



Research Paper

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE IDENTIFICATION OF
CARBOHYDRATE AND PROTEIN CONTENT IN PACKAGED CHOCOLATE
BEVERAGES****(IDENTIFIKASI KANDUNGAN KARBOHIDRAT DAN PROTEIN SECARA KUALITATIF DAN
KUANTITATIF PADA MINUMAN COKELAT BUBUK KEMASAN)****Riong Seulina Panjaitan¹*, Violetta Djohansah², Anisah Septiyani³, Kristian
Darius Ardian⁴, Laila Safa Asriyanti⁵**

Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta Utara, Indonesia, 14350.

*Correspondence: riongpanjaitan@yahoo.co.id.Received: 1st July 2023; Accepted: 10th July 2023; Published: 23rd July 2023

Abstract: (1) Background: Cocoa beans are known to contain the flavonoid epicatechin, which acts as an antidiabetic agent that helps lower the body's blood sugar levels. However, the production of packaged cocoa powder drinks, mixed with other ingredients such as sugar and powdered cream milk, diminishes its pharmacological effects. In this study, the identification of carbohydrate and protein content in packaged cocoa powder drinks sold in the community was conducted. The aim of this research was to identify and measure the carbohydrate and protein content present in six samples (samples A, B, C, D, E, and F) of commercial cocoa powder drinks. (2) Method: Qualitative identification tests for carbohydrates included the Molisch, iodine, Benedict, Barfoed, Selliwanof, and osazone tests. Meanwhile, quantitative identification tests for carbohydrates were conducted using the Dinitrosalicylic acid (DNS) method. For qualitative identification of proteins, the biuret, ninhydrin, xanthoprotein, sulfur, and neuman tests were employed. Additionally, quantitative identification of proteins was carried out using the Lowry method. (3) Results: In the qualitative test for carbohydrates, samples C, D, and F showed positive results in all five test methods, namely the Molisch, iodine, Benedict, Barfoed, and Selliwanof tests, while they were negative in the osazone test. For the qualitative protein test, all six samples showed positive results for the sulfur test and negative results for the xantoprotein and neuman tests. As for the quantitative carbohydrate testing, Sample A had the lowest reducing sugar content with a value of 1.817 mg/mL, while Sample F had the highest reducing sugar content with a value of 3.788 mg/mL. Furthermore, in the quantitative protein testing, Sample A had the lowest protein content with a value of 0.0018 mg/mL, while the highest protein content was found in Sample F, with a value of 0.024 mg/mL.

Keywords: chocolate drink, DNS method, lowry method

Abstrak: (1) Latar Belakang: Biji kakao diketahui mengandung flavonoid epicatechin yang bertindak sebagai antidiabetes yang membantu menurunkan kadar gula darah tubuh, namun pembuatan minuman cokelat bubuk kemasan yang telah dicampurkan dengan bahan lain seperti gula dan susu bubuk krim membuat efek farmakologinya menurun. Pada penelitian ini, dilakukan identifikasi kandungan karbohidrat dan protein pada minuman cokelat bubuk kemasan yang dijual di masyarakat. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengukur kandungan karbohidrat dan protein yang terdapat dalam enam sampel (sampel A, B, C, D, E, dan F) minuman cokelat bubuk komersial. (2) Metode: Uji identifikasi kualitatif karbohidrat yang dilakukan meliputi uji molisch, iodin, benedict, barfoed, selliwanof dan osazon. Kemudian, untuk uji identifikasi kuantitatif karbohidrat dengan menggunakan metode *Dinitrosalicylic acid* (DNS). Sedangkan untuk uji identifikasi kualitatif protein meliputi uji biuret, ninhidrin, xantoprotein, sulfur dan neuman. Kemudian, untuk uji identifikasi kuantitatif protein dengan menggunakan metode Lowry. (3). Hasil: Pada uji kualitatif karbohidrat, sampel C, D, dan F menunjukkan

hasil positif pada kelima metode uji yaitu uji molisch, iodin, benedict, barfoed, dan sellivanof sedangkan negatif pada uji osazon. Untuk uji kualitatif protein, keenam sampel menunjukkan hasil positif untuk uji sulfur dan negatif untuk uji xantoprotein dan neuman. Sedangkan pada pengujian kuantitatif karbohidrat, Sampel A memiliki kadar gula pereduksi terendah dengan nilai 1,817 mg/mL sedangkan sampel Sample F memiliki kadar gula pereduksi tertinggi dengan nilai 3,788 mg/mL. Selanjutnya, pada pengujian kuantitatif protein, Sampel A memiliki kadar protein terendah dengan nilai 0,0018 mg/mL sedangkan kadar protein tertinggi terdapat pada sampel F sebesar 0,024 mg/mL.

