

ESTIMASI KADAR PROTEIN DALAM BAHAN PANGAN MELALUI ANALISIS NITROGEN TOTAL DAN ANALISIS ASAM AMINO

ESTIMATION OF PROTEIN CONCENTRATION IN FOOD BY TOTAL NITROGEN AND AMINO ACID ANALYSES

Sumarno*, Sri Noegrohati*, Narsito**, Iip Izul Falah**

*Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, **Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Protein merupakan salah satu senyawa pendukung utama dalam kehidupan biologis suatu organisme, oleh karena itu protein harus tersedia dalam pangan. Kualitas protein pangan tergantung pada kandungan asam amino esensial. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan cara sederhana estimasi kadar protein dalam berbagai bahan pangan dan pakan, dengan ketepatan dan kecermatan yang tinggi.

Validitas (ketepatan, ketelitian), cara sederhana estimasi kadar protein dengan mengkonversikan kadar N-total dengan faktor konversi 6,25 sangat diragukan, karena semua N dalam senyawa yang ada dalam bahan kimia ikut ditetapkan kadarnya. Cara lain estimasi protein yang lebih spesifik adalah dengan menjumlahkan kadar masing-masing asam amino dalam sampel.

Dalam penelitian ini kandungan asam amino berbagai jenis sampel bahan makanan berprotein tinggi ditetapkan. secara kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) dengan teknik HPLC-ninhidrin, HPLC-*o*-ftalaldehid, dan HPLC-dansil, secara kromatografi gas dengan teknik TFA butanol, dan secara titrasi formol. Metoda dengan tehnik HPLC-ninhidrin menunjukkan korelasi yang signifikan ($r=0,9992$) protein sebagai asam amino dan sebagai N total. Faktor konversi yang diperoleh melalui korelasi N-total untuk jumlah asam yang kadarnya lebih kecil 15,5 % adalah 6,95 dan untuk N-total dengan kadar lebih besar 15,5% adalah 8,79.

Kata Kunci: bahan pangan, protein, metode analisis.

ABSTRACT

Since protein is the principal constituent of biological organs, a continuous supply is needed in food for growth and repair. Protein quality in food is determined by its assortment of amino acids, whether it is essentially needed or not. The aim of this study is to develop an accurate and precise simple method of protein estimation for food and feed.

The validity of simple protein estimation by multiplying the N-total concentration with a constant factor: of 6.25, should be clarified. Protein could be estimated more specifically by summing up the determined amino acids.

In this study, the amino acids of some substantially high protein food were analysed by HPLC-ninhydrin, HPLC-*o*-phthalaldehyde, and HPLC-dansyl techniques, by gas chromatograph after derivation with TFA-butanol, and by formol titration. Method based on HPLC-ninhydrin techniques shows significant correlation ($r=0.9992$) with its amino acids content and N-total content. The protein as amino acids - N-total conversion factor obtained was 6.95 for N-total content less than 15.5%, and 8.59 for N-total content higher than 15.5%.

Key words: food, protein and analytical methods

PENDAHULUAN

Protein merupakan salah satu senyawa yang berupa makromolekul, yang terdapat dalam setiap organisme, dengan karakteristik yang berbeda-beda. Makhluk hidup akan selalu memerlukan protein untuk

kehidupannya. Protein sendiri dibedakan dalam berbagai kelompok yang sering disesuaikan dengan fungsinya untuk kepentingan organisme yang bersangkutan (Linder, 1992)

Protein yang ditemukan kadang-kadang berkonjugasi dengan makromolekul atau mikromolekul seperti lipid, polisakarida dan mungkin fosfat. Protein terkonjugasi yang dikenal antara lain nukleoprotein, fosfoprotein, metaloprotein, lipoprotein, flavoprotein dan glikoprotein. Protein yang diperlukan organisme dapat diklasifikasikan menjadi dua golongan utama, ialah pertama; protein sederhana, yaitu protein yang apabila terhidrolisis hanya menghasilkan asam amino; dan kedua protein terkonjugasi, yaitu protein yang dalam hidrolisis tidak hanya menghasilkan asam amino, tetapi menghasilkan juga komponen organik ataupun komponen anorganik, yang disebut "gugus prosthetic".

