengan cara sampel diekstrak dan kemudian ekstrak dianalisis dengan sistem kromatografi cair.

Analisis dengan metode *avidin-binding assay* dilakukan dengan cara melepaskan ikatan antara protein dan biotin menggunakan hidrolisis asam. Kemudian, biotin yang telah terlepas dari ikatannya kepada protein dapat dianalisis menggunakan HPLC. Kandungan biotin dalam pangan dinyatakan dalam satuan μg dan kebutuhan biotin dinyatakan dalam satuan μg per hari.

2.7 Vitamin B₉ (Folat)

Folat merupakan grup dari beberapa senyawa seperti asam folat (*pteroylglutamate*) dan poliglutamil konjugat yang semuanya memiliki aktivitas biologis sebagai asam folat. Metode klasik yang digunakan untuk analisis folat adalah menggunakan ekstraksi dengan tiga enzim (*trienzyme*) dan diikuti dengan analisis total folat secara mikrobiologis menggunakan *Lactobacillus casei* (*spp. rhamnosus*). Namun, telah dikembangkan metode analisis folat yang lebih praktis yaitu menggunakan metode kromatografi cair.

Folat bersifat sangat sensitif terhadap oksidasi dan kerusakan akibat cahaya, panas, maupun kehilangan akibat terlarut dalam air pengolahan pangan. Uji mikrobiologi terhadap total folat dilakukan dengan menggunakan *Lactobacillus casei* (*spp. rhamnosus*). Namun, telah dikembangkan metode analisis total folat yang lebih praktis seperti misalnya menggunakan prinsip kromatografi cair dengan KCKT dan detektor UV karena sifatnya yang memakan waktu dan memerlukan keahlian khusus. Kandungan folat dalam pangan dinyatakan dalam satuan μg dan kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan μg *dietary folate equivalent* (DFE) yang setara dengan 1 μg folat dan 1,7 μg asam folat.

2.8 Vitamin B₁₂ (Kobalamin)

Vitamin B₁₂ atau disebut juga kobalamin, merupakan suatu kumpulan senyawa kobalamin yang terdiri dari sianokobalamin, hidrosilkobalamin, adenosilkobalamin, dan metilkobalami. Metode klasik untuk menganalisis kandungan vitamin B₁₂ dalam pangan adalah dengan uji bioasai dan analisis mikrobiologi menggunakan *Lactobacillus leishmanii*. Uji mikrobiologi sangat sensitif sehingga dapat mendeteksi jumlah vitamin B₁₂ yang kecil sekalipun, namun masih kurang spesifik akibat beberapa komponen pangan juga dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme yang digunakan. Oleh karena itu, beberapa metode analisis kimiawi yang lebih praktis terus dikembangkan seperti uji radioisotop, metode *protein-binding*, dan metode kromatografi cair dengan detektor UV yang sekarang lebih banyak digunakan.

Sensitifitas metode dan kemurnian ekstrak sangat mempengaruhi keakuratan hasil yang didapatkan karena vitamin B₁₂ yang terdapat dalam pangan tersedia dalam beberapa bentuk dan terkadang dalam jumlah sangat kecil. Berbagai eksperimen telah mencoba metode pembersihan atau pemurnian ekstrak yang dapat digunakan seperti misalnya dengan ekstraksi fase padat atau dengan kolom imuno-afinitas, sebelum sampel dianalisis dengan kromatografi cair dan detektor UV pada panjang gelombang 361 nm. Kandungan vitamin B₁₂ dalam pangan dinyatakan dalam satuan µg dan nilai kebutuhannya dinyatakan dalam satuan µg per hari.

2.9 Vitamin C

Vitamin C terdiri atas asam L-askorbat dan asam L-dehidroaskorbat. Metode standar yang biasa digunakan untuk menganalisis vitamin C antara lain dengan metode titrasi menggunakan 2,6-dikloroindofenol maupun uji mikrofluorometri.

