SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 3751:2018

Tepung terigu sebagai bahan makanan

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

ICS 67.060

Badan Standardisasi Nasional

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

© BSN 2018

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Acuan normatif 1
3 Istilah dan definisi 2
4 Bahan 2
5 Syarat mutu 2
6 Pengambilan contoh 4
7 Cara uji 4
8 Syarat lulus uji 5
9 Higiene 5
10 Pengemasan 5
11 Syarat penandaan 5
Lampiran A (normatif) Cara uji tepung terigu sebagai bahan makanan 6
Bibliografi 38

Tabel 1 - Syarat mutu tepung terigu sebagai bahan makanan 3
Tabel 2 – Kriteria mikrobiologi 4

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) 3751:2018 dengan judul *Tepung terigu sebagai bahan makanan*, merupakan revisi dari SNI 3751:2009, *Tepung terigu sebagai bahan makanan*.

Standar ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:
1. Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam persyaratan mutu dan cara uji;
2. Menyesuaikan standar dengan ketentuan peraturan perundang-undangan;
3. Melindungi produsen;
4. Melindungi konsumen;
5. Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
6. Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri tepung terigu.

Perubahan yang terjadi pada standar ini adalah :
1. Penyesuaian acuan normatif tepung terigu sebagai bahan makanan;
2. Penetapan bentuk senyawa besi dan seng sebagai fortifikan;
3. Penyesuaian syarat mutu cemaran logam berat, arsen dan mikroba mengacu pada ketentuan peraturan perundang-undangan;
4. Penambahan syarat mutu deoksinivalenol dan okratoksin A;
5. Penambahan pasal Higiene;
6. Penyesuaian/penambahan metode uji asam folat menggunakan KCKT;
7. Penyesuaian/penambahan metode uji Zn menggunakan destruksi bertekanan (*microwave digestion*);
8. Penyesuaian metode uji mengacu standar terkini.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 67-04, Makanan dan Minuman. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus yang diselenggarakan di Jakarta pada tanggal 6 Desember 2017. Konsensus ini dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholder*) terkait, yaitu perwakilan dari produsen, konsumen, pakar dan pemerintah.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 5 Februari 2018 sampai dengan tanggal 6 April 2018 dengan hasil akhir disetujui menjadi Standar Nasional Indonesia (SNI).

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari dokumen standar ini dapat berupa hak paten. Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab untuk pengidentifikasian salah satu atau seluruh hak paten yang ada.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Tepung terigu sebagai bahan makanan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, bahan, syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji untuk tepung terigu sebagai bahan makanan.

Standar ini tidak berlaku untuk:

a) tepung atau semolina yang dibuat dari gandum jenis Durum *(Triticum durum Desf),* tunggal atau campuran dengan gandum lainnya;
b) tepung gandum utuh (*whole-wheat flour)* atau semolina gandum utuh, farina yang digiling dari gandum *Triticum aestivum* L (*club wheat*), *Triticum compactum* Host, atau campuran keduanya;
c) tepung terigu yang ditujukan untuk penggunaan bir (*brewing adjunct*) atau untuk pembuatan pati dan/atau gluten;
d) tepung terigu untuk keperluan non makanan;
e) tepung terigu yang telah mengalami perlakuan khusus selain perlakuan pengeringan dan/atau pemucatan.

2 Acuan normatif

Acuan berikut merupakan bagian tidak terpisahkan untuk penggunaan standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang diacu yang digunakan. Untuk acuan tidak bertanggal, edisi terakhir dari dokumen acuan (termasuk amandemen) digunakan.

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 4833-1, *Mikrobiologi rantai pangan - Metode horizontal untuk enumerasi mikroorganisme - Bagian 1: Penghitungan koloni pada suhu 30 °C dengan teknik cawan tuang*

SNI ISO 6579, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi Salmonella spp.*

SNI ISO 6887-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1: Aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran desimal.*

SNI ISO 6887-4, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 4 : aturan khusus untuk penyiapan produk lain selain susu dan produk susu, daging dan produk daging,dan ikan serta produk perikanan.*

SNI ISO 712, *Sereal dan produk sereal – Penentuan kadar air metode acuan rutin*

SNI ISO 1871, *Produk pangan dan pakan – Pedoman umum untuk penentuan nitrogen menggunakan metode Kjeldahl*

SNI ISO 7218, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan– Persyaratan umum dan pedoman untuk pengujian mikrobiologi.*

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

SNI ISO 7251, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi Escherichia coli terduga – Teknik Angka Paling Mungkin (APM).*

SNI ISO 7932, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan– Metode horizontal untuk enumerasi Bacillus cereus terduga – Teknik penghitungan koloni pada suhu 30 °C.*

SNI ISO 21527-2, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi kapang dan khamir – Bagian 2: Teknik penghitungan koloni pada produk dengan aktivitas air kurang dari atau sama dengan dari 0,95.*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini berlaku.

3.1
tepung terigu sebagai bahan makanan
tepung yang dibuat dari endosperma biji gandum *Triticum aestivum* L. (*club wheat*) dan/atau *Triticum compactum* Host dengan penambahan Besi (Fe), Seng (Zn), vitamin B1 (tiamin), vitamin B2 (riboflavin) dan asam folat sebagai fortifikan

3.2
benda asing
benda selain tepung terigu yang berasal dari kulit tanaman lain, tanah, batu-batuan, pasir dan lain-lain serta serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak

4 Bahan

4.1 Bahan baku utama

Biji gandum *Triticum aestivum* L. (*club wheat*) dan/atau *Triticum compactum* Host.

4.2 Bahan baku lain (fortifikan) yang harus ditambahkan

- Besi (Fe) sebagai senyawa Ferro sulfat atau Ferro fumarat atau Natrium Ferri EDTA;
- Seng (Zn), sebagai senyawa Seng oksida;
- Vitamin B1 (tiamin) sebagai senyawa Tiamin Hidroklorida atau Tiamin Mononitrat;
- Vitamin B2 (riboflavin) sebagai senyawa Riboflavin atau Natrium Riboflavin 5-fosfat;
- Asam folat sebagai senyawa Pteroil Asam Monoglutamat.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk tepung terigu sebagai bahan makanan sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan.

5 Syarat mutu

Syarat mutu tepung terigu sebagai bahan makanan sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Tabel 1 – Syarat mutu tepung terigu sebagai bahan makanan

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bentuk	-	serbuk
1.2	Warna	-	putih, khas terigu
1.3	Bau	-	normal (bebas dari bau asing)
2	Benda asing :		
2.1	Kulit tanaman lain, tanah, batu-batuan, pasir dan lain-lain	-	tidak ada
2.2	Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak	-	tidak ada
3	Kehalusan, lolos ayakan 212 µm (mesh No. 70)	fraksi massa, %	min 95
4	Air	fraksi massa, %	maks. 14,5
5	Abu	fraksi massa, %	maks. 0,70
6	Protein	fraksi massa, %	min. 7,0
7	Keasaman	mg KOH/ 100 g	maks 50
8	*Falling number* (atas dasar kadar air 14 %)	detik	min. 300
9	*Fortifikan :*		
9.1	Besi (Fe)	mg/kg	min. 50
9.2	Seng (Zn)	mg/kg	min.30
9.3	*Vitamin* B1 (tiamin)	mg/kg	min. 2,5
9.4	Vitamin B2 (riboflavin)	mg/kg	min. 4
9.5	Asam folat	mg/kg	min. 2
10	Cemaran logam :		
10.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0
10.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,1

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Tabel 1 – lanjutan

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
10.3	Raksa (Hg)	mg/kg	maks. 0,05
10.4	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
11	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5
12	Deoksinivalenol *)	µg/kg	maks. 1.000
13	Okratoksin A *)	µg/kg	maks. 5
14	Cemaran mikroba	-	Lihat Tabel 2
CATATAN : *) Untuk Deoksinivalenol dan Okratoksin A diuji hanya pada saat sertifikasi dan sertifikasi ulang			

Tabel 2 – Kriteria mikrobiologi

No	Jenis cemaran mikroba	n	c	m	M
1	Angka lempeng total	5	2	10^5 koloni/g	10^6 koloni/g
2	*Escherichia coli*	5	2	7,4 APM/g	11 APM/g
3	*Salmonella*	5	0	Negatif/25 g	NA
4	*Bacillus cereus*	5	2	10^3 koloni/g	10^4 koloni/g
5	Kapang dan Khamir	5	2	10^3 koloni/g	10^4 koloni/g
CATATAN : n adalah jumlah contoh yang diambil dan dianalisis c adalah jumlah maksimum contoh yang boleh melampaui batas mikroba untuk menentukankeberterimaan suatu produk pangan m, M adalah batas mikroba NA adalah *Not applicable*					

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk tepung terigu seperti di bawah ini:
a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1;
b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2:
   - Cara uji bentuk sesuai Lampiran A.2.1;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

- Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2;
- Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.3;

c) Cara uji benda asing sesuai lampiran A.3:
- Cara uji kulit tanaman lain, tanah, batu-batuan, pasir dan lain-lain sesuai Lampiran A.3.1;
- Cara uji serangga dalam bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak sesuai Lampiran A.3.2;

d) Cara uji kehalusan, lolos ayakan 212µm (No. 70) sesuai Lampiran A.4;
e) Cara uji kadar air sesuai SNI ISO 712;
f) Cara uji kadar abu sesuai Lampiran A.5;
g) Cara uji kadar protein sesuai SNI ISO 1871;
h) Cara uji keasaman sesuai Lampiran A.6;
i) Cara uji *falling number* (atas dasar kadar air 14 %) sesuai Lampiran A.7;
j) Cara uji fortifikan sesuai lampiran A.8
- Cara uji Besi (Fe) sesuai Lampiran A.8.1;
- Cara uji seng (Zn) sesuai Lampiran A.8.2;
- Cara uji vitamin B1 (tiamin) dan vitamin B2 (riboflavin) sesuai Lampiran A.8.3;
- Cara uji asam folat sesuai Lampiran A.8.4;

k) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.9:
- Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.9.1;
- Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.9.2;
- Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.9.3.

l) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.10;
m) Cara uji deoksinivalenol sesuai dengan Lampiran A.11;
n) Cara uji okratoksin A sesuai dengan Lampiran A.12;
o) Cara uji cemaran mikroba:
- Penyiapan contoh cara uji cemaran mikroba sesuai dengan SNI ISO 6887-1 dan SNI ISO 6887-4;
- Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran SNI ISO 4833-1;
- Cara uji *Escherichia.coli* sesuai dengan SNI ISO 7251;
- Cara uji *Salmonella* sesuai dengan ISO 6579;
- Cara uji *Bacillus cereus* sesuai denganSNI ISO 7932;
- Cara uji kapang dan khamir sesuai dengan SNI ISO 21527-2.

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan peraturan perundang-undangan.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadahyang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Lampiran A
(normatif)
Cara uji tepung terigu sebagai bahan makanan

A.1 Persiapan contoh

Pengujian contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji keadaan dan uji kimia. Untuk uji mikrobiologi diperlukan 5 kemasan tepung terigu. Apabila jumlah contoh hanya 5 kemasan, maka pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji keadaan dan uji kimia. Apabila jumlah contoh lebih dari 5 kemasan maka pengambilan contoh untuk uji keadaan dan uji kimia dapat dilakukan bersamaan, tetapi contoh diambil dari kemasan yang tidak digunakan untuk uji mikrobiologi.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji keadaan

Buka kemasan contoh tepung terigu dan ambil contoh 100 g, kemudian tempatkan dalam wadah yang bersih dan kering.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh tepung terigu dan ambil contoh setelah contoh homogen sebanyak 500 g, kemudian tempatkan dalam wadah yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Ambil 5 kemasan tepung terigu, buka dan ambil contoh secara aseptik dari masing-masing kemasan sebanyak 250 g, kemudian tempatkan dalam 5 botol contoh steril.