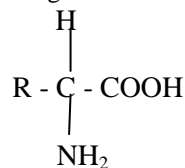
Di samping itu protein dapat dibedakan berdasarkan pada jenis ikatan peptida antar molekul asam amino, yaitu protein primer, protein sekunder, protein tertier dan protein kuartener. Protein primer merupakan polimer asam amino yang berbentuk rantai panjang, terdapat dalam sel hewan antara lain sebagai collagen dan elastin. Protein sekunder adalah polimer asam amino rantai polipeptida yang membentuk struktur helix seperti keratin yang terdapat dalam rambut, tanduk dan wool. Protein tertier adalah polimer asam amino dalam bentuk globuler, seperti yang terdapat dalam enzim, hormon dan protein pembawa oksigen (Lehninger, 1975, dan Linder, 1992)

Dari segi nutrisi, asam amino dapat dibedakan antara lain (i) asam amino non esensial dan (ii) asam amino esensial. Asam amino non esensial adalah asam amino yang dapat disediakan oleh tubuh organisme melalui proses biosintesa yang rumit dari senyawa nitrogen yang terdapat dalam makanan, dan asam amino esensial, adalah asam amino yang tidak dapat disintesa oleh tubuh, (Fennema 1976).

Untuk memenuhi kebutuhan protein, suatu organisme memerlukan tambahan asam amino esensial yang diperoleh dari bahan pangan atau pakan yang dikonsumsi. Banyak kelainan yang timbul terhadap manusia yang kekurangan protein. Untuk meningkatkan kadar HB pada penderita anemia, diperlukan makanan dengan gizi yang lebih baik, artinya perlu tambahan protein hewani maupun nabati, walaupun pemberian susu untuk diminum sedikit menaikkan status tersebut (Latupeirissa, dkk 2000). Kekurangan gizi memungkinkan ketahanan terhadap infeksi lebih banyak dari pada orang bergizi baik, seperti infeksi saluran pernafasan bagian atas (ISPA) dan infeksi pada kulit, dan ketahanan bagi penderita kurang gizi waktunya sangat terbatas yang paling lama adalah 6 bulan, (Sihadi, 1998/1999). Kekurangan gizi ternyata ada kaitannya kadar albumin dalam serum, Sya'bani (1998), melaporkan para penderita kurang gizi ternyata jumlah pemasukan proteinnya rendah lebih kurang 1.0 g/kg/hari. Pada hal kadar albumin mempunyai waktu paro yang panjang disimpan dihati, hal senada dilaporkan oleh Lydia (1997), bahwa kadar albumin yang rendah pada ginjal dapat mengurangi fungsi kemampuan filtrasi darah oleh ginjal atau kemungkinan dapat menyebabkan gagal ginjal.

Sekurang-kurangnya, terdapat lima belas macam asam amino esensial yang harus tersedia dalam makanan, yaitu fenilalanin, tirosin, isoleusin, lisin, metionin, sistin, treonin, valin, triptofan, arginin, histidin, glisin, serin, asparagin, dan prolin.

Secara kimia, asam amino merupakan asam karboksilat dengan gugus amino - NH₂ pada kedudukan α , yang dapat dituliskan dalam formula sebagai berikut:



Berdasarkan polaritas gugus - R, asam amino dibedakan menjadi 4 golongan yaitu (1) asam amino dengan gugus - R yang bersifat nonpolar, seperti alanin, leusin, isoleusin, valin, prolin, fenilalanin, triptofan dan metionin, (2) asam amino dengan gugus - R polar tidak bermuatan, seperti serin, treonin, tirosin, asparagin, glutamin, sistein dan glisin, (3) asam amino dengan gugus - R bermuatan positif, seperti lisin, arginin dan histidin, dan (4) asam amino dengan gugus - R bermuatan negatif, seperti asam aspartat dan asam glutamat. (Bodanszky, 1993).

Hidrolisis rantai polipeptida yang sempurna dilakukan dengan asam HCl 6 N berlebihan pada 100° sampai 120° C selama 10 sampai 24 jam dalam lingkungan gas nitrogen. Triptofan tidak stabil dalam lingkungan asam, sehingga rusak dalam hidrolisis asam. Dengan hidrolisis asam ini serin dan threonin akan

mengalami kerusakan sebagian, sedangkan asparagin dan glutamin akan terhidrolisa sempurna menjadi asam aspartat dan asam glutamat dengan membebaskan ion amonium, (Linder, 1992)

Untuk menentukan kadar protein dalam bahan pangan telah dipaparkan oleh (Maynard dkk, 1984; Smith, 1988; Lottspeich dkk, 1981; Grob, 1977), meliputi prosedur analisis kimia konvensional berdasarkan pada kandungan nitrogen total (Maynard dkk, 1984).

Kualitas nutrisi suatu protein bahan pangan ditentukan oleh kesesuaian antara jenis dan jumlah asam amino yang terkandung dengan jenis dan jumlah asam amino yang dibutuhkan; mendorong untuk dilakukannya pengembangan metoda analisis asam amino. Pengembangan berbagai teknik kromatografi (Smith, 1988; Lottspeich dkk, 1981; Grob, 1977) memungkinkan penyusunan cara estimasi kadar protein dalam suatu bahan secara instrumental melalui penetapan kadar asam amino, sebagai hasil hidrolisis protein dalam bahan itu.