Metode kromatografi cair dengan KCKT dapat digunakan untuk mengidentifikasi setiap jenis vitamin C yang lebih spesifik. Dalam metode titrasi, asam L-askorbat dalam sampel pangan dioksidasi menjadi asam L-dehidroaskorbat dengan menggunakan indikator redoks 2,6- dikloroindofenol. Pada titik akhir titrasi, kelebihan indikator dalam suasana asam akan menghasilkan warna merah muda, sedangkan pada metode mikrofluorometri, total kedua jenis vitamin C (asam L-askorbat dan asam L-dehidroaskorbat dapat diukur setelah asam askorbat dioksidasi menjadi asam dehidroaskorbat dan direaksikan dengan o-fenildiamina untuk menghasilkan senyawa quinoxalin yang berpendar. Berbagai pengembangan metode kromatografi cair telah dilakukan, misalnya dengan menggunakan KCKT yang dikombinasikan dengan detektor UV.

Vitamin C sangat sensitif terhadap kerusakan akibat oksidasi yang ditunjang oleh faktor-faktor seperti pH yang tinggi dan keberadaan ion feri dan ion kupri di lingkungan sekitarnya. Oleh karena itu, prosedur analisis sebaiknya dilakukan pada kondisi pH rendah dan dengan penambahan senyawa pengkelat. Kandungan vitamin C dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg dan kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan mg per hari.

BAB V

MINERAL

1. Kalsium

Metode asam etilenadiaminatetraasetat (EDTA) kelatometri adalah metode analisis yang umum digunakan untuk penentuan kalsium dalam sampel buah, sayuran, dan pangan lainnya dengan catatan sampel tidak memiliki kandungan magnesium dan fosfor yang tinggi. Selain itu, analisis kalsium dalam sampel pangan juga dapat dilakukan dengan menggunakan elektrode selektif ion (ESI) yang dirancang khusus untuk setiap jenis kation maupun anion.

Saat ini, instrumen spektroskofotometer serapan atom (SSA), *inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry* (ICP-AES), maupun *inductively coupled plasma – mass spectrometers* (ICP-MS) telah banyak digunakan untuk menganalisis mineral, contohnya kalsium, dibandingkan dengan menggunakan metode klasik seperti titrasi.

Analisis kandungan kalsium dalam sampel menggunakan metode *EDTA* kelatometri sebaiknya dilakukan pada pH 10.0 ± 0.1 , dengan menggunakan buffer ammonia, sebab pada pH ini maka kalsium dapat membentuk kompleks yang stabil dengan EDTA. Selain itu, pada pH yang lebih tinggi, misalnya pH 12.0, kalsium akan terpresipitasi sehingga hasil yang diperoleh tidak akurat. Metode ini dinilai sesuai untuk digunakan pada sampel buah dan sayuran setelah sampel melewati proses pengabuan. Sementara itu, pengukuran kandungan kalsium menggunakan ESI biasa dilakukan untuk sampel seperti susu.

Metode spektrofotometri dapat digunakan untuk menentukan kandungan kalsium dalam sampel pangan. Sampel harus didestruksi terlebih dahulu, baik dengan cara pengabuan basah menggunakan asam maupun pengabuan kering pada 450°C . Kemudian, abu sampel dilarutkan dalam asam lemah dan sampel dianalisis menggunakan

instrumen berbasis spektrofotometri seperti SSA (panjang gelombang = 423 nm) dan ICP-AES (panjang gelombang = 318 nm). Kandungan kalsium dalam sampel pangan dinyatakan dalam satuan mg per 100 g, sedangkan kebutuhan akan mineral ini dinyatakan dalam satuan mg per hari.

2. Fosfor

Analisis fosfor dalam sampel pangan dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti gravimetri, kolometri, fotometri maupun menggunakan kromatografi. Analisis kandungan fosfor dalam pangan menggunakan metode tradisional dilakukan dengan cara mempresipitasi fosfor dalam sampel (setelah dilakukan pengabuan) menggunakan larutan amonium molibdat, kemudian jumlah fosfor ditentukan secara gravimetri. Metode ini sesuai digunakan apabila kandungan fosfor dalam pangan lebih besar dari 10 mg.

