

ANALISIS PROTEIN



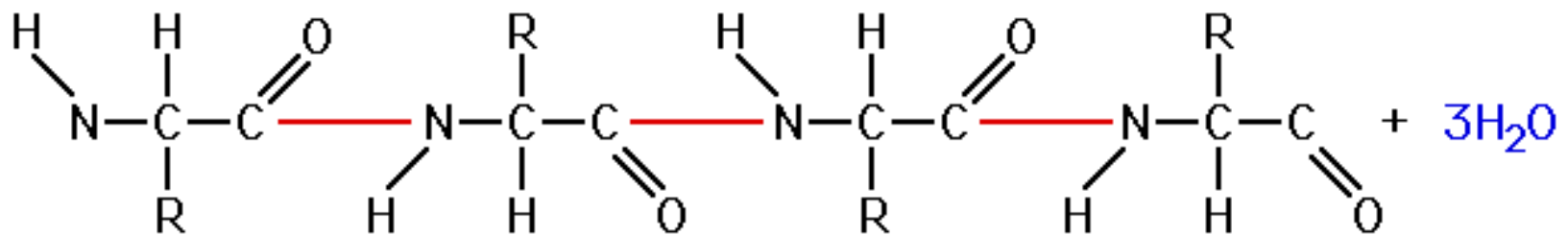
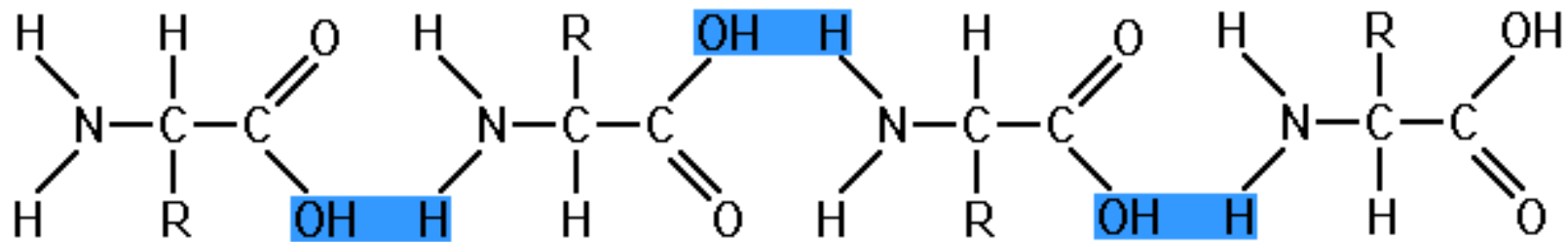
Analisis Zat Gizi – Teti Estiasih

PENDAHULUAN

- Merupakan polimer yang tersusun atas asam amino
- Ikatan antar asam amino adalah ikatan peptida
- Protein tersusun atas atom C, H, O, N, dan pada protein tertentu mengandung unsur S. Jika membentuk kompleks dengan senyawa lain dapat mengandung P



Struktur Protein



TUJUAN ANALISIS

- Menera jumlah protein dalam suatu bahan pangan
- Sifat protein yang diukur adalah kuantitas bukan kualitas
- Pengukuran kualitas protein biasanya diawali dengan pengukuran kuantitas



PRINSIP ANALISIS PROTEIN

Analisis protein didasarkan pada:

- Pengukuran jumlah atau kadar N, karena komponen bahan pangan lain spt lemak dan KH tidak mengandung N, dan hanya sedikit komponen yang mengandung N dan dalam kadar rendah
- Reaksi spesifik suatu senyawa/reagen dengan ikatan peptida



1. METODE KJEDAHL

- Dikembangkan oleh Kjeldahl
- Peneraan empiris (tidak langsung)
- Yang diukur: kadar N
- Umumnya kadar N dalam protein adalah 16% sehingga kadar protein dalam suatu bahan= $\text{kadar N} \times 100 / 16$
- Nilai $100 / 16 = 6.25$ adalah faktor konversi yang umum digunakan



FAKTOR KONVERSI

- Faktor konversi bisa berbeda tergantung jenis protein dan kadar N dalam protein tsb