A.2 Keadaan produk

A.2.1 Bentuk

A.2.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji secara visual.

A.2.1.2 Cara kerja

a) Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih;
b) Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui bentuk contoh dengan meraba contoh uji.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

a) Apabila teraba serbuk, maka contoh uji tersebut mempunyai bentuk "serbuk";
b) Apabila teraba selain serbuk, maka hasil analisis dinyatakan sesuai dengan pengamatan.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.2.2 Warna

A.2.2.1 Prinsip

Pengujian contoh dengan indera penglihat (mata) yang dilakukan oleh panelis untuk pengujian keadaan.

A.2.2.2 Cara kerja

a) Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih;
b) Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui warna (jarak mata dengan contoh uji kira-kira 25 cm).

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

a) Apabila terlihat warna putih khas terigu berarti contoh uji tersebut mempunyai warna yang normal;
b) Apabila terdeteksi warna selain warna khas contoh uji, berarti contoh uji tersebut mempunyai warna yang menyimpang.

A.2.3 Bau

A.2.3.1 Prinsip

Pengujian contoh dengan menggunakan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis untuk pengujian keadaan.

A.2.3.2 Cara kerja

a) Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih dan tidak berbau;
b) Lakukan penciuman terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui baunya (jarak hidung dengan contoh uji kira-kira ½ cm).

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

a) Apabila tercium bau khas berarti contoh uji tersebut mempunyai bau yang normal;
b) Apabila terdeteksi bau asing selain bau khas contoh uji, berarti contoh uji tersebut mempunyai bau yang tidak normal.

A.3 Benda asing

A.3.1 Kulit tanaman lain, tanah, batu-batuan, pasir dan lain-lain

A.3.1.1 Prinsip

Pengujian contoh dengan indera penglihatan.

A.3.1.2 Cara kerja

a) Periksa isi contoh secara organoleptik apakah mengandung benda lain selain tepung terigu misalnya: kulit tanaman selain gandum, tanah, pasir dan batu-batuan;
b) Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui adanya benda asing tersebut.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.3.1.3 Cara menyatakan hasil

a) Apabila tidak terlihat benda asing, maka hasil dinyatakan ”tidak ada" ;
b) Apabila terlihat benda asing, maka hasil analisis dinyatakan sesuai dengan pengamatan

A.3.2 Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongan yang tampak (ulat, kepompong, serangga atau potongan serangga)

A.3.2.1 Prinsip

Contoh uji dihidrolisis menggunakan HCl dalam keadaan mendidih, bagian tak larut (selain bagian-bagian serangga) yang berada di lapisan air/hidrokarbon dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring atau membrane. Bagian-bagian yang berasal dari serangga diidentifikasi secara visual dan menggunakan mikroskop.

A.3.2.2 Peralatan

a) Corong Pisah kapasitas 1 L;
b) Gelas piala 500 mL;
c) Cawan Uap;
d) Oven untuk suhu 37-40^{o}C;
e) *Magnetic Stirrer*;
f) Gelas ukur 25, 50, 500 mL;
g) Labu semprot;
h) Penutup parafilm;
i) Kertas saring whatman 41;
j) Perangkat penyaringan Buchner;
k) Timbangan analitik;
l) Mikroskop;
m) Cawan Petri;
n) Pengaduk kaca;
o) Pompa Vakum;
p) Pipet tetes

A.3.2.3 Pereaksi

a) Etanol 95 %;
b) Etanol 50 % v/v;
c) Etanol : Gliserol 50:50 % v/v;
d) HCl Pekat;
e) Deterjen cair 1 %;
f) Parafin Oil dengan viskositas 60 Cp pada 20 ˚C

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.3.2.4 Cara kerja

A.3.2.4.1 Hidrolisis

a) Timbang 50 gram contoh, masukkan ke dalam gelas piala, sambil diaduk menggunakan pengaduk kaca, tambahkan lagi 200 mL air sambil membilas dinding gelas piala menggunakan pengaduk kaca;
b) Letakkan gelas piala pada *magnetic stirrer*, aduk dengan kecepatan rendah, lalu tambahkan 20 mL HCl pekat, tutup dengan kaca arloji, nyalakan pemanasnya dan biarkan sampai mendidih, tambahkan 30 mL paraffin oil, biarkan mendidih 30 menit sambil diaduk dengan kecepatan rendah;
c) Tutup gelas piala dengan parafilm, dinginkan larutan dengan meletakkan gelas piala pada wadah yang berisi air dingin;

A.3.2.4.2 Pemisahan

a) Susun 2 set corong pisah pada penyangga, atur hingga corong pisah yang atas langsung terhubung dengan corong pisah yang bawah. Masukkan 30 mL paraffin oil ke dalam corong pisah yang bawah. Masukkan larutan contoh ke dalam corong pisah yang atas perlahan dengan bantuan kaca pengaduk, bilas pengaduk kaca dan gelas piala dengan (30-50) mL etanol 50 %v menggunakan labu semprot, masukkan cairan bilasan ke dalam corong pisah, tambahkan lagi sekitar (100-250) mL etanol 50 %v;
b) Lepaskan corong pisah yang atas dari penyangga, dengan posisi tetap vertikal goyangkan dengan cara memutar selama 2 menit, kembalikan corong pisah pada penyangga, lalu diamkan 1 jam;
c) Alirkan lapisan pelarut yang mengandung air (lapisan bawah) ke corong pisah yang bawah, sisakan sedikit (ketinggian lapisan air sekitar 3 mm);
d) Lepaskan corong pisah yang bawah dari penyangga, lalu goyangkan dengan cara yang sama dengan corong pisah yang di atas, lalu kembalikan ke penyangga dan diamkan selama 1 jam;
e) Buang lapisan air pada corong pisah yang bawah, sisakan sedikit (ketinggian lapisan air sekitar 3 mm);
f) Tambahkan 300 mL etanol 50 % ke corong pisah yang atas sambil membilas dinding corong pisah, lalu Lepaskan corong pisah yang atas dari penyangga, dengan posisi tetap vertikal goyangkan dengan cara memutar selama 2 menit, kembalikan corong pisah pada penyangga, lalu diamkan 1 jam;
g) Alirkan lapisan pelarut yang mengandung air (lapisan bawah) ke corong pisah yang bawah, sisakan sedikit (ketinggian lapisan air sekitar 3 mm);
h) Lepaskan corong pisah yang bawah dari penyangga, lalu goyangkan dengan cara yang sama dengan corong pisah yang di atas, lalu kembalikan ke penyangga dan diamkan selama 1 jam;
i) Buang lapisan air pada corong pisah yang bawah, sisakan sedikit (ketinggian lapisan air sekitar 3 mm);
j) Tambahkan ke masing-masing corong pisah larutan etanol 50 %v sebanyak 300 mL sambil membilas dinding corong pisah, lalu goyangkan masing-masing corong pisah dengan gerakan memutar selama 2 menit, lalu diamkan 30 menit, buang lapisan yang mengandung air pada kedua corong pisah

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.3.2.4.3 Penyaringan

a) Pasang perangkat penyaringan, basahkan terlebih dahulu kertas saring dengan sedikit paraffin oil;
b) Tambahkan beberapa tetes deterjen cair pada corong yang atas, lalu tambahkan 10 mL air, pasang penyumbat pada corong pisah, goyangkan kembali dengan cara memutar dan kocok bolak balik, alirkan ke corong pisah yang bawah, pasang penyumbat lalu goyangkan memutar dan kocok bolak balik;
c) Alirkan campuran di atas ke penyaring, bilas corong pisah dengan 20 mL etanol 50 %, dan masukan hasil bilasan ke penyaring;
d) Ambil kertas saring yang berisi residu hasil penyaringan dengan pinset, letakkan pada cawan petri, lalu tutup, keringkan dioven pada suhu (37-40) ˚C. Setelah kertas saring kering, basahkan kembali dengan beberapa tetes campuran etanol-gliserol.

A.3.2.4.3 Pengamatan

a) Amati serangga dan bagian-bagiannya secara visual
b) Jika tidak terlihat secara visual, amati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 50x

A.3.2.5 Cara menyatakan hasil

Hasil uji dinyatakan "tidak ada" apabila tidak nampak serangga dalam bentuk stadium dan bentuk potongannya (ulat, kepompong, seranga atau potongan-potongan serangga). Apabila terlihat maka hasil uji dinyatakan sesuai dengan hasil pengamatan.

A.4 Kehalusan

A.4.1 Prinsip

Pengukuran derajat kehalusan dari contoh dengan menggunakan ayakan ukuran 212 µm.

A.4.2 Peralatan

a) Alat penggoyang ayakan
b) Ayakan dan piring/penampung 8 inci, 212 µm (70 mesh)
c) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 g

A.4.3 Cara kerja

a) Timbang 50 g ± 0,1 g contoh, masukkan ke dalam ayakan yang dipasang pada alat penggoyang, dan goyangkan selama 5 menit (W_2).
b) timbang bagian yang tertinggal dalam ayakan (W_1).

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kehalusan (\%)} = 100\ \% - \left(\frac{W1}{W2} \times 100\ \%\right)$$

Keterangan:
W_1 adalah bobot bagian yang tertinggal dalam ayakan, (g);
W_2 adalah bobot contoh, (g).

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.5 Kadar Abu

A.5.1 Prinsip

Pengabuan contoh dalam tanur pada suhu 550 °C zat-zat organik diuraikan menjadi air dan CO_2, sedangkan zat-zat anorganik yang tertinggal dihitung sebagai kadar abu.

A.5.2 Peralatan

a) Eksikator yang berisi desikan;
b) Cawan porselin, kuarsa atau platina dengan volume 30 mL sampai 50 mL;
c) Tanur listrik dengan ketelitian 1 °C;
d) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;.
e) Penangas listrik/bunsen.

A.5.3 Cara kerja

a) Pijarkan cawan di dalam tanur listrik pada suhu (550 ± 10) °C, yang sebelumnya dipanaskan dahulu pada penangas listrik/Bunsen dengan nyala api kecil selama 1 jam;
b) dinginkan dalam eksikator selama 1 jam, kemudian timbang (W_1);
c) timbang 3 g sampai 5 g contoh (W);
d) arangkan di atas penangas listrik/Bunsen dengan nyala api kecil;
e) abukan dalam tanur pada suhu (550 ± 10) °C sampai putih atau kelabu selama 5 sampai 8 jam;
f) dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan timbang;
g) masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu yang sama selama 1 jam, dinginkan dalam eksikator dengan waktu yang sama dan timbang;
h) ulangi seperti pada butir g sampai diperoleh bobot tetap (selisih penimbangan yang terakhir dan yang sebelumnya maksimum 4 mg (W_2);
i) lakukan duplo;
j) hitung kadar abu dalam contoh.

A.5.4 Perhitungan

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W - W_1} \times 100\ \%$$

Keterangan:
W adalah bobot cawan kosong dan bobot contoh (g),
W_1 adalah bobot cawan kosong (g),
W_2 adalah bobot cawan kosong dan abu (g).

A.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu atau deviasi (*RSD)* maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau RSD lebih besar dari 3 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.6 Keasaman

A.6.1 Prinsip

Lemak dari hasil ekstraksi contoh dilarutkan pelarut organik yang dilanjutkan dengan penitaran menggunakan KOH.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.6.2 Peralatan

a) Buret 10 mL
b) Erlenmeyer asah 250 mL;
c) Alat ekstraksi lemak;
d) Gelas ukur 100 mL;
e) Penangas air;
f) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg.