Metode lainnya yang dapat digunakan untuk menganalisis kandungan fosfor dalam pangan adalah dengan menggunakan instrument *UV-Vis* spektrofotometer. Pada metode ini, kandungan fosfor dalam sampel ditentukan dalam bentuk fosfat (PO_4). Fosfat dalam sampel dikomplekskan menggunakan molibdovanadat yang menghasilkan warna kuning. Intensitas warna kuning yang dihasilkan berbanding lurus dengan kandungan P dalam sampel, sehingga absorbansinya dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 178 nm.

Metode analisis fosfor yang lebih baru dapat dilakukan menggunakan prinsip kromatografi gas dengan memasangkannya ke beberapa jenis detektor, misalnya dengan detektor termionik yang juga disebut sebagai detektor nitrogen fosfor (DNF). Selain itu, dapat juga digunakan detektor berupa detektor fotometrik nyala (DFN) maupun detektor fotometrik nyala berdenyut (DFND) yang membakar semua analit yang keluar dari kolom kromatografi cair sehingga menghasilkan

emisi cahaya yang kemudian ditangkap oleh detektor fotometrik. Kandungan fosfor dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg per 100 g dan kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan mg per hari.

3. Natrium

Ada beberapa metode analisis yang dapat digunakan untuk menentukan kandungan natrium dalam sampel pangan, seperti ESI, ICP-ES dan spektrofotometri emisi nyala maupun spektrofotometri serapan atom.

Dalam analisis natrium menggunakan ESI, metode ini dilakukan berdasarkan sifat dasar natrium yang juga merupakan ion. Elektroda khusus dirancang untuk dapat mendeteksi kandungan natrium dalam pangan. Metode ini dinilai tepat untuk digunakan pada beberapa jenis sampel, misalnya pada sampel es krim, minuman anggur, dan sampel-sampel lainnya yang mengandung natrium dalam jumlah yang relatif rendah (<100 mg natrium per 100 g).

Sedangkan untuk spektroskopi emisi, analisis natrium dalam pangan dilakukan dengan menggunakan sistem spektrofotometri emisi nyala yang memiliki sistem pembakaran untuk mengatomisasi sampel sehingga menghasilkan eksitasi yang kemudian dibaca oleh spektrofotometer/fotometer. Metode berdasarkan emisi nyala ini digunakan untuk zat yang memiliki energi eksitasi yang rendah seperti natrium. Selain emisi nyala, kandungan natrium dalam pangan juga dapat dianalisis dengan ICP-ES.

Pada metode spektroskopi serapan atom nyala, kandungan natrium dalam sampel pangan dapat ditentukan. Metode ini digunakan pada sampel yang memiliki kandungan natrium yang cukup tinggi. Sedangkan apabila menggunakan SSA, tingkat sensitifitas analisis dapat ditingkatkan sehingga jumlah natrium yang lebih sedikit dapat terdeteksi.

Sampel yang dianalisis kandungan natriumnya melalui berbagai spektroskopi, harus diabukan terlebih dahulu, baik dengan pengabuan basah maupun kering. Kandungan natrium dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg per 100 g dan rekomendasi konsumsi harian natrium dinyatakan dalam satuan mg per hari.

4. Kalium

Ada beberapa metode analisis yang dapat digunakan untuk menentukan kandungan kalium dalam sampel pangan, metode klasik seperti titrimetri dan ESI, maupun yang metode yang lebih mutakhir seperti spektrofotometri emisi nyala, (ICP-ES), maupun spektrofotometri serapan atom.

Penggunaan ESI untuk menganalisis kandungan kalium dalam pangan dilakukan pada beberapa sampel seperti minuman anggur. Sementara itu, analisis kandungan kalium dalam pangan dapat juga dilakukan dengan menggunakan metode spektroskopi, seperti misalnya dengan instrumen SSA. Sampel harus diabukan terlebih dahulu, baik secara *wet ashing* maupun *dry ashing* sebelum kemudian dianalisis dengan SSA. Kandungan kalium dalam sampel juga dapat dianalisis dengan spektrofotometer emisi nyala, namun sensitifitasnya lebih rendah dibandingkan dengan SSA. Kandungan kalium dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg per 100 g dan rekomendasi konsumsi harian kalium dinyatakan dalam satuan mg per hari.