Kata kunci: minuman cokelat, metode DNS, metode lowry

1. Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao*, L.) merupakan salah satu komoditi hasil perkebunan Indonesia yang dapat diolah menjadi produk kakao dan cokelat yang mengandung antioksidan alami [1]. Bubuk kakao merupakan produk olahan dari biji kakao yang diubah bentuknya menjadi bubuk [2]. Menurut BPOM, [3,4] Kakao bubuk adalah produk berbentuk bubuk yang dihasilkan dari pengurangan lemak yang terkandung pada kakao massa (*cocoa liquor*) dan pencetakan menjadi *cocoa cake* yang selanjutnya dihancurkan dan dihaluskan menjadi kakao bubuk. Bubuk cokelat tersebut diolah melalui serangkaian proses, mulai dari pengeringan, penyangraian, alkalisasi, pengeluaran kulit ari, penggilingan, dan pemisahan antara lemak dan bungkil kakao [3]. Salah satu produk dengan bahan baku kakao yang sedang berkembang dan cukup digemari oleh masyarakat luas adalah minuman cokelat [5]

Minuman cokelat banyak digemari oleh berbagai kalangan usia. Jenis olahan produk cokelat saat ini semakin beragam, mulai dari bentuk minuman, permen, cokelat batang dan sebagainya [6]. Namun, jenis olahan yang paling digemari oleh anak-anak, yaitu cokelat yang dibuat dalam bentuk minuman atau biasa disebut minuman cokelat [7, 8]. Minuman bubuk cokelat sachet dapat langsung diseduh dalam satu gelas sehingga memudahkan konsumen dalam mengkonsumsinya [9]. Biasanya komposisi dari bubuk cokelat adalah 30% kakao bubuk dan 70% gula, namun dapat dilakukan variasi dengan penambahan susu bubuk untuk menambah citarasa bubuk cokelat 3in1. Penambahan susu bubuk pada dasarnya dilakukan dalam pembuatan minuman coklat, sebagai sumber protein yang berasal dari protein hewani [7]. Pada protein hewani terdapat kandungan lemak yang cukup tinggi, sehingga perlu dilakukan modifikasi pada proses pembuatan coklat dengan mensubstitusi kandungan lemak pada susu bubuk menjadi sumber protein nabati [10, 11].

Seiring berkembangnya teknologi, semakin beragam jenis bahan yang digunakan dalam pembuatan minuman cokelat bubuk, baik dari bahan baku maupun campurannya [10]. Sehingga mendorong konsumen selektif dalam menentukan pilihan minuman cokelat yang akan dikonsumsi [12,13]. Salah satunya dengan memperhatikan aspek nilai gizi yang terkandung dalam produk tersebut karena hal tersebut erat kaitannya dengan kesehatan tubuh [14]. Berkaitan dengan nilai gizi suatu produk khususnya minuman cokelat, pastinya tidak terlepas dari kandungan protein dan karbohidrat dalam suatu sajian [15, 16]. Penentuan kandungan protein dan karbohidrat dalam sebuah produk minuman, dapat dilakukan dengan langkah pengidentifikasian secara kualitatif dan kuantitatif.

Berdasarkan pemaparan di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan karbohidrat dan protein serta menghitung kadarnya yang terkandung di dalam bubuk minuman cokelat pada keenam sampel minuman bubuk cokelat kemasan yang umum dikonsumsi di masyarakat.

2. Hasil

Dari hasil pengujian enam buah minuman cokelat bubuk kemasan yang dijual di pasaran, baik uji kualitatif dan kuantitatif karbohidrat dan protein, diperoleh hasil sebagai berikut:

2.1 Hasil Uji Kualitatif Kandungan Karbohidrat pada Minuman Cokelat Bubuk Kemasan

Tabel 1. Hasil Uji Kualitatif Kandungan Karbohidrat.

No	Sampe l	Metode Uji Identifikasi					
		Molish	Iodin	Benedict	Barfoed	Seliwanof	Osazon
1.	A	-	+	-	-	+	-
2.	B	-	+	-	-	+	-
3.	C	+	+	+	+	+	-
4.	D	+	+	+	+	+	-
5.	E	+	+	+	+	+	-
6.	F	-	+	-	-	+	-

Dari Tabel (1) di atas diketahui bahwa semua sampel (A, B, C, D, E, dan F) memberikan hasil positif (+) pada uji iodin dan seliwanof tetapi memberikan hasil negatif pada uji osazon.

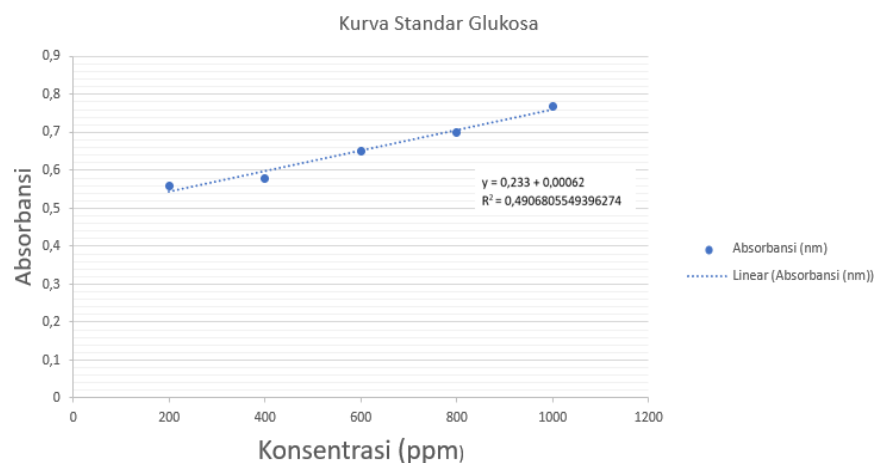
2.2 Hasil Uji Kualitatif Kandungan Protein pada Minuman Cokelat Bubuk Kemasan