A.6.3 Pereaksi

a) Larutan toluena-alkohol fenolftalein (PP) 0,02 %
   tambahkan 0,4 g PP ke dalam campuran 1 L toluena dan 1 L alkohol;
b) Larutan indikator PP 0,04 %
   tambahkan 0,4 g PP ke dalam satu L alkohol;
c) Petroleum-eter 40-60;
d) Larutan $KMnO_4$ 0,01 %
e) Larutan $K_2Cr_2O_7$ 0,5 %
f) Larutan baku KOH-alkohol 0,0178 N (bebas karbonat)
   - Larutkan 1 g KOH dalam 20 mL air suling bebas CO_2, kemudian encerkan sampai 1L dengan alkohol 95 %, kocok hingga homogen dan simpan dalam botol coklat bertutupkaret (biarkan semalam sebelum digunakan)
   - Standardisasi larutan KOH-alkohol 0,0178 N dengan menggunakan kalium hidrogen ftalat.
   - Keringkan kalium hidrogen ftalat dalam oven pada suhu 120 °C selama 2 jam, kemudian dinginkan dalam eksikator.
   - Timbang (0,4 ± 0,02) g kalium hidrogen ftalat, masukkan ke dalam labu takar 100 mL, larutkan dengan air suling dan impitkan.
   - Pipet 10 mL larutan tersebut ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 50 mL air suling dan beberapa tetes PP.
   - Titar dengan larutan baku KOH-akohol hingga timbul warna merah muda (merah jambu) yang stabil.
   - Hitung normalitas KOH alkohol.

$$\text{Normalitas KOH} = \frac{\text{bobot kalium hidrogen ftalat (g)}}{\text{mL KOH} \times 2,0444}$$

A.6.4 Cara kerja

a) Ekstrak (10 ± 0,01) g contoh dengan pelarut petroleum eter 40-60 selama 16 jam di atas alat ekstraksi lemak (dapat juga menggunakan perangkat ekstraksi lemak otomatis);
b) uapkan di atas penangas air sampai pelarut menguap semuanya dan tertinggal residu lemak;
c) larutkan residu lemak dengan 50 mL larutan toluena-alkohol PP;
d) titar dengan KOH sampai warna merah jambu atau larutan kuning menjadi sindur merah jambu. Jika terjadi emulsi selama penitaran, tambahkan lagi 50 mL larutan toluena-alkohol-PP. Titik akhir harus sebanding dengan warna larutan yang dibuat dari penambahan 2,5 mL larutan $KMnO_4$ 0,01 % pada 50 mL larutan $K_2Cr_2O_7$ 0,5 % (tambahkan beberap tetes $K_2Cr_2O_7$ 0,5 % pada 50 mL air, kemudian tambahkan 5 mL larutan $KMnO_4$ 0,01 %, dan dicampur dalam keadaan selalu baru);
e) buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi yang sama seperti untuk contoh.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.6.5 Perhitungan

Keasaman lemak dihitung sebagai mg KOH yang dipergunakan untuk menetralkan asam lemak bebas dari 100 g contoh.

Keasaman lemak = 10 x (V – V1)

Keterangan:
V adalah volume KOH yang diperlukan dalam penitaran contoh (mL),
V_1 adalah volume penitaran blanko (mL).

A.7 *Falling number*

A.7.1 Prinsip

Mengukur aktifitas enzim α-*amylase* dalam contoh tepung terigu dengan menggunakan alat *falling number*.

A.7.2 Peralatan

a) Alat *falling number;*
b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,01 g;
c) Pipet volume 25 mL.

A.7.3 Pereaksi

Air suling

A.7.4 Cara kerja

a) Nyalakan alat *falling number* sesuai petunjuk kerja alat;
b) tambahkan 25 mL air suling ke dalam dua tabung viscometer;
c) timbang dua contoh(duplo) masing-masing (7,00 ± 0,01) g, kemudian masukkan dalam tabung viscometer.
d) baca nilai *falling number* pada *counter* sebagai total waktu (detik).

A.7.5 Perhitungan

Falling Number (atas dasar kadar air 14 %) = $\frac{\text{FN contoh } (100 - 14)}{(100 - N)}$

Keterangan:
N adalah kadar air sebenarnya dari contoh yang diuji sesuai SNI ISO 712.

A.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil *falling number* atau maksimal 2,5 % dari deviasi (*RSD*). Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 2,5 % analisis harus diulang kembali.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.8 Fortifikan

A.8.1 Besi (Metode Spektrometer Serapan Atom, SSA)

A.8.1.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan Fe. Larutan Fe ditetapkan dengan metode SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.

A.8.1.2 Pereaksi

a) HCl 5 N;
encerkan 415 mL HCl 37 %, Bj 1,19, ke dalam labu takar 1 L impitkan dan kocok.
b) HNO_3 1 N;
larutkan 69 mL HNO3 65 %, Bj 1,4 ke dalam labu takar 1 L impitkan dan kocok.
c) HNO_3 pekat (65 %, BJ 1,4) ;
d) HNO_3 0,1 M;
larutkan 7 mL HNO3 65 %, Bj 1,4 ke dalam labu takar 1 L impitkan dan kocok.
e) HNO_3 3 M;
larutkan 200 mL HNO3 65 %, Bj 1,4 ke dalam labu takar 1 L impitkan dan kocok.
f) H_2O_2 30%;
g) Larutan baku Fe 1.000 mg/L;
encerkan larutan baku Fe (Titrisol) ke dalam labu ukur 1 L dengan HCl 5 N / HNO_3 1N impitkan dan kocok. Simpan dalam botol pereaksi, atau bisa menggunakan larutan standar Fe 1.000 mg/L siap pakai;
h) Larutan baku Fe 50 mg/L;
pipet 5 mL larutan baku Fe ke dalam labu takar 100 mL, impitkan dan kocok.
i) Larutan deret baku kerja Fe;
   - untuk pengabuan kering encerkan larutan baku Fe 50 mg/L ke dalam labu takar 100 mL dengan konsentrasi yang sesuai dengan konsentrasi analit dan rentang kerja alat AAS, tambahkan 10 mL HCl 5 N/10 mL HNO_3 1 N ke dalam masing-masing labu tersebut,impitkan dan kocok.
   - Untuk pengabuan dengan *microwave* encerkan larutan baku Fe 50 mg/L dengan HNO_3 0,1 M dengan konsentrasi yang sesuai dengan konsentrasi analit dan rentang kerja alat AAS.

A.8.1.3 Peralatan

a) Pipet volumetrik 1 mL, 2 mL, 5 mL, dan 10 mL atau buret 10 mL dengan ketelitian 0,05 mL;
b) Labu takar 25 mL, 50 mL, 100 mL dan 1 L;
c) Cawan kuarsa/porselin/platina kapasitas 30 mL sampai 50 mL;
d) Tanur listrik dengan ketelitian 1 °C;
e) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
f) SSA dengan lampu katoda Fe;
g) Gelas piala 50 mLsampai 100 mL;
h) Tabung plastik/tabung kaca;
i) *Microwave Digester* dan tabung *vessel*.

A.8.1.4 Cara kerja

A.8.1.4.1 Cara pengabuan kering

a) Timbang contoh sebanyak 2 g sampai 3 g dalam cawan;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

b) arangkan diatas penangas listrik atau nyala api kecil, kemudian abukan dalamtanur listrik pada suhu (550 ± 10) ˚C sampai putih atau kelabu;
c) larutkan abu dengan 10 mL HCl 5 N atau HNO_3 1 N (panaskan di atas penangas listrik hingga abu larut sempurna);
d) masukkan ke dalam labu takar 50 mL, bilas cawan hingga bersih, kemudian impitkan dan
kocok;
e) buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh;
f) baca absorbansi masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan
alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm;.
g) buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai
konsentrasi (µg/mL);
h) plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi;
i) hitung kandungan Fe dalam contoh.

A.8.1.4.2 Cara pengabuan basah

a) Timbang contoh sebanyak 0,5 g dalam tabung plastik/kaca/dalam gelas piala dan tambahkan 5 mL HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
b) panaskan dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 1 jam kemudian didinginkan;
c) masukkan ke dalam labu takar 25 mLl sambil disaring, kemudian impitkan dan kocok;
d) buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh;
e) baca absorbansi masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm;
f) buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam µg/mL);
g) plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi;
h) hitung kandungan Fe dalam contoh.

A.8.1.4.3 Cara destruksi bertekanan menggunakan *microwave digester*

a) Timbang contoh sebanyak 0,5-1 g dalam tabung *vessel* tertutup dan tambahkan 5 mL HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4) dan 2 mL H_2O_2 30 %;
b) masukkan tabung yang sudah dikencangkan tutupnya ke dalam alat *microwave*;
c) destruksi contoh dengan *microwave digester* sesuai program kerja alat untuk tepung terigu sampai sempurna, kemudian didinginkan;
d) masukkan ke dalam labu takar 25 mL, kemudian impitkan dengan aquabides dan kocok.
e) buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh;
f) baca absorbansi masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm;
g) buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansidan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam µg/mL);
h) plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi;
i) hitung kandungan Fe dalam contoh.

A.8.1.5 Perhitungan

Kadar besi (mg/kg) = $\frac{F \times b}{W}$

Keterangan:
F adalah volume pengenceran (mL);
b adalah µg/mL larutan uji dari kurva kalibrasi larutan deret Fe;
m adalah bobot contoh (g).

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.8.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (*RSD*) maksimal 7 %. Jika *RSD* lebih besar dari 7 % maka analisis harus diulang kembali.

A.8.2 Seng (Zn)

A.8.2.1 Prinsip

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering atau destruksi bertekanan, dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam, kemudian absorbansi dibaca menggunakan alat SSA.

A.8.2.2 Peralatan

a) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
b) cawan porselen/platina/kuarsa dengan kapasitas 50 mL sampai dengan 100 mL;
c) penangas listrik;
d) tanur terkalibrasi suhu 500 °C dengan ketelitian 1 °C;
e) SSA dengan lampu katoda Zn;
f) pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 mL dan 10 mL;
g) labu takar 50 mL, 100 mL dan 1.000 mL;
h) gelas ukur kapasitas 10 mL
i) penangas air;

A.8.2.3 Pereaksi

a) Larutan HNO_3 0,1 N (larutan 7 mL HNO_3 65 %, encerkan menjadi 1 l dengan air suling)
b) Larutan HCl 6 N (larutkan 500 mL HCl 37 %, encerkan menjadi 1 l dengan air suling)
c) Larutan HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4)
d) Larutan HCl pekat (37 %, Bj 1,19)
e) H_2O_2 30%
f) Kertas Whatman No. 41
g) Larutan baku Zn
   Sediaan larutan baku Zn 1.000 µg/mL. Larutkan 1,000 g Zn dalam 7 mL HNO_3 pekat, kemudian masukkan ke dalam labu takar 1.000 mL, encerkan dengan air suling sampai tanda garis. atau bisa digunakan larutan baku kerja Zn 1.000 µg/mL siap pakai.
h) Larutan baku kerja
   Pipet 10,0 mL larutan baku Zn 1.000 µg/mL ke dalam labu takar 100 mL. Encerkan dan tepatkan volume dengan larutan HNO_3 0,1 N dan kocok. Larutan baku kedua ini memiliki
   konsentrasi 100 µg/mL Zn. Pipet larutan baku kedua ke dalam labu takar 100 mL terpisah, sehingga konsentrasi deret standar berada pada range 0 – 10 µg/mL atau berada pada rentang kerja alat AAS, encerkan tepatkan volume dengan larutan HNO_3 0,1 N.