5. Klorida

Analisis klorida dalam pangan dilakukan menggunakan metode titrimetri presipitasi maupun metode ESI. Metode titrasi-presipitasi sesuai digunakan untuk sampel pangan yang memiliki kandungan klorida yang cukup tinggi. Metode Mohr merupakan metode titrasi langsung yang berdasarkan pada pembentukan warna oranye dari perak kromat, setelah perak nitrat membentuk kompleks dengan semua

klorida yang ada dalam sampel. Sedangkan metode titrasi Volhard merupakan metode titrasi tidak langsung atau titrasi terbalik, yaitu dengan larutan perak nitrat ditambahkan secara berlebih ke sampel yang mengandung klorida. Kelebihan perak yang tidak bereaksi dengan klorida dalam sampel, kemudian dititrasi balik menggunakan larutan kalium tiosianat atau amonium tiosianat dengan menggunakan indikator ion feri. Jumlah perak yang terpresipitasi akibat reaksi dengan klorida dalam sampel kemudian dihitung dengan cara mengurangkannya dari jumlah awal yang ditambahkan. Sistem titrasi dapat dilakukan secara manual maupun dengan instrumen otomatis.

Selain metode titrasi, kandungan klorida dalam pangan juga dapat dianalisis dengan menggunakan ESI, seperti halnya mineral-mineral lain yang merupakan ion. Selain itu, telah dikembangkan juga analisis klorida dengan menggunakan prinsip kromatografi cair. Kandungan klorida dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg per 100 g, sedangkan kebutuhan konsumsi harian klorida dinyatakan dalam satuan mg per hari.

6. Magnesium

Analisis kandungan magnesium dalam pangan dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti kelatometri, SSA, dan *inductively coupled plasma – optical emission spectrometry* (ICP-OES). Metode kelatometri dengan menggunakan EDTA dapat dipakai untuk menganalisis kandungan magnesium dalam sampel pangan. Seperti pada analisis kalsium, metode ini sebaiknya dilakukan pada pH 10 untuk menganalisis magnesium. Sebelum dianalisis dengan SSA atau ICP-OES, sampel yang mengandung magnesium harus diabukan terlebih dahulu, baik dengan cara pengabuan basah maupun pengabuan kering. Kandungan magnesium dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg per 100 g, sedangkan kebutuhan konsumsinya dinyatakan dalam satuan mg per hari.

7. Zat Besi

Analisis kandungan zat besi dalam pangan dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti kolometri (UV-spektrofotometri), SSA, dan (ICP-AES). Sebelum dianalisis dengan UV spektrofotometer, SSA, atau ICP-AES, sampel yang mengandung zat besi harus diabukan terlebih dahulu, baik dengan cara pengabuan basah maupun pengabuan kering.

Total zat besi dalam sampel pangan dapat ditentukan berdasarkan absorbansi pada panjang gelombang 562 nm dengan menggunakan spektrofotometer, kemudian dihitung menggunakan persamaan regresi yang dihasilkan dari kurva standar. Kandungan zat besi dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg per 100 g, sedangkan untuk kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan mg per hari.

8. Iodium

Analisis kandungan iodium dalam pangan dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti titrasi dengan menggunakan natrium tiosulfat, potensiometri elektroda selektif ion, spektrofotometri, kolorimetri terbalik, dan ICP-MS. Sebelum dianalisis dengan spektrofotometer maupun dengan ICP-MS, sampel yang mengandung iodium harus diabukan terlebih dahulu, baik dengan cara pengabuan basah maupun pengabuan kering.