Tabel 2. Hasil Uji Kualitatif Kandungan Protein

No.	Sampel	Metode Uji Identifikasi				
		Biuret	Ninhidrin	Xantoprotein	Sulfur	Neuman
1.	A	-	-	-	+	-
2.	B	-	-	-	+	-
3.	C	+	+	-	+	-
4.	D	-	+	-	+	-
5.	E	+	+	-	+	-
6.	F	-	-	-	+	-

Dari Tabel (2) di atas diketahui bahwa semua sampel (A, B, C, D, E, dan F) memberikan hasil positif (+) pada uji sulfur tetapi memberikan hasil negatif pada uji xantoprotein dan neuman.

2.3 Hasil Uji Kuantitatif Kandungan Karbohidrat Dengan Metode DNS



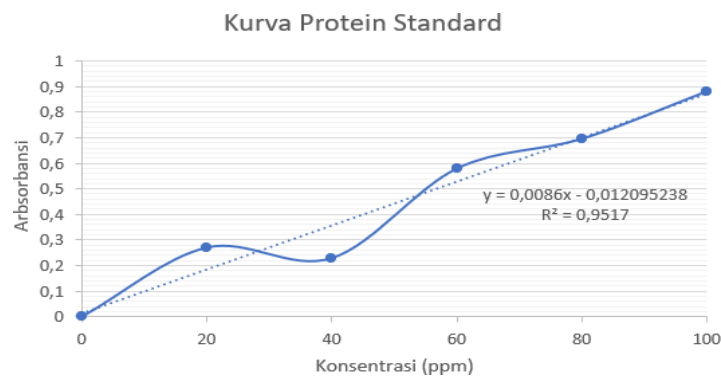
Gambar 1. Kurva Standar Glukosa

Tabel 3. Penentuan Kadar Gula Pereduksi Pada Sampel Minuman Cokelat Bubuk Kemasan

No.	Sample	Nilai Absorbansi (nm)	Kadar gula pereduksi (mg/mL)
1	Sample A	0,424	1,817
2	Sample B	0,598	2,563
3	Sample C	0,634	2,718
4	Sample D	0,768	3,293
5	Sample E	0,859	3,684
6	Sample F	0,872	3,788

Dari Tabel (3) di atas diketahui bahwa kadar gula pereduksi tertinggi dikandung pada sampel F (3,788 mg/mL) sedangkan nilai terendah terdapat pada sampel A sebesar 1,817 mg/mL.

2.4 Uji Kuantitatif Kandungan Protein Dengan Metode Lowry

**Gambar 2.** Kurva Standar Protein**Tabel 4.** Tabel Absorbansi dan Kadar Protein Sampel

No	Sampel	Nilai Absorbansi (nm)	Kadar Protein (mg/mL)
1.	A	2,31	0,018
2.	B	2,824	0,019
3.	C	2,553	0,022
4.	D	2,553	0,023
5.	E	2,585	0,023
6.	F	2,174	0,024

Dari Tabel (4) di atas diketahui bahwa kadar protein tertinggi dikandung pada sampel F (0,024 mg/mL) sedangkan nilai terendah terdapat pada sampel A sebesar 0,018 mg/mL.

3. Pembahasan

3.1 Kandungan Karbohidrat pada Minuman Cokelat Bubuk Kemasan

Pada tahap preparasi sampel, sampel minuman cokelat bubuk kemasan dilarutkan dengan air panas yang bertujuan supaya molekul air dapat bergerak lebih cepat daripada partikel cokelat, menyebabkan bubuk cokelat larut sempurna [6].

Hasil Uji Molisch

Pereaksi molisch terdiri dari α -naftol dalam alkohol yang akan bereaksi dengan furfural membentuk senyawa kompleks berwarna ungu yang disebabkan oleh daya dehidrasi asam sulfat pekat terhadap karbohidrat dan akan membentuk cincin berwarna ungu pada larutan glukosa, sukrosa, laktosa, maltosa, arabinosa, dan selulosa. Tujuan ditambahkannya asam sulfat pekat adalah untuk menghidrolisis ikatan pada sakarida agar menghasilkan furfural [7]. Hasil uji pada sampel C, D, dan E menunjukkan hasil positif, yang menandakan keberadaan karbohidrat dalam larutan yang diuji. Sebaliknya, respons negatif pada sampel A, B, dan F.

Hasil Uji Iodin

Pada prinsip uji iodine berguna untuk menentukan adanya gugus polisakarida dan untuk mengetahui pembentukan kompleks pati-iodium. Jika suatu senyawa mengandung polisakarida dan ditambah dengan iodine, maka akan membentuk kompleks adsorpsi berwarna yang spesifik. Hasil pengujian menunjukkan bahwa, sampel A, B, C, D, E, dan F membentuk warna biru kehitaman menunjukkan karbohidrat golongan polisakarida (pati) [18].