A.8.2.4 Cara kerja

A.8.2.4.1. Cara Pengabuan Kering

a) Timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
b) arangkan cawan berisi contoh di atas penangas listrik (untuk mempercepat pengabuan bila perlu tambahkan 10 mL $MgNO_3.2H_2O$ 10 % dalam alkohol), kemudian panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

c) lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C sampai abu berwarna putih bebas dari karbon;
d) apabila abu masih terdapat sisa karbon, ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkanabu dengan beberapa tetes air diikuti penambahan HNO_3 pekat, tetes demi tetes kira-kira 0,5 mL sampai 3 mL;
e) keringkan cawan di atas penangas listrik, dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C, lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat, bisa diulangi bila abu masih berwarna keabu-abuan;
f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit;
g) saring larutan melalui kertas saring Whatman no.41 ke dalam labu takar 50 mL;
h) cuci residu dengan 5 mL HNO3 0,1 N, saring dan satukan fitrat ke dalam labu takar 50 mL, encerkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan larutan HNO3 0,1 N;
i) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh.
j) baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 213,9 nm.
k) buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi (µg/mL).
l) plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi;
m) hitung kandungan Zn dalam contoh.

A.8.2.4.2. Cara destruksi bertekanan menggunakan *Microwave Digester*

a) Timbang contoh sebanyak 0,5 g sampai 1 g dalam tabung *vessel* tertutup dan tambahkan 5 mL HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4) dan 2 mL H_2O_2 30 %;
b) masukkan tabung yang sudah dikencangkan ke dalam alat *microwave digester*;
c) destruksi contoh dengan *microwave digester* sesuai program kerja alat untuk tepung terigu sampai sempurna, kemudian didinginkan;
d) masukkan ke dalam labu takar 25 mL, kemudian impitkan dengan aquabides dan kocok;
e) buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh;
f) baca absorbansi masing-masing larutan baku kerja Zn, larutan contoh dan blanko denganalat SSA pada panjang gelombang 213,9 nm;
g) buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansidan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam µg/mL);
h) plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi;
i) hitung kandungan Zn dalam contoh.

A.8.2.5 Perhitungan

$$\text{Kadar Zn (mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

Keterangan:
F adalah volume pengenceran (mL);
b adalah µg/mL larutan uji dari kurva kalibrasi larutan deret Zn;
W adalah bobot contoh (g).

A.8.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 7 %. Jika RSD lebih besar dari 7 %, maka analisis harus diulang kembali

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.8.3 Vitamin B1 (*tiamin*) dan vitamin B2 (*riboflavin*)

A.8.3.1 Prinsip

Ekstraksi vitamin dengan menggunakan asam klorida pada pH 4,5 yang kemudian dilakukan pemisahan menggunakan KCKT melalui kolom jenis C18 dengan fase gerak ammoniumasetat-metanol dengan detektor fluorosensi.

A.8.3.2 Peralatan

a) KCKT yang dilengkapi dengan integrator
b) Detector Flouresensi, panjang gelombang 370-520 nm
c) Kolom: mikrobondapak C18 dan C18 Sep-Pak Cartridge
d) Kecepatan alir : 1,5 mL/menit
e) Penyaring: whatman No. 42 atau yang setara dan Millipore HV 0,15 *µ*m
f) Volume injek: 20 µL
g) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
h) Penangas air;
i) autoclave
j) Labu takar (*amber glass*);
k) Labu Erlenmeyer (*amber glass*);
l) Pipet ukur (*amber glass*);
m) Pipet volume (*amber glass*);
n) Tabung kimia (*amber glass*);
o) Spatula.

A.8.3.3 Pereaksi

a) Larutan HCl 0,1N
masukkan air suling ± 250 mL ke dalam labu takar 1.000 mL, pipet 8,33 mL HCl pekat,masukkan dalam labu takar,encerkan hingga tanda tera dengan air suling, kocok sampai homogen
b) Larutan natrium asetat 2 N
timbang 42,015 g natrium asetat. masukkan dalam labu takar 250 mL. tambahkan 50 mL air suling, kocok sampai larut. kocok hingga homogen.
c) Standar vitamin B1 100 µg/mL
timbang 25 mg standar Thiamin HCl ke dalam labu takar 250 mL amber glass, larutkan dalam alkohol 20 % hingga tanda, simpan di refrigerator;
d) Standar vitamin B2 100 µg/mL
timbang 25 mg standar Thiamin HCl ke dalam labu takar 250 mL amber glass, larutkan dalam alkohol 20% hingga tanda, simpan di refrigerator;
e) Kalium ferisianida 1 % dalam NaOH 15 %
f) HCl 3,75 N
g) Fase gerak 72 % NH_4OAc (pH 5) : 28 % Metanol

A.8.3.4 Persiapan larutan deret standar vitamin B1 dan B2

a) pipet 10 mL larutan standar vitamin B1 dan B2 100 µg/mL ke dalam labu takar 100 mL, encerkan sampai tanda garis dengan air suling, kocok sampai homogen;
b) autoclave larutan standar bersamaan dengan Contoh;
c) setelah dingin, pipet larutan standar dan encerkan dengan aquades untuk membuat 4 deret standar dengan rentang konsentrasi 0,1 sampai 0,8 µg/mL dalam labu takar 100 mL;
d) Perlakukan masing masing standar seperti Contoh, dimulai dengan derivatisasi/ekstraksi dan dilanjutkan dengan tahapan pada sep-pak.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.8.3.5 Persiapan larutan contoh

a) Timbang 5 g sampai 7 g contoh dengan teliti yang sebelumnya telah dihaluskan;
b) masukkan dalam labu Erlenmeyer 100 mL;
c) tambahkan 50 mL HCl 0,1 N, kemudian kocok;
d) autoclave pada 121 ºC selama 30 menit;
e) dinginkan pada suhu kamar;
f) atur pH larutan contoh hingga mencapai 4,5 dengan penambahan larutan natrium asetat 2 N;
g) masukkan larutan contoh pada labu takar 100 mL secara kuantiatif dan encerkan sampai tanda tera dengan air suling, saring dengan kertas saring whatman 42;
h) pipet 4 mL filtrat ke tabung uji, tambahkan 3 mL kalium ferisianida 1 % dalam NaOH 15%, kocok dengan vortex selama 10 detik, biarkan 1 menit, lalu tambahkan 3 mL HCl 3,75 N dan kocok menggunakan vortex;
i) kondisikan Sep-Pak Cartride dengan 5 mL Metanol, dan diikuti dengan ammonium asetat 0,005 M (sebelumnya adjust pH 5 dengan asam asetat);
j) lewatkan larutan Contoh pada *cartridge*, bilas *cartridge* dengan 5 mL ammonium asetat 0,005 M yang sudah di-*adjust* pH 5, elusikan Contoh dengan 4 mL methanol-ammonium asetat 0,005 M (pH 5) 60:40;
k) tampung eluat, saring dengan Millipore 0,45 µm, larutan siap untuk disuntikkan pada KCKT;
l) kerjakan juga blanko dengan pengerjaan seperti di atas.

A.8.3.6 Analisis contoh dengan KCKT

a) Siapkan alat KCKT dengan kondisi seperti di atas;
b) pompa fase gerak dengan kecepatan 1,5 mL/menit melalui kolom bondapak C18;
c) Program detektor fluorosensi mulai pada 370 nm eksitasi, 435 nm emisi untuk thiamin, setelah 10 menit set program waktu agar secara otomatis panjang gelombang fluorosensi berubah ke 370 nm eksitasi dan 520 nm emisi;
d) suntikan deret standar dan contoh dengan volume injeksi 50 µL.

A.8.3.7 Perhitungan

$$Csp = \frac{\frac{Asp}{Ast} \times Cst \times F}{W}$$

Keterangan:
F adalah volume pengenceran (mL);
Csp adalah konsentrasi contoh (mg/kg);
Asp adalah area contoh;
Ast adalah area standar;
Cst adalah konsentrasi standar (µg/mL);
W adalah bobot contoh (g).

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.8.4 Asam folat

A.8.4.1 Prinsip

Kandungan asam folat dalam produk makanan dan minuman dapat ditetapkan secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) detektor UV berdasarkan perbedaan afinitasnya terhadap fasa diam dalam kolom *reverse phase µBondapak C18* menggunakan fasa gerak campuran Asam asetat 2 % - asetonitril dengan perbandingan menggunakan system gradient dan sifat serapan molekulernya terhadap cahaya UV pada panjang gelombang 290 nm.

A.8.4.2 Peralatan

a) KCKT yang dilengkapi dengan
   Detektor : UV/DAD panjang gelombang 290 nm
   Kolom : µ Bondapak C18
   Kecepatan alir : 1,0 mL/menit
   Penyaring : whatman No. 42 dan millipore HV 0,45 um
   Volume injek : 20 uL
b) Neraca Analitik ± 0,1 mg;
c) Ultrasonik;
d) Peralatan gelas.
   Piala gelas 50 mL, Labu takar 100mL, 10 mL, Pipet volume 1mL, 5 mL dan 10 mL.

A.8.4.3 Pereaksi

a) Asam asetat;
b) Asetonitril;
c) Larutan fase gerak (Asam asetat 2 % - Asetonitril);
   pipet20 mL asam asetatlarutkan dengan akuabides hingga 1.000 mL. Saring larutan dan asetonitril secara terpisah melalui saringan 0.45 µm (*Millipore* dan *didegass* selama 5 menit di dalam ultrasonik).
d) Larutan KaliumHidroksida;
e) Buffer fosfat [Na_2HPO_4 (0.25 mol L^{-1})/KH_2PO_4 (0.37 mol L^{-1});
f) Trichloroacetic acid (TCA) (95 %);
g) Standar Asam Folat;
h) Larutan Standar Asam Folat 100 mg/L;
   timbang dengan teliti 10 mg standar asam folat, masukkan dalam labu takar 100 mL, kemudian larutkan dengan aquabides, kocok hingga larut dan impitkan hingga tanda tera.
i) Larutan standar asam folat 10 mg/L;
   pipet 10 mL standar asam folat 100 mg/L, masukkan ke dalam labu takar 100 mg/L, encerkan dan impitkan sampai tanda tera.
j) Larutan deret standar 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 dan 10 mL.
   pipet 0,1 mL, 0,3 mL, 0,5 mL, 1 mL, 3 mL, dan 5 mL larutan standar asam folat 10 mg/L, dan masukkan ke dalam masing-masing labu 10 mL. Encerkan dengan akuabides dan impitkan sampai tanda tera.
k) Akuabides

A.8.4.4 Cara kerja

a) Timbang kurang lebih 1 g contoh;
b) larutkan dalam asetonitril 4 mL hingga menghasilkan larutan;
c) tambahkan 3 mL KOH, kemudian aduk;
d) tambahkan larutan buffer phosphate 2 mL, aduk kembali;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

e) tambahkan 500 uL TCA 95 %;
f) larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL;
g) impitkan dengan menggunakan larutan buffer phosphate hingga tanda tera;
h) larutan dihomogenkan kemudian disaring menggunakan kertas saring berukuran pori-pori 0,2 μm sebelum diinjeksikan sebanyak 20 μL ke dalam sistem KCKT.