FAKTOR KONVERSI

| Jenis Bahan Pangan | Persen N dalam Protein | FK |
|--------------------|------------------------|------|
| Telur atau daging | 16,0 | 6.25 |
| Susu | 15,7 | 6,38 |
| Gandum | 18,76 | 5,33 |
| Jagung | 17,70 | 5,65 |
| Oat | 18,66 | 5,36 |
| Kedelai | 18,12 | 5,52 |
| Beras | 19,34 | 5,17 |



KELEMAHAN

- Senyawa lain selain protein yang mengandung N terukur sebagai protein
- Misal senyawa bernitrogen: asam amino bebas, urea, amonia, asam nukleat, nitrit, nitrat, amida, purin, pirimidin
- Oleh karena itu analisis dengan metode Kjeldahl disebut analisis **protein kasar** (*crude protein*)



TAHAPAN METODE KJEDAHL

- Destruksi
- Destilasi
- Titrasi



TAHAP DESTRUKSI

- Tujuan melepaskan nitrogen dari protein
- Cara:
- Sampel dipanaskan dalam larutan asam sulfat pekat
- Unsur C dan H teroksidasi menjadi H₂O, CO₂, CO
- Unsur N berubah menjadi amonium sulfat (NH₄)₂SO₄
- Asam sulfat juga mendestruksi KH dan lemak yang mempengaruhi jumlah asam sulfat yang dibutuhkan

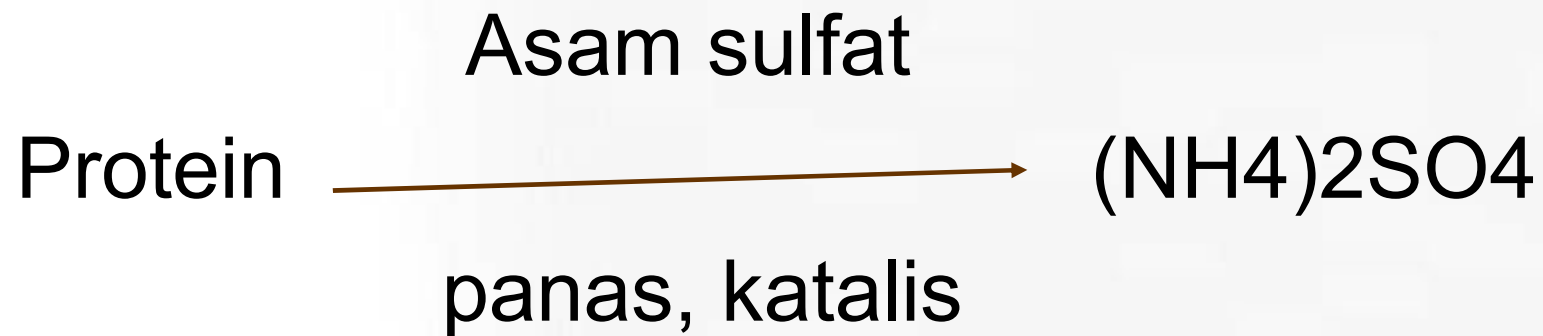


Katalisator

- Diperlukan untuk mempercepat proses destruksi
- Mempertinggi titik didih asam sulfat
- Suhu destruksi lebih tinggi (370-410 C)
- Jenis:
- Campuran Na_2SO_4 dan HgO (20:1)
- K_2SO_4
- CuSO_4



Destruksi



Akhir destruksi

- Diakhiri ketika larutan menjadi jernih dan tidak berwarna
- Supaya analisis lebih akurat dibuat blanko dengan menggunakan reagen tanpa sampel
- Dilanjutkan tahap destilasi



TAHAP DESTILASI

- Dilakukan dengan menambahkan NaOH
- Pada tahap ini amonium sulfat dipecah menjadi amonia
- Amonia yang dibebaskan ditampung dalam larutan asam standar biasanya HCl atau asam borat 4% yang jumlahnya berlebihan
- Untuk mengetahui jumlah asam berlebihan biasa ditambahkan indikator seperti BCG+MR atau PP
- Akhir destilasi diketahui setelah cairan yang ditampung dalam larutan asam bersifat asam



TAHAP TITRASI

- Jika larutan asam penampung yang digunakan HCl, sisa asam klorida yang tidak bereaksi dengan amonia (membentuk NH_4Cl) dititrasi dengan NaOH
- Jika digunakan indikator PP akhir titrasi adalah perubahan larutan menjadi merah mudah permanen (dari asam ke basa) atau jika digunakan MR larutan berubah menjadi kuning
- Buat titrasi untuk blanko (tanpa sampel)