Hasil Uji Benedict

Uji Benedict bertujuan mengidentifikasi gula pereduksi, dimana gugus pereduksinya merupakan aldehid dan keton. Prinsipnya adalah larutan CuSO_4 dalam suasana alkali direaksikan dengan gula pereduksi sehingga Cu^{2+} tereduksi menjadi Cu^+ berwarna merah bata. Fungsi dari CuSO_4 adalah sebagai oksidator yang bersifat basa lemah dan fungsi Na-sitrat adalah sebagai zat pencegah pembentukan Cu(OH)_2 .

Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampel C, D, dan E membentuk kompleks warna hijau kebiruan dengan endapan (coklat), sedangkan sampel A, B, dan F hanya terbentuk warna hijau kebiruan tanpa adanya endapan. Berdasarkan identifikasi secara kualitatif, senyawa yang diperoleh pada sampel C, D, dan E termasuk karbohidrat golongan monosakarida dan pada sampel A, B, dan F termasuk karbohidrat golongan disakarida (sukrosa) [1].

Hasil Uji Barfoed

Uji barfoed memiliki prinsip yang sama seperti dengan uji benedict yaitu reduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ oleh karbohidrat yang mengandung aldehid dan keton bebas. Hasil pengujian menunjukkan bahwa hanya sampel C, D dan E yang membentuk senyawa kompleks berwarna merah di dasar tabung sedangkan pada sampel A, B, dan F tidak terbentuk warna merah di dasar tabung. Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa yang diperoleh pada sampel C, D dan E termasuk dalam karbohidrat golongan monosakarida dan pada sampel A, B, dan F termasuk dalam karbohidrat golongan disakarida [5].

Hasil Uji Seliwanoff

Uji seliwanooff bertujuan membuktikan adanya ketosa (fruktosa), dengan prinsip konversi fruktosa menjadi asam levulinat dan hidroksimetilfurfural yang kemudian dikondensasikan dengan resorsinol. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampel A, B, C, D, E, F membentuk senyawa kompleks berwarna merah oranye. Berdasarkan identifikasi secara kualitatif, senyawa yang diperoleh pada sampel A, B, C, D, E, F termasuk dalam karbohidrat golongan monosakarida (fruktosa) [7].

Hasil Uji Osazon

Uji Osazon bertujuan untuk membedakan bermacam-macam karbohidrat dari bentuk struktur kristalnya. Jika terbentuk Kristal jarum menandakan (+) glukosa, fruktosa atau mannose. Jika terbentuk kristal berbentuk bunga matahari menandakan (+) maltose. Jika terbentuk kristal berbentuk bubuk menandakan (+) laktosa. Hasil percobaan menunjukkan bahwa sampel A, B, C, D, E, F tidak terbentuk kristal bubuk, dan termasuk kedalam karbohidrat golongan disakarida (sukrosa). Hal ini dikarenakan sukrosa merupakan karbohidrat dengan daya reduksi yang sangat lemah sehingga sulit bereaksi dengan pereaksi Osazon [24].

3.2 Uji Kualitatif Kandungan Protein pada Minuman Coklat Bubuk Kemasan

Hasil Uji Biuret

Pereaksi uji Biuret digunakan untuk mendeteksi adanya ikatan peptida pada zat uji. Adanya ikatan peptida menandakan adanya protein karena asam amino berikatan dengan asam amino lain melalui ikatan peptida yang akan membentuk protein [2]. Sebanyak 2 mL larutan uji ditambahkan dengan 1 mL NaOH 10%. Fungsi dari NaOH yaitu mencegah endapan $\text{Cu}(\text{OH})_2$, dan memecah ikatan protein menjadi urea, sebagai katalisator. Selanjutnya penambahan 2-3 tetes larutan CuSO_4 yang berfungsi sebagai pendonor Cu^{2+} . Jika terbentuk warna ungu atau merah menunjukkan hasil positif dan jika terbentuk warna biru berarti negatif [19]. Dari hasil yang didapatkan pada keenam sampel minuman cokelat bubuk kemasan yaitu dua (2) sampel (sampel E dan sampel C) menunjukkan hasil positif hal itu disebabkan adanya ikatan peptida pada sampel tersebut.

Hasil Uji Ninhidrin

Pada uji ninhidrin digunakan untuk identifikasi asam amino bebas yang terdapat dalam sampel. Reagen ninhidrin merupakan hidrat triketon siklik dan bila bereaksi dengan asam amino menghasilkan zat warna ungu. Hanya atom nitrogen pewarna ungu yang berasal dari asam amino, sisanya menjadi aldehida dan karbon dioksida [20]. Pemanasan yang dilakukan pada tiap uji percobaan bertujuan untuk koagulasi protein sehingga tidak dapat larut dalam air dan terbentuknya endapan [21]. Hasil percobaan menunjukkan bahwa tiga sampel minuman cokelat bubuk kemasan (sampel E, sampel C, dan sampel D) yang diuji memberikan hasil positif. Hal ini menunjukkan adanya asam amino bebas.