A.8.4.5 Perhitungan

Kandungan Asam Folat (mg/kg) dalam contoh dapat dihitung dengan rumus :

$$C\,sp = \frac{A\,sp - Intersept}{Slope} \times \frac{F}{Wsp} \times \frac{Vi\,st}{Vi\,sp}$$

Keterangan :
C sp adalah konsentrasi contoh;
A sp adalah area contoh;
F adalah volume pengenceran (mL);
W sp adalah bobot contoh (gram);
Vi st adalah volume standar yang diinjekkan (μL);
Vi sp adalah volume contoh yang diinjekkan (μL).
Intersept dan *slope* diperoleh dari linearitas kurva deret standar

A.9 Cemaran logam

A.9.1 Penetapan cemaran logam timbal (Pb) dan kadmium (Cd)

A.9.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C atau destruksi bertekanan menggunakan microwave yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakanalat SSA dengan panjang gelombang maksimal 283,3 nm untuk Pb dan 228,8 nm untuk Cd.

A.9.1.2 Peralatan

a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb), sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit;
b) tanur dengan ketelitian 1 °C;
c) neraca analitik dengan ketelitian0,1 mg;
d) penangas listrik;
e) penangas air;
f) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret;
g) labu takar 50 mL, 100 mL, dan 1.000 mL;
h) gelas ukur kapasitas 10 mL;
i) gelas piala 250 mL;
j) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 mL sampai dengan 100 mL;
k) wadah *polyprophylene*; dan
l) kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* sebesar (20-25) μgm.

A.9.1.3 Pereaksi

a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19);

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

c) larutan H_2O_2 30 %
d) larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu takar 1.000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
e) larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl 37 % dengan air suling dalam labu takar 1.000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
f) larutan baku 1.000 µg/mL Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu takar 1.000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1.000 µg/mL siap pakai. larutan baku 50 µg/mL Pb; dan
g) pipet 5,0 mL larutan baku 1.000 µg/mL Pb ke dalam labu takar 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.
h) larutan baku kerja Pb;
encerkan larutan standar 50 µg/mL sehingga didapatkan deret standar sesuai kadar analit dan rentang kerja alat, ke kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N di dalam labu takar 100 mL, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok
i) larutan baku 1.000 µg/mL Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu takar 1000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1.000 µg/mL siap pakai. larutan baku 200 µg/mL Cd;
j) pipet 10 mL larutan baku 1.000 µg/mL Cd ke dalam labu takar 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.
k) larutan baku 20 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 µg/mL Cd ke dalam labu takar 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/mL Cd.
l) larutan baku kerja Cd;
encerkan larutan standar 20 µg/mL sehingga didapatkan deret standar sesuai kadar analit dan rentang kerja alat, ke kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok

A.9.1.4 Cara kerja

A.9.1.4.1 Cara Pengabuan Kering

a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/ platina/ kuarsa (m);
b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 450 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu takar 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam wadah *polyprophylene*;
g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µgg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C), dan
k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.9.1.4.2 Cara destruksi bertekanan menggunakan *Microwave Digester*

a) Timbang contoh sebanyak 0,5-1 g dalam tabung *vessel* tertutup dan tambahkan 5 mL HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4) dan 2 mL H_2O_2 30%;
b) masukkan tabung yang sudah dikencangkan ke dalam alat *microwave digester*;
c) destruksi contoh dengan *microwave digester* sesuai program kerja alat untuk tepung terigu sampai sempurna, kemudian didinginkan;
d) masukkan ke dalam labu takar 25 mL, kemudian impitkan dengan aquabides dan kocok.
e) buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh;
f) baca absorbansi masing-masing larutan baku kerja, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
g) buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansidan sumbu X sebagai konsentrasi (dalam µg/mL);
h) plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi;
i) hitung kandungan Pb dan Cd dalam contoh

A.9.1.5 Perhitungan

Kandungan logam, (mg/kg) = $\frac{C}{m} \times V$

Keterangan:
C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);
V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.9.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.9.2 Penetapan cemaran logam merkuri (Hg)

A.9.2.1 Prinsip

Mereaksikan senyawa raksa dengan $NaBH_4$ atau $SnCl_2$ dalam keadaan asam guna membentuk gas atomik Hg dan diikuti dengan pembacaan absorbans menggunakan SSA tanpa nyala dengan panjang gelombang 253,7 nm.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.9.2.2 Pereaksi

a) Larutan pereduksi
   - Larutan $SnCl_2$
     Campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling. Dinginkan hingga suhu ruang, tambah 15 g NaCl, 15 g hidroksilaminsulfat, dan 25 g $SnCl_2$, impitkan hingga 500 mL atau dapat juga digunakan natrium borohidrida ($NaBH_4$).
   - Larutan $NaBH_4$
     Larutkan 3 g serbuk $NaBH_4$ dan 3 g NaOH dalam air suling dalam labu takar 500 mL.
b) Larutan pengencer
   Tambahkan 58 mL HNO_3 dan 67 mL H_2SO_4 ke dalam labu takar 1 L yang mengandung 300 mL - 500 mL air suling, tepatkan sampai tanda garis dengan air suling, dan kocok.
c) Larutan baku raksa
- Larutan baku 1000 mg/l
  Larutkan 0,1354 g $HgCl_2$ dalam 100,0 mL air suling.

d) Larutan kerja 1 mg Hg/l
   Encerkan 1 mL larutan baku 1000 mg/l dalam 1 L H_2SO_4 (larutan pengencer). Larutan kerja ini harus dibuat langsung sebelum digunakan.
e) Larutan baku standar yang mempunyai konsentrasi akhir 0 µg Hg/mL; 0,0025 µg Hg/mL; 0,005 µg Hg/mL; 0,01 µg Hg/mL; 0,02 µg Hg/mL.
f) H_2SO_4 18 N;
g) HNO_3 7 N;
h) Batu didih;
i) Campuran HNO_4 : $HClO_3$ (1:1);
j) H_2O_2 30 %
k) Larutan molibdat 2 %.

A.9.2.3 Peralatan

a) SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (“HVG”);
b) labu destruksi 250 mL berdasar bulat kapasitas 250 mL;
c) pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, kemudian dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm.
d) Labu takar 25 mL, 100 mL, 500 mL dan 1.000 mL;
e) Penangas listrik

A.9.2.4 Cara kerja

A.9.2.4.1 Cara pengabuan basah

a) Timbang 5 g contoh ke dalam labu destruksi, tambah 25 mL H_2SO_4 18 N, 20 mL HNO_3 7 N, 1 mL larutan natrium molibdat 2 % dan 5 batu didih - 6 batu didih;
b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;.
c) tambah 20 mL HNO_3 (1:1) melalui pendingin;
d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih, lanjutkan pemanasan selama 10 menit, kemudian dinginkan;
e) dengan hati-hati tambahkan10 mL air melalui pendingin sambil labu digoyang-goyangkan, didihkan lagi selama 10 menit, matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 3 kali 15 mL air suling, dinginkan sampai suhu kamar;
f) secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu takar 100 mL,encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

g) kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh
h) siapkan deret baku dengan konsentrasi akhir 0 µg/mL; 0,0025 µg/mL; 0,005 µg/mL;0,01 µg/mL dan 0,02 µg/mL Hg;
i) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan deret baku, larutan destruksi, dan larutan blanko pada alat “HVG”;
j) baca absorbansi larutan deret baku, larutan destruksi dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 m,
k) buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi dalam ppm dari pembacaan deret larutan baku kerja, hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.9.2.4.2 Cara destruksi bertekanan menggunakan *microwave digester*

a) Timbang 0,5 g sampai dengan 1 g contoh ke dalam tabung destruksi, tambah 4 mL HNO_3 dan 1 mL H_2O_2 tutup rapat dan masukkan ke dalam *microwave digester*. Kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat.
b) Secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu takar 25 mL, encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
c) Kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh. Siapkan deret baku dengan konsentrasi akhir 0 µg/mL; 0,0025 µg/mL; 0,005 µg/mL; 0,01 µg/mL dan 0,02 µg/mL Hg.
d) Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan deret baku, larutan destruksi, dan larutan blanko pada alat “HVG”.
e) Baca absorbansi larutan deret baku, larutan contoh dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.
f) Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi dalam ppm dari pembacaan deret larutan baku kerja.
g) Hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.9.2.5 Perhitungan

$$\text{Kadar Hg, (mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

Keterangan:
F adalah volume pengenceran
b adalah µg/mL dari kurva kalibrasi larutan deret baku Hg
W adalah bobot contoh (g).

A.9.3 Penetapan Cemaran Logam Timah (Sn)

A.9.3.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara destruksi bertekanan menggunakan *microwave digester* yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat SSA dengan panjang gelombang maksimal 286,3 atau 235,5 nm.

A.9.3.2 Peralatan

a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn), dapat menggunakan SSA Nyala ataupun SSA tungku grafit;
b) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
c) seperangkat alat microwave digester, dengan vessel berkapasitas 70-100 mL;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

d) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret;
e) labu takar 50 mL, 100 mL, dan 1.000 mL;
f) wadah *polyprophylene*; dan
g) kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* sebesar 20-25 µgm.

A.9.3.3 Pereaksi

a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19);
c) larutan baku 1.000 µg/mL Sn siap pakai;
d) larutan baku Sn 50 µg/mL
   isi labu takar 50 mL dengan 10-20 mL air, tambahkan 2,5 mL HCL pekat, kocok, biarkan hingga suhu ruang, tambahkan 2,5 mL larutan baku Sn 1.000 µg/mL, lalu encerkan hingga tepat tanda kocok, larutan ini stabil sedikitnya selama 1 minggu;
e) larutan baku Sn 1,0 µg/mL;
   isi labu takar 50 mL dengan 10-20 mL air, tambahkan 2,5 mL HCL pekat, kocok, biarkan hingga suhu ruang, tambahkan 1,0 mL larutan baku Sn 50 µg/mL, lalu encerkan hingga tepat tanda kocok,
f) larutan baku kerja Sn untuk SSA nyala;
   encerkan larutan standar 1.000 µg/mL sehingga didapatkan deret standar sesuai kadar analit dan rentang kerja alat, tambahkan 5 mL larutan HNO_3, 1 mL HCl , dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok.
g) larutan baku kerja Sn untuk SSA tungku grafit;
   encerkan larutan standar 1 µg/mL sehingga didapatkan deret standar sesuai kadar analit dan rentang kerja alat, tambahkan 5 mL larutan HNO_3, 1 mL HCl , dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok.
h) larutan modifier untuk GTA;
   - larutan Ammonium dihydrogen phosphate 10 %;
     larutkan 10,0 gram ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$) dalam 100 mL air
   - larutan Magnesium Nitrate (mengandung konsentrasi Mg 10 g/L);
     larutkan 10,5 gram magnesium nitrate hexahydrate (Mg(NO3)2.6H2O) dalam 100 mL air (atau bisa menggunakan larutan siap pakai);
   - pipet 2,5 mL larutan ammonium dihydrogen phosphate dan 0,25 mL larutan magnesium nitrate ke dalam labu takar 50 mL, tanbahkan 1 mL asam nitrat pekat dan encerkan dengan air hingga tanda lalu kocok;
   - bisa juga digunakan modifier sesuai petunjuk dari manual alat

A.9.3.4 Cara kerja

a) Timbang 0,2 g sampai dengan 0,5 g contoh ke dalam tabung destruksi (atau sesuai rekomendasi alat), tambah 5 mL HNO_3 dan 1 mL HCl, tutup rapat dan masukkan ke dalam alat *microwave digestor*. Kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat.
b) Secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu takar 50 mL, encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
c) Kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh.
   Siapkan deret baku dengan konsentrasi sesuai rentang kerja alat.
d) Baca absorbansi larutan deret baku, larutan contoh dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 286,3 atau 235,5 nm.
e) Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi dalam ppm dari pembacaan deret larutan baku kerja. Hitung kandungan Sn dalam contoh

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.9.3.5 Perhitungan

$$\text{Kadar Sn, (mg/kg), } w = \frac{a \times V \times 1.000 \times F}{E \times 1.000}$$

Keterangan
a adalah µg/mL dari kurva kalibrasi larutan deret baku Sn;
V adalah volume larutan hasil destruksi Contoh (mL)
E adalah bobot contoh awal (g)
F adalah factor pengenceran (=1 jika tanpa pengenceran)

A.10 Cemaran Arsen

A.10.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan $NaBH_4$ atau $SnCl_2$ sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

A.10.2 Peralatan

a) SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
b) labu destruksi 250 mL berdasar bulat kapasitas 250 mL;
c) pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, kemudian dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
d) Labu takar 25 mL, 25 mL, 100 mL, 500 mL dan 1.000 mL terkalibrasi.
e) Penangas listrik;.