Pada metode spektrofotometer, abu sampel yang dihasilkan dari proses pengabuan dilarutkan dalam air bebas ion dan total iodida ditentukan menggunakan spektrofotometer berdasarkan pada reaksi katalitik antara tiosianat dengan nitrit atau ion serium dengan asam arsenious. Jumlah iodium dalam sampel berbanding lurus dengan laju reaksi dari tiosianat atau ion serium. Sementara itu, pada metode kolorimetri terbalik, penentuan iodida dilakukan berdasarkan penurunan absorbansi dari warna kuning ion serium yang berbanding terbalik

dengan konsentrasi iodida dalam sampel setelah iodida mengkatalis reaksi reduksi ion serium dalam asam arsenious.

Metode analisis menggunakan ICP-MS, sampel setelah pengabuan dilarutkan dalam amonium hidroksida dan natrium tiosulfat. Kandungan iodium dalam pangan dinyatakan dalam satuan μg per g, sedangkan untuk kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan μg per hari.

9. Seng

Analisis kandungan seng dalam pangan umumnya dilakukan dengan menggunakan SSA. Sebelum dianalisis dengan SSA, bahan organik dalam sampel harus didestruksi terlebih dahulu dengan cara pengabuan, baik dengan pengabuan basah maupun pengabuan kering. Analisis seng kemudian dapat dilakukan menggunakan SSA pada panjang gelombang 214 nm. Kandungan seng dalam pangan dinyatakan dalam satuan mg per g, sedangkan untuk kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan mg per hari.

10. Selenium

Analisis kandungan selenium dalam pangan dapat dilakukan dengan menggunakan SSA maupun ICP-AES. Selenium merupakan salah satu dari banyak mineral yang dapat dianalisis secara bersamaan menggunakan ICP-AES. Sampel diaspirasi menjadi plasma argon pada suhu sekitar 8000 K. Pada suhu ini, elektron dalam atom tereksitasi ke level energi yang lebih tinggi. Ketika elektron-elektron tersebut kembali ke posisi semula elektron-elektron dapat mengeluarkan cahaya pada panjang gelombang tertentu. Cahaya yang dihasilkan selaras dengan konsentrasi selenium di dalam sampel. Kandungan selenium dalam pangan dinyatakan dalam satuan μg per g, sedangkan untuk kebutuhan konsumsi hariannya dinyatakan dalam satuan μg per hari.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC.
- Astawan, M. 2014. Evaluasi Nilai Gizi Pangan. In: *Evaluasi Nilai Gizi Karbohidrat*. Universitas Terbuka, Jakarta, pp. 1-44.
- Block, R.J. dan H.H. Mitchell. 1946-47. The correlation of the amino acid composition of protein with the nutritive value. *Nutr. Abstr. Rev*, 16:249.
- Blumenkrantz, N. dan Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2): 484-489.
- FAO Food and Agriculture Organization. 2013. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. *Report of an FAO Expert Consultation*. Auckland, 31 March- 2 April 2011.
- Gropper, S. S. dan Smith, J. L. 2013. *Advanced Nutrition and Metabolism*. Wadsworth.
- Jacobas, G., Dongwoski, G., dan Schmehl, K.M. 2006. Hydrothermal treatment of novelose 330 results in high yield of resistant starch type 3 with beneficial prebiotic properties and decreased secondary bile acid formation in rats. *Brit J Nur*, 95: 1063-1074.
- McCready, R. M. dan McComb, E. A. 1952. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. *Analytical Chemistry*, 24(12), 1986-1988.
- McLaughlan, J. M., dkk. 1959. Evaluation of Protein in Foods: IV. A Simplified Chemical Score. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(11): 1293-1299.
- Mitchel, H. H. 1923. A method of determination the biological value of protein. *The J. of Biol. Chem.* 46: 873-903.

- Muchtadi, D. 2010. Teknik Evaluasi Nilai Gizi Protein. Alfabeta, Bandung.
- Reshmi, S. K., Sudha, M. L., dan Shashirekha, M. N. 2017. Starch digestibility and glycemic index of *Paranthas* supplemented with *Citrus maxima* (Burm.) Merr. fruit segments. *Journal of food science and technology*, 54(13): 4370-4377.



**DIREKTORAT
STANDARDISASI
PANGAN OLAHAN**