Perhitungan

$$\%N = \frac{\text{ml NaOH (blanko-sampel)} \times N \text{ NaOH} \times 14.008 \times 100\%}{\text{berat sampel (g)} \times 1000}$$



- Jika larutan penampung adalah asam borat/ H_3BO_3 (asam lemah), banyaknya asam borat yang bereaksi dengan amonia dapat diketahui dengan titrasi dengan HCl 0.1N dengan indikator MR+BCG
- HCl akan mentitrasi amonium-borat menjadi amonium klorida sehingga pada akhir titrasi terjadi kelebihan HCl /asam kuat
- Akhir titrasi ditandai dengan perubahan larutan dari biru/hijau menjadi merah muda



Perhitungan

$$\%N = \frac{\text{ml HCl (sampel-blanko)} \times N \text{ HCl} \times 14.008 \times 100\%}{\text{berat sampel (g)} \times 1000}$$



PERHITUNGAN KADAR PROTEIN

- Dengan mengalikan kadar N dengan faktor konversi (FK), yaitu

Kadar protein (%) = Kadar N X FK



PENETAPAN SAMPEL

- Timbang 1 gram bahan yang telah dihaluskan dan masukkan ke dalam labu kjeldahl. Kalau kandungan protein bahan tinggi, gunakan bahan kurang dari 1 gram. Kemudian tambahkan 7.5 g $K_2S_2O_4$ dan 0.35 g HgO (Awas: zat ini beracun) dan akhirnya tambahkan 15 ml H_2SO_4 pekat.
- Panaskan semua bahan dalam labu kjeldahl dalam almari asam sampai berhenti berasap. Teruskan pemanasan dengan api besar sampai mendidih dan cairan menjadi jernih. Teruskan pemanasan tambahan lebih kurang satu jam. Matikan api pemanas dan biarkan bahan menjadi dingin.

- Kemudian tambahkan 100 ml aquades dalam labu kjeldahl yang didinginkan dalam air es dan beberapa lempeng Zn, juga tambahkan 15 ml larutan K_2SO_4 % (dalam air) dan akhirnya tambahkan perlahan-lahan larutan NaOH 50% sebanyak 50 ml yang sudah didinginkan dalam lemari es. Pasanglah labu kjeldahl dengan segera pada alat distilasi.
- Panaskan labu kjeldahl perlahan-lahan sampai dua lapisan cairan tercampur kemudian panaskan dengan cepat sampai mendidih.

- Distilat ini ditampung dalam erlenmeyer yang telah diisi dengan 50 ml larutan standar HCl (0.1 N) dan 5 tetes indikator metil merah. Lakukan distilasi sampai distilat yang tertampung sebanyak 75 ml.
- Titrasilah distilat yang diperoleh dengan standar NaOH (0.1 N) sampai warna kuning. Buatlah juga larutan blanko dengan mengganti bahan dengan aquades, lakukan destruksi, distilasi dan titrasi seperti seperti pada bahan contoh.



Contoh

- Berapa kadar protein sampel kedelai, jika berat sampel kedelai yang digunakan 1.04 g dan jumlah larutan NaOH 0.1019 N yang dibutuhkan untuk titrasi sampel adalah 0.32 ml dan untuk blanko 46.29 ml?



2. METODE BIURET

- Pengukuran jumlah ikatan peptida dalam protein
- Semakin tinggi kadar protein bahan, jumlah ikatan peptida semakin banyak
- Dasar analisis: bahan yang mengandung ikatan peptida dua atau lebih membentuk kompleks berwarna ungu dengan ion Cu^{2+} /kupri pada kondisi alkali



Keunggulan metode Biuret

Mengukur kadar protein sesungguhnya

Sederhana, cepat, dan murah

Hanya sedikit senyawa lain yang mengganggu

Tidak mendeteksi nitrogen dari senyawa non peptida

Keunggulan metode Biuret

- Mengukur kadar protein sesungguhnya
- Sederhana, cepat, dan murah



Preparasi sampel

- Sampel cair yang jernih: bisa langsung digunakan atau dilakukan pengenceran terlebih dahulu
- Sampel cair yang keruh atau mengandung senyawa pengganggu seperti glukosa:
 - Protein diendapkan dengan TCA
 - Endapan dicuci dengan eter dan eter dibuang
 - Endapan dilarutkan dalam 4 ml air