A.10.3 Pereaksi

a) Natrium boronhidrida
Larutkan 3 g $NaBH_4$ dan 3 g NaOH dalam 500 mL air suling.
b) Asam klorida 8 M
Encerkan 66 mL HCl 37 % hingga 100 mL air suling.
c) Timah (II) klorida 10 %
Timbang 50 g $SnCl_2.2H_2O$ ke dalam gelas piala 200 mL. Tambah 100 mL HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih. Dinginkan, kemudian tuangkan ke dalam labu takar 500 mL dan impitkan dengan air suling.
d) Kalium iodida 20 %
Timbang 20 g KI ke dalam labu takar 100 mL, dan impitkan dengan air suling (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
e) Larutan standar induk arsen 1000 mg/l
Larutkan 1.3203 g As_2O_3 kering dalam sedikit NaOH 20 %, kemudian netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:3 (1 bagian asam: 3 bagian air). Masukkan ke dalam labu takar 1 L, dan impitkan dengan air suling.
f) Larutan baku arsen 100 mg/l
Pipet 10 mL larutan baku induk arsen 1000 mg/l ke dalam labu takar 100 mL, dan impitkan dengan air suling.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

g) Larutan baku arsen 1 mg/l (1 µg/mL)
Pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu takar 100 mL, dan impitkan dengan air suling.
h) Larutan deret standar arsen 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL;0,05µg/mL
Pipet 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL; dan 2,5 mL larutan baku arsen 1 µg/mL ke dalam labu
50 mL, dan impitkan dengan air suling (larutan harus dibuat baru).
i) HNO_3 pekat.
j) $HClO_4$ pekat.

A.10.4 Persiapan contoh

A.10.4.1 Cara pengabuan basah

a) Timbang 5 g contoh dalam labu destruksi dan tambahkan tambah 20 mL H_2SO_4 p.a dan
b) 15 mL HNO_3 p.a
c) Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambah lagi HNO_3 pekat sedikit demi sedikit hingga contoh berwarna coklat atau kehitaman.
d) Tambah 10 mL $HClO_4$ sedikit demi sedikit, panaskan lagi hingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 p.a)
e) Pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu takar 50 mL dan impitkan dengan air suling.

A.10.4.2 cara pengabuan kering

a) Timbang 5 g contoh dalam cawan, tambah 2,5 g $Mg(NO3)_2.2H_2O$ dan 25 mL HNO_3 pekat;
b) aduk dengan sempurna dan uapkan di atas penangas listrik hingga kering;
c) arangkan dalam tanur 500 °C selama 2 jam. Basahkan dengan HNO3 p.a. Uapkan lagi dan abukan lagi selama 1 jam pada 500 °C sampai didapat abu berwarna putih;
d) larutkan dengan larutan HCl 1:3 dan impitkan hingga 50 mL dengan air suling.

A.10.4.3 cara destruksi bertekanan menggunakan *microwave digester*

a) Timbang 0,5 g sampai 1 g contoh ke dalam tabung destruksi, tambah 2 mL HNO_3 dan 1 mL H_2O_2, tutup tabung dan masukkan ke dalam alat *microwave digester;*
b) kerjakan programnya sesuai dengan instruksi kerja alat;
c) setelah dingin, pindahkan secara kuantitatif larutan destruksi ke dalam labu takar 25 mL dan impitkan dengan air suling.

A.10.5 Cara kerja

a) Siapkan $NaBH_4$ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
b) pipet 25 mL larutan destruksi (dari persiapan contoh B.5.4.1; B.5.4.2 atau B.5.4.3), tambahkan 2 mL HCl 8 M dan 0,1 mL KI 20 % kemudian biarkan minimal 2 menit;
c) tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
d) tuangkan deret standar arsen 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
e) baca nilai absorbansi tertinggi dari standar dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
f) buat kurva standar dengan sumbu Y sebagai absorbansidan sumbu X sebagai konsentrasi;
g) hitung kandungan arsen dari contoh.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.10.6 Perhitungan

Kadar As, (mg/kg) = $\frac{F \times b}{W}$

Keterangan
F adalah volume pengenceran;
b adalah µg/mL dari kurva kalibrasi larutan deret baku As;
W adalah bobot contoh (g).

A.11 Deoksinivalenol

A.11.1 Prinsip

Ekstraksi Deoksinivalenol (DON) dengan air, ekstrak kemudian di *clean-up* dengan *immunoaffinitycoloum* (IAC) dan dikuantifikasi dengan menggunakan Kromatografi Cair Tingkat Tinggi (KCKT) dengan detector UV.

A.11.2 Peralatan

a) KCKT;
   1) LC pump dengan laju alir 1,0 mL/menit
   2) Injection system dengan syringe loading injection valve (50 – 300) µL loop atau setara
   3) LC column 4,6 mm x 25 cm, 5 µm, C18
   4) Detektor UV, panjang gelombang 220 nm
   5) Integrator/recorder
   6) Spektrofotometer UV
b) IAC untuk DON;
c) Neraca analitik;
d) High Speed Blender atau homogenizer;
e) Shaker atau magnetic stirrer, dengan kecepatan mencapai 500 per menit
f) Sentrifus dengan kekuatan 2500 g dan tabung sentrifus kapasitas 250 mL;
g) Vacuum Manifold;
h) Sonikator;
i) Vortex;
j) Nitrogen evaporator;
k) Labu takar;
l) Pipet 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, (25 -250) µL;
m) Erlenmeyer 250 mL;
n) Gelas ukur;
o) Corong;
p) Piala gelas;
q) Vial kaca berbagai ukuran;
r) Saringan serat kaca (Glass fibre filter);
s) Kertas saring; dan
t) Siring 2 mL.

A.11.3 Pereaksi

a) Aquabides;
b) Methanol LC grade;
c) Asetonitril LC grade;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

d) Asam asetat glacial;6yt
e) Polyethylene glycol (PEG), dengan masa molar sekitar 8.000 g/mol
f) Kalium klorida (KCl);
g) Kalium di-hidrogen fosfat (KH_2HPO_4);
h) Natrium klorida (NaCl);
i) Larutan HCl 0,1 M;
Encerkan 8,28 mL HCl pekat 37 % dengan air hingga volume 1 L;
j) NaOH 0,1 M;
Larutkan 4 g NaOH dalam 1 L air
k) Standar DON 1 mg;
l) Fase gerak kromatografi;
Campuran Aquabides : methanol : Asam asetat dengan perbandingan (85 :15 :0,1);
m) Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS);
timbang 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2HPO_4, 1,2 g disodium hydrogen fosfat anhidrat (atau 2,9 gram Na2HPO4.12H2O)dan 8 g NaCl. Larutkan dengan 900 mL aquabides. atur pH sampai 7,4 (tambahkan HCl 0,1 M atau NaOH 0,1M), dan tambahkan aquabides sampai volume 1000 mL, kemudian homogenkan. Bisa juga digunakan larutan PBS siap pakai yang komposisinya sama.
n) Larutan Pengencer
Campuran Air : methanol dengan perbandingan (90,5 : 9,5)
o) Larutan pencuci ;
Campuran Air : Methanol dengan perbandingan (50:50)
p) Larutan stok standar DON 1,25mg/mL(Standar 1);
Tambahkan 4 mL asetonitril ke dalam 5 mg Atau gunakan standar DON siap pakai. Simpan larutan stok ini pada -18 ˚C.
q) Larutan stok standar DON 250 µg/mL (Standar 2);
Encerkan 800 µL larutan stok standar 1,25 mg/mL denganasetonitril sampai volume 4 mL. Homogenkan.Simpan larutan stok ini pada -18 ˚C.
r) Larutan standar DON 25µg/mL (Standar A);
Encerkan 200 µL Larutan stok standar DON 250 µg/mL dengan asetonitril hingga volume 2 mL. Untuk mengetahui konsentrasi DON secara tepat, ukur dan catatkurva abrorpsi pada panjang gelombang (200 – 270) nm dengan interval 5 nm pada alat spektrofotometer terhadap asetonitril sebagai acuan. Tentukan panjang gelmbang dengan absorpsi maksimum, dan hitung konsentrasi DON dalam µg/mL menggunakan rumus :

$$Konsentrasi\ standar\ A(\mu g/mL) = \frac{Amax \times M \times 100}{\varepsilon \times b}$$

dimana

A_{max} adalah absorpsi yang diukur pada panjang gelombang maksimum;
M adalah masa molar dari DON (M=296,3 g/mol);
ε adalah koefisien absorpsi molar dari DON dalam asetonitril (681 m^2/mol)
b adalah lebar kuvet dalam cm

Hitung konsentrasi larutan standar 2 dengan dengan rumus :

$$Konsentrasi\ standar\ 2\ (\mu g/mL) = konsentrasi\ standar\ A \times 10$$

Larutan ini disimpan pada suhu -18 ˚C, stabil dalam 12 bulan, cek konsentrasi larutan setelah 6 bulan.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

s) Larutan standar DON 100 µg/mLuntuk *spiking*.
pipet larutan standar 2 yang mengandung 500 µg DON ke labu takar 5 mL, encerkan dengan asetonitril hingga tanda, simpan larutan pada suhu -18 ˚C.

t) Larutan standar DON 10 µg/mL (Standar B)
Pipet 500 µL larutan standar 100 µg/mL ke dalam labu takar 5 mL, encerkan dengan asetonitril hingga tanda,simpan larutan pada suhu -18 ˚C.

u) Larutan kalibrasi (deret standar);
Uapkan sejumLah standar B, lalu larutkan kembali menggunakan larutan pengencer atau fase gerak dalam labu takar 10 mL, tepatkan hingga tanda

Deret Standar	Larutan Standar B (µL)	Konsentrasi larutan deret standar (µg/L)	Konsentrasi Contoh yang ekivalen (µg/kg)
1	1.000	1.000	2.000
2	750	750	1.500
3	500	500	1.000
4	250	250	500
5	50	50	100

A.11.4 Cara Kerja

A.11.4.1 Ekstraksi contoh

a) Timbang dengan teliti 25 g dan 5 g PEG ke dalam tabung sentrifus;
tambahkan 200 mL air, homogenkan dengan kecepatan tinggi selama 3 menit menggunakan homogenizer; atau dapat juga menggunakan magnetic stirrer selama 30 menit dalam erlenmeyer yang tertutup (sebelumnya dikocok-kocok sebentar dengan tangan)
b) Sentrifus contoh selama 15 menit dengan kecepatan 2.500 g;
c) saring contoh menggunakan serat kaca (glass fibre);

A.11.4.2 *Clean-up* dengan IAC dan preparasi Contoh uji

a) Alirkan 2 mL ekstrak melewati kolom dengan kecepatan laju alir 1 tetes/detik;
b) cuci kolom dengan 5 mL PBS;
c) hilangkan sisa larutan dengan menggunakan mendorngkan udara melalui kolom;
d) larutkan DON dari kolom dengan mengalirkan 2 mL asetonitril atau metanol ke dalam reservoir kolom (sesuai instruksi kerja pada manual alat), biarkan eluen mengalir perlahan ke dalam kolom, lalu biarkan 1 menit sebelum mengelusi DON dari kolom dengan kecepatan 1 tetes per detik dan tampung ke dalam vial 4 mL atau tabung uji, lalu dengan hati hati lewatkan udara melalui kolom untuk menampung tetesan akhir;
e) kemudian uapkan ekstrak sampai kering dengan nitrogen evaporator pada suhu tidak lebih dari 50 ˚C;
f) Larutkan kembali ekstrak kering dengan 0,5 mL larutan pengencer, vortex selama 30 detik.