Hasil Uji Xantoprotein

Uji xantoprotein bertujuan untuk menunjukkan adanya inti benzene (cincin fenil) atau senyawa aromatik pada suatu sampel protein dan untuk mendeteksi asam amino yang mengandung inti aromatik, seperti tirosin, triptofan, dan fenilalanin, dalam larutan protein. Indikator pengamatan dari uji ini akan mengubah sampel menjadi endapan berwarna kuning atau larutan kuning. Cincin benzene aromatik dalam asam amino ini mengalami nitrasi ketika dipanaskan dengan asam nitrat pekat (HNO_3), sehingga terbentuk turunan nitro berwarna kuning [25]. Dalam kondisi basa, uji xantoprotein mengubah kompleks kuning gelap pada sampel menjadi jingga. Dalam pengujian ini, semua sampel minuman cokelat bubuk kemasan (A-F) menghasilkan uji yang negatif terhadap reagen xantoprotein yang ditandai dengan tidak terbentuknya kompleks berwarna kuning tua atau kuning muda ketika berada dalam suasana asam dan terbentuk kompleks berwarna jingga atau kuning ketika berada dalam suasana basa [17].

Hasil Uji Sulfur

Uji sulfur digunakan untuk mendeteksi asam amino yang mengandung sulfur, seperti sistein dan metionin. Jika sampel yang mengandung salah satu atau kedua asam amino ini diasidifikasi, maka akan dihasilkan gas H_2S , yang memiliki aroma khas bau telur busuk. Terbentuknya warna hitam pada tabung reaksi menunjukkan hasil positif terbentuknya asam amino yang mengandung sulfur [20]. Hasil pengujian menunjukkan bahwa, sampel minuman cokelat bubuk kemasan A, B, C, D, E, dan F membentuk endapan PbS yang dapat disimpulkan bahwa larutan tersebut mengandung asam amino dengan senyawa belerang pada rantai sampingnya [20].

Hasil Uji Neuman

Uji neuman bertujuan untuk mengetahui adanya fosfor dalam kasein. Kasein yang ditambah asam nitrat dan asam sulfat akan mengeluarkan asap putih dan larutan dan endapan yang berwarna kuning cerah (amonium fosfomolibdat) [10]. Berdasarkan hasil pengujian, diketahui semua sampel minuman cokelat bubuk kemasan memberikan hasil negatif (-) yang menunjukkan semua sampel tersebut tidak mengandung kasein. Kasein umumnya terdapat dalam produk-produk susu seperti minuman protein susu, krim, dan yogurt [22].

3.3 Kadar Gula Reduksi Pada Minuman Cokelat Bubuk Kemasan

Kadar gula reduksi pada sampel minuman cokelat bubuk kemasan diuji menggunakan reagen 3, 5-

dinitrosalicylic acid (DNS) dengan tujuan untuk mendeteksi adanya gugus karbonil bebas (C=O) dari gula pereduksi yang melibatkan oksidasi fungsional aldehid gugus fungsi (pada glukosa) dan gugus fungsi keton (pada fruktosa). Reaksi yang terjadi dimana 3,5-dinitrosalicylic acid (kuning) direduksi menjadi 3-amino-5-nitrosalicylate acid yang dalam kondisi basa diubah menjadi kompleks berwarna jingga kemerahan yang memiliki absorbansi maksimum 540 nm [9]. Kadar gula reduksi yang tinggi pada sampel berbanding lurus dengan tingkat kemanisan yang terdapat pada sampel tersebut [26]. Berdasarkan hasil pengujian, diperoleh bahwa kadar gula reduksi tertinggi terdapat pada sampel minuman cokelat bubuk kemasan "F" yaitu 3,78 mg/mL yang menunjukkan bahwa sampel "F" memiliki tingkat kemanisan tertinggi karena kandungan karbohidrat yang tinggi. Rentang kadar gula reduksi dari sampel minuman cokelat bubuk kemasan yang diuji adalah 1,81 mg/mL sampai 3,78 mg/mL.

3.4 Uji Kuantitatif Kandungan Protein Dengan Metode Lowry

Kandungan protein dapat diukur dengan metode Lowry dengan menggunakan instrument spektrofotometer. Prinsip dari instrument ini dimana cahaya dari sumber cahaya yang masuk ke monokromator dan didispersikan menjadi cahaya monokromatis. Cahaya monokromatis ini kemudian ditransmisikan melalui sel atau tempat sampel dan jatuh pada detector, yang akhirnya dikonversikan sinyal listrik dan tercatat pada rekorder [15]. Dari hasil pengukuran diperoleh kadar protein tertinggi 0,024 mg/mL yang terkandung pada sampel "F". Kadar protein dari keenam sampel minuman uji berada pada rentang 0,018 – 0,024 mg/mL.

4. Alat, Bahan dan Metode

Alat

Peralatan gelas kimia, pipet tetes, mikroskop, rak tabung, penjepit tabung, objek glass, kertas perkamen, hot plate, saringan, spektrofotometer, kain lap, spatel, mikropipet, pipet volume, mortar dan alu, bunsen dan spiritus.