Sampel padat:

- Sampel dihancurkan
- Disaring
- Disentrifusa
- Supernatan dianalisis
- Protein yang tertera adalah protein larut air



Cara analisis

- Pembuatan kurva standar
- Penetapan sampel
- Peneraan dengan spektrofotometri
- Perhitungan



Prosedur analisis

Pembuatan kurva standar

- Buat larutan standar BSA atau kasein dalam air dengan konsentrasi 0.5 mg/ml.
- Masukkan ke dalam tabung reaksi 0 (blanko), 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8. dan 1.0 ml larutan protein standar. Tambahkan air sampai volume total masing-masing 4 ml.
- Tambahkan 6 ml pereaksi Biuret ke dalam masing-masing tabung reaksi. Campur rata.
- Simpan tabung pada suhu 37°C selama 10 menit atau pada suhu kamar selama 30 menit sampai terbentuk warna ungu yang sempurna.
- Ukur absorbansi pada panjang gelombang 520 nm.

Persiapan sampel

- Timbang sampel padat. Hancurkan sampel padat dengan menggunakan waring blender. Hancuran yang diperoleh disaring lalu disentrifugasi. Supernatan didekantasi untuk dipergunakan selanjutnya (protein yang terdapat dalam supernatan adalah *soluble protein*).
- Sampel cair yang berupa protein konsentrat, isolat yang tidak keruh, maka persiapan sampel cukup dengan pengenceran saja. Jika cairannya keruh atau mengandung bahan-bahan yang mengganggu seperti glukosa maka harus dilakukan perlakuan sebagai berikut:



- Timbang ekstrak. Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi seperti pada waktu penetapan standar, kemudian tambahkan air sampai volume total masing-masing 1 ml.
- Tambahkan 1 ml TCA (Tri Chloroacetic Acid) 10% pada masing-masing tabung reaksi sehingga protein akan terdenaturasi.
- Sentrifusa pada 3000 rpm selama 10 menit sampai protein yang terdenaturasi mengendap, supernatan dibuang dengan cara dekantasi.
- Ke dalam endapan tambahkan 2 ml etil eter, campur merata lalu sentrifusa kembali untuk menghilangkan residu TCA. Biarkan mengering pada suhu kamar.
- Ke dalam endapan kering ditambahkan air 4 ml, campur merata.
- Tambahkan 6 ml pereaksi biuret, alkali dalam pereaksi ini akan melarutkan endapan yang tersisa.

Penetapan sampel

- 0.1-1.0 ml sampel (dipipet tepat) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diperlakukan seperti penetapan standar



Contoh 1

1. Berapa kadar protein (mg/ml) dalam sampel susu cair jika sejumlah 2 ml susu diberi perlakuan sesuai perlakuan sampel cair yang keruh. Endapan yang diperoleh diencerkan dengan akuades sampai volume 50 ml. Sebanyak 1 ml sampel ditera dengan spektrofotometer dan diperoleh absorbansi sampel sebesar 0.84 dengan blanko sebesar 0.02. Kurva standar yang diperoleh adalah sebagai berikut:



Kurva standar

| Volume (ml) | A |
|-------------|------|
| 0 | 0.02 |
| 0.1 | 0.14 |
| 0.2 | 0.26 |
| 0.4 | 0.50 |
| 0.6 | 0.74 |
| 0.8 | 1.00 |
| 1.0 | 1.26 |

Contoh 2

2. Berapa kadar protein dalam putih telur cair jika berat putih telur yang digunakan adalah 1,06 g dan sampel diencerkan menjadi 1000 ml. Sebanyak 1 ml sampel putih telur yang sudah diencerkan yang digunakan. Absorbansi yang diperoleh adalah 0,65 dengan kurva standar seperti no. 1.



Contoh 3

3. Konsentrat protein kedelai sebanyak 0,86 g dilarutkan dalam 10 ml akuades. Sebanyak 1 ml larutan diencerkan menjadi 100 ml. Sebanyak 1 ml sampel digunakan untuk penetapan protein dengan metode Biuret. Jika absorbansi adalah 1,24 dengan kurva standar seperti no.1, berapa kadar protein dalam konsentrat kedelai tersebut (% b/b)?