A.11.4.3 Pengukuran dengan KCKT

a) Atur KCKT sesuai kondisi pada A.15.2.a;
b) biarkan KCKT stabil selama 20 menit;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Profil Fase Gerak

Waktu (detik)	Kecepatan alir (mL/menit)	Fase Gerak (l) %	Larutan Pencuci (o) %
0-15	1	100	0
15-25	1	0	100
25-35	1	100	0

c) injeksikan 100-300 µL larutan standar DON 1.000µg/L; 750µg/L; 500 µg/L; 250 µg/L dan 50 µg/L;
d) injeksikan (100-300) µL eluat dari A.15.4.2.f. Identifikasi DON dengan membandingkan waktu retensi contoh dengan waktu retensi standar;
e) hitung konsentrasi contoh dengan mem-plot luas area peak Contoh ke dalam kurva kalibrasi standar.

A.11.5 Perhitungan

$$\text{DON (µg/kg)} = \frac{Cv \times ES \times FS}{FV \times W}$$

Keterangan :

Cv adalah konsentrasi DON dalam eluat dibandingkan dengan kurva standar (µg/L);
ES adalah volume ekstraksi (200 mL);
FV adalah volume filtrat yang diambil (2 mL);
FS adalah volume Contoh akhir (0,5 mL);
W adalah bobot contoh (g).

A.11.6 Ketelitian

- Kurva kalibrasi standar yang mempunyai persamaan linieritas Y = a + bX, harus mempunyai koefisien korelasi $R^2 \geq 0{,}998$;
- Pengujian duplo, % RPD ≤ 5 %
- Rekoveri *spiked sample* antara 75 sampai 120 %.

A.12 Ochratoksin A

A.12.1 Prinsip

Contoh uji diekstraks dengan ter-butil-etil etersetelah penambahanasam fosfat 0,5 M dalam larutan NaCl 2 M. Ekstrak diuapkan dan dilarutkan kembali dalam methanol dan *fosfat buffer saline* (PBS). Setelah dibebas-lemakkan dengan heksan, ekstrak diaplikasikan pada sebuah IAC yang mengandung antibodi spesifik untuk okratoksin A. Okratoksin dielusi darikolomdengan methanol. Okratoksin A kemudian ditetapkandengan KCKT dengan deteksi fluoresen yang diperkuat melibatkan reaksi *post-column* dengan ammonia.

A.12.2 Peralatan

a) KCKT;
   1). Sistem injeksi, kemampuan injeksi contoh 50-100 µl
   2). Pompa pase gerak

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

3). Oven column
4). Kolom pemisah KCKT fase terbalik analitik
5). Degasser
6). Detektor fluoresensi
7). Perekam data
8). Sistem post-column

b) Spekrometer UV dengan kuvet kuarsa;
c) Blender kecepatan tinggi atau Homogenizer;
d) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
e) Neraca kasar dengan ketelitian 0,1 g;
f) Pipet mikrokapasitas 100-1000 µL;
g) Pipet volumetri
h) Labutakar kapasitas 10, 50, dan 100 mL;
i) Labu dasar bulat (labu didih) kapasitas 100 mL;
j) Siring mikro kapasitas 25, 50, 100, 500, 1.000 µL;
k) Vial kaca;
l) Corong Pisah kapasitas 250 mL;
m) *Vortex Mixer*;
n) *Vacum manifold*;
o) Reservoirskapasitas 5, 20, 50 mL;
p) Sistem vacuum;
q) Kertas indicator pH 0-14;
r) Cooling centrifuge dan tabungnya, mencapai kekuatan 15.300 g pada suhu 4 ˚C;
s) Rotary evaporator dengan waterbath;
t) Kertas saring standar kromatografi dengan ukuran pori 20 µm sampai 25 µm;

A.12.3 Pereaksi

a) Gas helium murni yang dikompresi;
b) Nitrogen;
c) Disodium hidrogen fosfat, anhidrat atau $Na_2HPO_4.12H_2O$;
d) Kalium klorida;
e) Kalium dihidrogen fosfat;
f) Natrium klorida;
g) Sodium hidroksida;
h) Larutan ammonium hidroksida 25 %w dalam air (pereaksi *post-column*), hilangkan gas pada larutan menggunakan *degasser*;
i) Larutan asam hidroklorida, fraksi massa w(HCl) = 37 % dalam air;
j) Larutan asam fosfat, c(HCl) =0,1 mol/l;
k) Larutan asam hidroklorida, c(HCl)=0,1 mol/l;
larutkan 8,28 mL larutan asam hidroklorida (h) kedalam 1 liter air
l) Larutan sodium hidroksida, c(NaOH)=0,1 mol/l;
larutkan 4 g sodium hidroksida (f) kedalam 1 liter air;
m) Larutan *phospat buffer saline* (PBS);
larutkan 8,0 g sodium klorida (e), 1,2 g disodium hidrogen fosfat anhidrat atau 2,9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ (b), 0,2 g kalium dihidrogen fosfat (d) dan 0,2 g kalium klorida (c) dalam 900 mL air. Setelah pelarutan, atur pH sampai 7,4 dengan larutan asam hidroklorida (j) atau larutan sodium hidroksida (k) seperlunya kemudian encerkan kedalam 1 liter air. Alternatif lain, bias juga menggunakan larutanPBS komersial yang tersedia;
n) Campuran larutan asam fosfat 0,5 M dan natrium klorida 2 M;
Larutkan 118 g natrium klorida (f) dalam 900 mL air, tambahkan 33 mL asam fosfat, lau tepatkan hingga 1 L dengan air
o) Asam asetat glasial, w(CH3COOH) ≥ 98 %;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

p) Larutan asam asetat 9 %v
Tambahkan 90 mL asam asetat glacialke dalam 910 mL air, digunakan juga untuk fase gerak A;
q) Heksan
r) Metanol (*gradient grade*), digunakan jga sebagai fase gerak B;
s) Toluen;
t) Campuran methanol dan larutan asam asetat 9 %v;
Campurkan 72 bagian volume methanol dengan 28 bagian volume larutan asam asetat 9% (q);
u) Ter-butil metil eter;
v) Campuran toluene dan asam asetat glacial;
Campurkan 99 bagian volume toluenedengan 1 bagian volume asam asetat glacial;
w) IAC;
x) Okratoksin A, dalam bentuk Kristal atau sebagai film dalam ampul;
y) Larutan stok okratoksin A;
larutkan 1 mg okratoksin A atau isi 1 ampul (jika okratoksi A diperoleh sebagai sebuah film) dalam campuran toluene dan asam asetat glacial (v) untuk meperoleh larutan yang mengandung kira-kira 10 µg/mL okratoksin A.
Untuk menentukan konsentrasi yang pasti, catat kurva absorbsi pada panjang gelombang 300 nm sampai 370 nm dengan interval 5 nm dalam sel kuarsa 1 cm dengan campuran pelarut (v) sebagai acuan menggunakan spektometer. Identifikasi panjang gelombang yang menghasilkan absorbsi maksimum, lalu hitung konsentrasi ochratoxin A (ota) dalam µg/mL dengan rumus :

$$ota\ (\mu g/mL) = \frac{A_{max} \times M \times 100}{\varepsilon \times b}$$

dimana

A_{max} adalah absorpsi yang diukur pada panjang gelombang maksimum;
M adalah masa molar dari ota (M=403,8 g/mol);
ε adalah koefisien absorpsi molar dari ota dalam campuran pelarut (v) (544 m^2/mol)
b adalah tebal kuvet dalam cm

Larutan ini disimpan pada suhu -18 ºC, stabil dalam 12 bulan, cek konsentrasi larutan setelah 6 bulan.

z) Larutan standar okratoksin A.
pipet sejumLah volume larutan stok ochratoksin A yang mengandung okratoksin A kedalam labu takar 10 mL, encerkan dengan campurantoluen dan asam asetat glasial (v) sampai tanda tera, homogenkan. Larutan ini mengandung 40 µg/L okratoksin A. Simpan larutan ini dalam freezer pada suhu kira-kira -18 ºC. Biarkan mencapai suhu ruang sebelum dibuka. Larutan yang disimpan dengan cara ini biasanya stabil sampai 12 bulan. Periksa konsentrasi larutan setelah 6 bulan.

aa) Larutan spike okratoksin A; dan
pipet sejumLah volume larutan stok (y) yang mengandung 2,5µgokratoksin A kedalam labu takar 50 mL, encerkan dengan campuran toluen dan asam asetat glasial (v) sampai tanda tera, homogenkan.Larutan ini mengandung 50 µg/L okratoksin A. Simpan larutan ini dalam freezer pada suhu kira-kira -18 ºC. Biarkan mencapai suhu ruang sebelum dibuka. Larutan yang disimpan dengan cara ini biasanya stabil sampai 12 bulan. Periksa konsentrasi larutan setelah 6 bulan.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.12.4 Cara Kerja

A.12.4.1 Ekstraksi contoh

a) Aduk Contoh hingga homogeny sebelum ditimbang;
b) Timbang (25 ± 0,1) g contoh uji dalam bentuk *slurry*dan masukkan kedalam tabung sentrifus;
c) tambahkan 100 mL campuran larutan asam fosfatdan larutan natrium klorida (n); kocok menggunakan vortex mixer selam 1 menit, tambahkan 50 mL TBME, kocok menggunakan *high speed blender* selama 2 menit, sentrifus selama 10 menit pada 15.300 g dengan pendinganan 4 ºC.
d) pindahkan lapisan atas pelarut organic ke Erlenmeyer asah atau gelas ukur, ekstrak kembali dengan 50 mL TBME, kocok lagi dengan blender selama 2 menit, sentrifus selama 10 menit pada 15.300 g dengan pendinganan 4 ºC, ambil kembali lapisan atas dan gabungkan dengan hasil ekstrak yang pertama;
e) larutan ekstrak dipindahkan ke labu didih dan evaporasi pada (35-40 ºC menggunakan rotary evaporator sampai tidak ada lagi pelarut yang menguap. Larutkan kembali residu dengan campuran methanol dan PBS (15 : 85) dengan cara membilas labu dengan 3 mL methanoldan pindahkan ke corong pisah menggunakan pipet Pasteur, lakukan 2 kali pembilasan labu dengan 3 mL methanol. Encerkan larutan ekstrak dengan 34 mL PBS, kocok dengan kuat larutan ekstrak pada corong pisah selama 1 menit.
f) Tambahkan 50 mL heksan ke dalam corong pisah, kocok lagi selama 1 menit, biarkan sampai lapisan terpisah, tuang lapisan bawah ke corong pisah yang lain, buang lapisan heksan yang berada pada bagian atas. Ulangi lagi dengan 50 mL heksana, kocok, lalu ambil lapisan bawah, pindahkan ke tabung sentrifus, sentrifus selama 10 menit pada 15.300 g pada suhu 4 ºC supaya untuk memisahkan residu lemaknya. Saring larutan ekstrak menggunakan kertas saring ke dalam gelas ukur.