Bahan

Sampel minuman cokelat bubuk kemasan yaitu sampel "A", sampel "B", sampel "C", sampel "D", sampel "E", dan sampel "F", reagen molisch (5% α -naftol dalam etanol), reagen benedict, reagen barfoed, reagen seliwanooff, H₂SO₄ pekat (Merck), iodin, asam asetat (Merck), fenil hidrazin (Merck), aquadest, reagen DNS (Aldarich), larutan glukosa, NaOH 10% (Merck), NaOH 40% (Merck), CuSO₄ (Merck), reagen ninhidrin, HNO₃ pekat (Merck), Pb-asetat (Merck), ammonium molybdate, (NH₄)₂SO₄ (ammonium sulfat) (Merck).

Metode Kerja

4.1 Uji Kualitatif Kandungan Karbohidrat pada Minuman Cokelat Bubuk Kemasan

Uji Molisch

Sebanyak 2 mL larutan uji (minuman cokelat bubuk kemasan sample A, B, C, D, E, dan F) dimasukkan kedalam tabung reaksi yang bersih. Kemudian, ditambahkan 2 tetes reagen Molisch dan dihomogenkan dengan cara dikocok hingga merata. Selanjutnya, tabung reaksi tersebut dimiringkan dan ditambahkan H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung dengan hati-hati sampai terbentuk dua lapis larutan.

Uji Iodin

Sebanyak 1 mL larutan uji (minuman cokelat bubuk kemasan sample A, B, C, D, E, dan F) ditambahkan 2 tetes larutan iodin kedalam tabung reaksi yang berisi sampel tersebut. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi pada tabung reaksi tersebut.

Uji Benedict

Sebanyak 5 mL reagen benedict ditetesi 8 tetes larutan uji (minuman cokelat bubuk kemasan sample A, B, C, D, E, dan F). Kemudian tabung reaksi yang berisi sampel dipanaskan dengan api bunsen atau dalam air mendidih selama 2 menit, lalu dinginkan.

Uji Barfoed

Sebanyak 2 mL reagen Barfoed ditambahkan 2 mL larutan uji (minuman coklat bubuk kemasan sample A, B, C, D, E, dan F). Kemudian tabung reaksi yang berisi sampel dipanaskan dalam air mendidih selama 3 menit, lalu didinginkan di bawah air mengalir. Selanjutnya, diamati endapan merah yang terbentuk didasar tabung reaksi tersebut.

Uji Seliwanoff

Sebanyak 3 mL reagen Seliwanoff ditambahkan ke dalam 1 mL larutan uji (minuman coklat bubuk kemasan sample A, B, C, D, E, dan F) pada tabung reaksi. Kemudian, dididihkan selama 30 detik lalu didinginkan. Indikator pengamatan adalah perubahan warna yang terjadi.

Uji Osazon

Sebanyak 5 mL larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 tetes asam asetat dan 3 tetes fenil hidrazin. Kemudian, dipanaskan selama 10 menit didalam air mendidih lalu dipindahkan setengah dari tabung ke tabung reaksi lain dan dipanaskan dengan api langsung hingga terbentuk endapan kristal yang diamati dibawah mikroskop.

4.2 Uji Kualitatif Kandungan Protein pada Minuman Cokelat Bubuk Kemasan Uji Biuret**Pembuatan Kurva Standard**

Sebanyak 2 mL larutan uji ditambahkan dengan 1 mL NaOH 10%. Setelah itu, dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 80 ppm; 60 ppm; 40 ppm; 20 ppm dengan masing-masing volume sebanyak 100 mL. Setelah itu, ditambahkan 2-3 tetes larutan CuSO₄ dan akan terjadi warna ungu atau merah bila positif.

Uji Biuret

Sebanyak 2 mL larutan uji ditambahkan dengan 1 mL NaOH 10% dan ditambahkan 2-3 tetes larutan CuSO₄. Selanjutnya, didiamkan sampai terbentuk larutan warna ungu atau merah.

Uji Ninhidrin

Sebanyak 3 mL larutan protein ditambahkan 10 tetes larutan ninhidrin, kemudian dipanaskan 1-2 menit. Lalu, didiamkan sampai dingin dan terbentuk larutan warna biru.

Uji Xantoprotein

Sebanyak 2 mL larutan uji ditambahkan dengan 1 mL HNO₃ pekat lalu dipanaskan selama 1 menit, kemudian didinginkan di air yang mengalir. Selanjutnya dimasukkan NaOH 40% dalam tabung dengan perlahan-lahan dan hati-hati, sampai terlihat perubahan warna.

Uji Sulfur

Sebanyak 1 mL larutan uji ditambahkan dengan 1 mL NaOH 40% lalu dipanaskan selama 1 menit untuk mengubah S organik menjadi NaS. Setelah itu, ditambahkan 1 tetes Pb asetat, maka akan terjadi warna coklat atau hitam karena terbentuk PbS.

Uji Neuman

Sebanyak 200 µL larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi. Lalu, ditambahkan 2 mL asam nitrat (HNO₃) pekat dan 200 µL asam sulfat pekat, kemudian dididihkan sampai volumenya berkurang hingga 0,5 mL. Lalu, dibiarkan sampai dingin pada suhu ruang, kemudian ditambahkan larutan ammonium molibdate dan diamati terbentuknya endapan berwarna kuning.

4.3 Uji Kuantitatif Kandungan Karbohidrat Dengan Metode DNS

Pada dua tabung reaksi masing-masing dimasukkan 1 mL aquadest (blanko) pada salah satu tabung dan tabung yang lain diisi dengan 1 mL larutan sampel (minuman coklat bubuk kemasan sample A, B, C, D,

E, dan F). Selanjutnya, ditambahkan masing-masing tabung dengan 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan. Kemudian, dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit sampai larutan berwarna merah-cokelat lalu ditambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40%. Kemudian, tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Reagen DNS (3,5 dinitro salicylic acid) berfungsi sebagai pendeteksi adanya gula pereduksi pada sampel.

4.4 Uji Kuantitatif Kandungan Protein Dengan Metode Lowry

Pembuatan Kurva Standar BSA (Bovine Serum Albumin)

Sebanyak 1 gram BSA (*bovine serum albumin*) dilarutkan dengan 100 mL H₂O steril. Kemudian diencerkan dengan menggunakan aquadest hingga volume 1000 mL (1 L) di dalam labu ukur, sehingga diperoleh larutan stok BSA (larutan induk) dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, dilakukan pengenceran konsentrasi dari larutan induk menjadi 100 ppm sebanyak 100 mL.

Setelah dihitung menggunakan rumus pengenceran didapatkan volume larutan standar yang diencerkan (V₁) yaitu 10 mL. Lalu 10 mL larutan induk BSA (1000 ppm) diencerkan dengan aquadest menggunakan labu takar 100 mL hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok BSA dengan konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya, dilakukan pengukuran absorbansi terhadap kelima seri pengenceran tersebut dimana pada lima tabung reaksi tersebut, dipipet masing-masing 1 mL dari tiap seri pengenceran BSA (100 ppm; 80 ppm; 60 ppm; 40 ppm; 20 ppm). Pada kelima tabung yang berisi serial pengenceran tersebut ditambahkan masing-masing 5 mL Lowry B lalu homogenkan, kemudian didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya, ditambahkan 0,5 mL Lowry A, dihomogenkan dan didiamkan selama 20 menit. Ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 660 nm. Dilakukan hal yang sama terhadap blanko (tanpa menggunakan BSA). Kemudian dihitung kadar proteinnya dengan menggunakan persamaan regresi linier garis lurus yang diperoleh dari grafik larutan standar.

Pengukuran Kadar Protein Dengan Metode Lowry

Sebanyak 1 mL larutan sampel protein ditambahkan 5 mL Lowry B lalu dihomogenkan dengan cara digojog dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian, ditambahkan 0,5 mL Lowry A, dihomogenkan (dengan cara digojog) dan dibiarkan selama 20 menit. Selanjutnya, nilai absorbansinya diukur pada panjang gelombang 660 nm. Kemudian dihitung kadar proteinnya dengan menggunakan persamaan regresi linier garis lurus yang diperoleh dari grafik larutan standar.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian pada sampel minuman cokelat bubuk kemasan merek A, B, C, D, E, dan F diketahui keenam sampel tersebut mengandung karbohidrat dengan memberikan hasil yang positif pada uji iodin dan sellivanof dan juga mengandung protein dengan menunjukkan hasil positif dari uji iodin dengan terbentuknya endapan hitam. Selanjutnya, sampel minuman cokelat bubuk kemasan merek "F" memiliki kandungan karbohidrat (3,78 mg/mL) dan protein (0,024 mg/mL) tertinggi dibandingkan sampel merek lainnya.

Daftar Pustaka

1. Abdelaziz, I.B.; Sahli, A.; Bornaz, A.; Scher, S.; Gaiani, C. Dynamic method to characterize rehydration of powdered cocoa beverage: Influence of sugar nature, quantity, and size. *Powder Technology* 2014, 264, 184-189. DOI: 10.1016/j.powtec.2014.05.031.
2. Aliakbarian, B.; Casaza, A.A.; Nani, A.; Perego, P. Production of chocolate powdered beverage with enhanced instant properties. *Chemical Engineering Transactions* 2017, 57, 877. DOI: 10.3303/CET1757147.
3. Badan POM. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 1 Tahun 2017. Jakarta: Badan POM, 2017, 24 halaman.