A.12.4.2 *Clean UpIAC*

a) Hubungkan IAC dengan *vacuum manifold*, pasangkan reservoir dengan kapasitas 50 mL atau 20 mL ke IAC;
b) Biarkan kolom mencapai suhu kamar untuk pengkondisian. Kondisikan kolom dengan mengalirkan 20 mL PBS dari bagian atas kolom, biarkan mengalir dengan kecepatan 2-3 mL/menit dengan gravitasi. Pastikan masih ada PBS tersisa larutan Contoh diaplikasikan;
c) Pindahkan 30 mL larutan ekstrak ke reservoir dan lewatkan pada IAC dengan kecepatan alir tidak lebih dari 3 mL/menit. Biarkan larutan mengalir dengan gravitasi;

A.12.4.3 Persiapan larutan contoh uji

a) Cuci kolom dengan 10 mL air, lepaskan reservoir, hilangkan air yang tersisa pada bagian atas kolom dengan kertas saring, keringkan kolom denan mem-vakum selama 1 menit atau meniupkan udara menggunakan siring;
b) Pasang reservoir dengan kapasitas 5 mL;
c) Lewatkan 4 mL methanol melalui kolom dengan gravitasi sampai elusi satu tetes, tutup *luer lock,* biarkan 1 menit , perlahan elusikan ochratoxin A dari kolom ke tabung kaca, dorongkan udara untuk memastikan tidak ada pelarut yang tersisa pada IAC;
d) uapkan hasil elusi IAC sampai kering dalam kondisi nitrogen;
e) larutkan kembali dengan 300 µLcampuran methanol dan asam asetat (t) dan pindahkan kedalam vial kaca atau ke vial autosampler jika diguanakan KCKT de;
f) pindahkan ke vial KCKT dengan systeminjeksi otomatis;

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.12.4.4 Prosedur *spiking*

a) Timbang (25 ± 0,1) g blanko matriks dalam bentuk slurry dalam tabung sentrifus, tambahkan 40 µL Larutan spiking Ochratoksin A (aa);
b) biarkan pelarut menguap dalam lemari asam selama 2 jam
c) lanjutkan seperti A.16.4.1 (c) ;

A.12.4.5 Persiapan Larutan Kalibrasi (Deret Standar) untuk KCKT

a) Siapkan 5 larutan kalibrasi KCKT dengan memipet sejumLah standar okratoksin A 40 µg/mL (z) sesuai dengan yang tertera pada table ke dalam vial kaca, evaporasikan pelarut menggunakan system evaporasi dengan nitrogen pada suhu kamar hingga kering;

Deret Standar	Larutan Standar OTA (z) µL	Konsentrasi akhir OTA dalam larutan kalibrasi (µg/L)
1	25	1,00
2	50	2,00
3	125	5,00
4	250	10,00
5	375	15,00

b) ke dalam tiap vial tambahkan 1 mL larutan campuran methanol dan asam asetat (t), tutup vial lalu kocok dalam vortex mixer, lindungi larutan dari cahaya dan simpan dalam freezer pada suhu -18 ºC, cek stabilitas larutan sebelum digunakan kembali;

A.12.4.6 Kondisi operasi KCKT

Kondisi Gradien :

Waktu (menit)	Kecepatan alir (mL/menit)	Fase Gerak A (%)	Fase Gerak B (%)
0	1	40	60
10	1	0	100
11	1	40	60
30	1	40	60

- suhu kolom oven 50 ± 1 ºC
- Volume injeksi 50 µL
- Suhu autosampler 15 – 20^{o}C
- Kecepatan alir larutan ammonium hidroksida 0,2 mL/menit

A.12.5 Penetapan Okratoksin A

a) Injeksikan 50 µL masing-masing larutan deret standar, plot peak area terhadap massa okratoksin A, cek linearitas kurva;
b) Injeksikan 50 µL larutan Contoh dengan kondisi yang sama seperti standar. Identifikasikan peak okratoksin A dengan membandingkan waktu retensi Contoh dengan standar;
c) Konsentrasi contoh harus berada dalam range konsentrasi standar, bila konsentrasi berada di luar range konsentrasi standar, bisa dibuat deret standar dengan konsentrasi yang sesuai atau bisa dilakukan pengenceran pada contoh.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

A.12.6 Interpretasi Hasil

Kadar Okratoksin A dalam larutan uji dihitung menggunakan persamaan garis kurva kalibrasi baku okratoksin A, dihitung dalam µg/kg dengan rumus :

$$\text{okratoksin A (µg/kg)} = ma \times \frac{V1 \times V3 \times V5}{V2 \times V4 \times V6 \times ms}$$

Keterangan:

ma adalah jumlah massa okratoksin A dalam nano gram dalam contoh uji yang diperoleh dari perhitungan menggunakan kurva kalibrasi;
V1 adalah volume TBME dalam mL (100 mL);
V3 adalah volume total ekstrak dalam campuran PBS dan methanol dalam mL (40 mL);
V5 adalah volume larutan contoh dalam µL (300 µL)
V2 adalah volume aliquot TBME yang dikeringkan sebelum dilarutkan kembali dengan campuran PBS dan methanol dalam mL (75 mL);
V4 adalah volume ekstrak dalam campuran PBS dan methanol yang diaplikasikan dalam IAC dalam mL (30 mL);
V6 adalah volume larutan uji yang diinjeksikan ke dalam kolom dalam µL (50 µL)
ms bobot contoh awal dalam gram (25 g)

A.12.6 Ketelitian

- Pengujian duplo, % RPD ≤ 5 %
- Rekoveri *spiked sample* antara 80 % sampai 120 %.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Bibliografi

[1] AOAC 923.03 Ash of Flour. Direct Method. Final Action

[2] AOAC 939.05. Fat Acidity-Grains, Titrimetric Method, Final Action, Codex Adopted-AOAC Method.

[3] AOAC 976.13.Alpha amylase in flour, meal,, malted cereals. Falling Number (FN) Determination Method. Final Action 1994. AACC-AOAC Method

[4] AOAC 965.22. Shorting Corn Grits, Shieving Method. Final Action 1966.

[5] AOAC 999.10. *Lead, Cadmium*, Zinc, Copper, and Iron in food. Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave digestion. Final Action 2005, NMKL-AOAC Method

[6] AOAC 999.11. *Lead, Cadmium*, Zinc, Copper, and Iron in food. Atomic Absorption Spectrophotometry after dry ashing. Final Action 2005, NMKL-AOAC Method

[7] AOAC 969.32. *Zinc in food. Atomic Absorption Spectrophotometry Method. Final Action 1971*

[8] AOAC 971.21. *Mercury in food. Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry Method. Final Action 1976.*

[9] AOAC 986.15. Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Food. Multielement Method. Final Action 1988. Codex adopted-AOAC Method

[10] *Boen, T.R., Soeiro, B. T., Pereirafilho, E. R, Pallone-Lima, J. A. . Journal of the Brazilian Chemical Society, vol.19 no.1 Sao Paulo 2008. Folic Acid and Iron Evaluation in Brazilian Enriched Corn and Wheat Flours*

[11] BS-EN 15764. 2010.*Foodstuff-Determintation of Trace Element-Determination of tin by Flame and Graphite Furnace AAS after pressure digestion*.

[12] BS EN 15835. 2010. *Foodstuffs-Determination of ochratoxin A in cereal based foods for infants and young children- KCKT method with immunoaffinity colum cleanup and fluorescence detection*

[13] BS EN 15891. 2010. *Foodstuffs. Determination of deoxynivalenol in cereals, cereal products and cereal based foods for infants and young children. KCKT method with immunoaffinity column cleanup and UV detection*

[14] Codex Stan 152-1985 *Standards for Wheat Flour*.

[15] *Guidelines on food fortification with micronutients. 2006. Part III. Fortificants: physical characteristics, selection and use with specific food vehicles. Chapter 5 and 6. Page 95-134. Lindsay Allen, Bruno de Benolst, Omar Dary and Richard Hurrell. WHO and FAO of the United Nation.*

[16] ISO 11050. *Wheat Flour-Determination of impurities of animal origin*. Final Edition 1993

[17] *Sims & Shoemaker. Journal of AOAC International Vol 76, No 5.1993. Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Thiamin and Riboflavin in selected Food.*

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

[18] Undang-Undang Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.

[19] Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.

[20] Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan.

[21] Undang-Undang Nomor 3 Tahun 2014 tentang Perindustrian.

[22] Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2014 tentang Standardisasi dan Penilaian Kesesuaian.

[23] Peraturan Pemerintah Nomor 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.

[24] Peraturan Pemerintah Nomor 102 Tahun 2000 tentang Standardisasi Nasional.

[25] Peraturan Pemerintah Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.

[26] Peraturan Menteri Perindustrian Nomor 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.

[27] Peraturan Menteri Perindustrian Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).

[28] Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 033 Tahun 2012, tentang Bahan Tambahan Pangan.

[29] Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK. 00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

[30] Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 4 sampai 25 dan Nomor 36 sampai 38 Tahun 2013, Nomor 4 Tahun 2014 dan Nomor 22 Tahun 2016 tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan.

[31] Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 16 Tahun 2016 tentang Kriteria Mikrobiologi Dalam Pangan Olahan.

[32] Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 21 Tahun 2016 tentang Kategori Pangan.

[33] Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 23 Tahun 2017 tentang Batas Cemaran Logam Berat dalam Pangan Olahan.

[34] Peraturan Kepala Badan Standardisasi Nasional No. 2 Tahun 2017 tentang Tata Cara Penggunaan Tanda SNI dan Tanda Kesesuaian Berbasis SNI.

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International

Informasi pendukung terkait perumus standar

[1] Komtek/SubKomtek perumus SNI

Komite Teknis 67-04, Makanan dan Minuman

[2] Susunan keanggotaan Komtek perumus SNI

Ketua	: Enny Retnaningtyas	Dit. IMHLP - Kemenperin
Sekretaris	: Miranti Rahayu	BPPI - Kemenperin
Anggota	: Jef Rinaldi	Dit. IMHLP - Kemenperin
	Andriani Z	Dit. IMHLP - Kemenperin
	Ericha Fatma Yuniati	Dit. IMHLP - Kemenperin
	A. Basrah Enie	Pusat Layanan Informasi Industri Pangan
	Djoko Setyono	Konsumen
	Deksa Presiana	BPOM
	Jenny Elisabeth	Wilmar Group
	Roch Ratri Wandasari	GAPMMI
	Cahyo Konstitusianto	PT. Indofood CBP Sukses Makmur
	Haniwar	Asosiasi Pengolahan Daging Indonesia
	Ning Ima Arie Wardayanie	BBIA - Kemenperin
	Dianawati	Dit. SPK - Kemendag
	Anna Maria	AP5I

[3] Konseptor rancangan SNI

Rika Agita Sari
Balai Besar Industri Agro

[4] Sekretariat pengelola Komtek perumus SNI

Pusat Standardisasi Industri - Badan Penelitian dan Pengembangan Industri
Kementerian Perindustrian

Hak cipta Badan Standardisasi Nasional, Copy standar ini dibuat oleh BSN untuk Nutrition International