4. Badan Standar Nasional. Pedoman Cokelat. Jakarta: Badan POM, 2017.
5. Eduardo, M.F.; Mello, K.G.P.C.; Polakiewicz, B.; Lannes, S.C.D.S. Evaluation of chocolate milk beverage formulated with modified chitosan. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2014, 16, 1301-1312.
6. Hurts, W.J.; Krake, S.H.; Bergmeier, S.C.; Payne, M.J.; Miller, K.B.; Stuart, D.A. Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chemistry Central Journal* 2011, 5, 53.
7. Microbiologynote. (2022). Seliwanoff's Test Principle, Procedure, Result. Tersedia pada: <https://microbiologynote.com/seliwanoffs-test-principle-procedure-result/> (Diakses pada 12 Juli 2023).
8. Ikrawan, Y.; Hasnelly, D.S. Sifat Fungsional Dark Chocolate yang Bergula Rendah Kalori Dengan Penambahan Green Tea dan Soy Powder. Dalam Seminar Nasional Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI) Bandar Lampung, 2017, hlm. 10-11.
9. Ramlah, S. Pengaruh Suhu Penyangraian Terhadap Mutu Cokelat Sebagai Makanan Kesehatan Penurun Kadar Kolesterol Darah. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan* 2014, 9(1).
10. Kusumaningrum, I. Profil Aroma Dan Mutu Sensori Citarasa Pasta Kakao Unggulan dari Beberapa Daerah di Indonesia. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 2014, 25(1), 106–114.
11. Poedjiadi, A.; Supriyanti, T. Dasar-Dasar Biokimia. Edisi Revisi. Jakarta: UI Press, 2009.
12. Rohman, A. Analisis Komponen Makanan. Yogyakarta: Graha Ilmu, 2013.
13. Ruswandi; Oktavia, B.; Azhar, M. Penentuan Kadar Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin dengan DNS sebagai Pengoksidasi. *Jurnal Eksakta Berkala Ilmiah Bidang MIPA* 2018, 19(1).
14. Sari, P.; Wijaya, C.H.; Sajuthi, D.; Supratman, U. Color properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: native and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry* 2012, 132, 1908-1914.
15. Selomulya, C.; Fang, Y. Food Powder Rehydration. Dalam *Handbook of Food Powders*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology, and Nutrition; 2013, Volume X, hlm. 379-408. DOI: 10.1533/9780857098672.2.379.
16. Standar Nasional Indonesia. SNI 8898 tahun 2020 tentang bubuk minuman berbasis kakao. Jakarta: Badan POM.
17. Standar Nasional Indonesia. SNI 3752 tahun 2009 tentang bubuk susu cokelat. Jakarta: Badan POM.
18. Libretext Chemistry. (2013). Starch and Iodine. Tersedia pada: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Biological_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Biological_Chemistry\)/Carbohydrates/Case_Studies/Starch_and_Iodine](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Biological_Chemistry/Supplemental_Modules_(Biological_Chemistry)/Carbohydrates/Case_Studies/Starch_and_Iodine) (Dimodifikasi pada 2022).
19. Tamrin, H.; Yuwono, S.; Estiasih, T.; Santoso, U. The change of catechin antioxidant during vacuum roasting of cocoa powder. *Journal of Nutrition and Food Science* 2012, 2, 10.
20. Libretext Chemistry. (2021). Experiment_729_Qualitative Testing of Amino Acids and Proteins 1_2. Tersedia pada: https://chem.libretexts.org/Courses/Los_Medanos_College/Chemistry_6_and_Chemistry_7_Combined_Laboratory_Manual/Experiment_729_Qualitative_Testing_of_Amino_Acids_and_Proteins_1_2 (Diakses pada 12 Juli 2023).
21. Dianto, T. (2016). Acara Ke I Identifikasi Asam Amino dan Protein.
22. Yasin, I.A.; Andarwati, F.; Hidayat, N.; N.P, G.V.; Ismail, F. (2015). Protein (1)(Uji Millon, Uji Hopkins-Cole, Uji Ninhidrin, Uji Belerang, Ujian Xantoproteat, Uji Biuret). Program Keahlian Paramedik Veteriner, Program Diploma, Institut Pertanian Bogor.
23. Center for Dairy Research. (2019). Formulating Dairy Protein Beverages. Tersedia pada: <https://www.cdr.wisc.edu/beverages-formulating-dairy-protein-beverages> (Diakses pada 11 Juli 2023).
24. A Level Biology. (2020). Tests for Carbohydrates. Tersedia pada: <https://alevelbiology.co.uk/notes/tests-for-carbohydrates/#67-reagents> (Diakses pada 12 Juli 2023).
25. Karki, G. (2018). Xanthoproteic test: Tujuan, Prinsip, Reagen, Prosedur, dan Hasil. Tersedia pada: <https://www.onlinebiologynotes.com/xanthoproteic-test-objective-principle-reagents-procedure->

and-result/ (Diakses pada 12 Juli 2023).

26. Sutikno, S., Marniza, M., & Musita, N. (2016). Pengaruh Konsentrasi Enzim Selulase, α -Amilase Dan Glukoamilase Terhadap Kadar Gula Reduksi Dari Onggok (Effects Of Cellulase, α -Amylase, and Glucoamylase Enzyme Concentrations On Reduced Sugar From Solid Cassava Waste). *Jurnal Teknologi & Industri Hasil Pertanian*, 21(1), 1-12.



© 2023 by the Authors. Licensee Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Muhammadiyah University of Sumatera Barat, Padang, Indonesia. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).