Determinasi Asam Amino dengan Kromatografi gas

Pemanfaatan teknik kromatografi gas (Smith, 1988; Grob, 1977) didasarkan pada pemisahan semua jenis asam amino yang berasal dari protein dalam bahan setelah melalui suatu proses derivatisasi yang bertujuan untuk mengkonversi asam amino menjadi senyawa dengan titik didih relatif rendah dan stabil pada temperatur pemisahan. Derivatisasi asam amino ini biasanya meliputi konversi gugus amino dan gugus karboksilat menjadi "N-asetil eter"

Bentuk propil dan metil ester dari sejumlah asam amino bersifat volatil dan cukup stabil pada temperatur pemisahan dalam kolom kromatografi gas. Kelemahan teknik ini terutama pada interferensi pada proses derivatisasi, yang dapat menurunkan efisiensi konversi asam amino menjadi bentuk ester. Diasumsikan bahwa konversi gugus amino tidak akan berlangsung sempurna tanpa didahului esterifikasi gugus karboksilat. Hal ini berarti kesempurnaan esterifikasi gugus karboksilat akan sangat mempengaruhi efisiensi konversi asam amino secara keseluruhan dan cara estimasi kadar protein dalam suatu bahan secara instrumental melalui penetapan kadar asam amino, sebagai hasil hidrolisis protein dalam bahan itu kurang efisien.

Determinasi Asam Amino dengan Kromatografi Cair Kinerja tinggi

Pengenalan teknik kromatografi cair kinerja tinggi, atau HPLC (Smith, 1988; Lottspeich dkk, 1981) membuka dimensi baru dalam analisis protein, peptida dan asam amino, terutama dari segi efektivitas pemisahan, kecepatan analisis dan sensitivitas deteksi. Hal ini karena dengan HPLC campuran analit dapat dipisahkan secara langsung dalam kolom yang sesuai, seperti dalam metoda analisis asam amino. Dalam metoda ini digunakan kolom penukar ion (kation) resin polistiren tersulfonasi dalam bentuk Na(+). Asam amino yang dilarutkan dalam dapar pH 2.2, sehingga terdapat dalam bentuk kation dengan muatan positif. Asam amino ini akan mendesak dan menggantikan ion Na yang terikat pada resin. Kekuatan ikatan elektrostatik ini bervariasi sesuai dengan perbedaan derajat ionisasi masing-masing asam amino.

Apabila sebagai eluen digunakan larutan dapar dengan pH 3, asam amino yang bersifat basa, seperti lisin, arginin dan histidin, akan tetap terikat kuat pada resin karena ikatan elektrostatik yang kuat, sedangkan asam amino yang bersifat asam, seperti asam glutamat dan asam aspartat, karena ikatan elektrostatik dengan gugus sulfonat pada resin lemah, akan terlepas dan terelusi keluar dari kolom. Dengan menaikkan pH secara bertahap dan pengaturan konsentrasi NaCl dalam eluen, masing-masing asam amino akan terpisah dan terelusi dari kolom dengan waktu retensi yang berbeda-beda. Asam aspartat akan terelusi paling awal dan arginin akan terelusi paling akhir.

Identifikasi asam amino yang telah terelusi dari kolom dapat dilakukan terhadap gugus -NH₂ (amin primer), dengan derivatisasi pasca kolom menggunakan pereaksi ninhidrin dalam suasana alkalis pada temperatur 100°C. Hasil reaksi antara asam amino dan ninhidrin ini secara visual berwarna ungu, yang dapat digunakan sebagai dasar pengukuran spektrofotometri pada panjang gelombang serapan maksimum di sekitar 570 nm. Pengukuran serupa harus dilakukan pula pada 440 nm, karena hasil reaksi antara asam amino (prolin hidroksi prolin) dengan ninhidrin merupakan senyawa berwarna kuning dengan panjang gelombang serapan maksimum disekitar 440 nm.

Derivatisasi dalam HPLC bertujuan untuk mengubah analit menjadi bentuk yang dapat terdeteksi oleh sistem detektor yang digunakan, sesuai dengan sensitivitas yang diperlukan. Untuk mendapatkan sensitivitas dan selektivitas yang tinggi digunakan detektor spektrofлуorometer. Dalam hal ini derivatisasi dilakukan supaya didapat senyawa yang berfluoresensi kuat. Derivatisasi asam amino dengan *o*-ftalaldehid (OPA) atau dengan 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonil klorida (dansil klorida) sering dilakukan secara pra-

kolom maupun pasca-kolom.

METODOLOGI

Bahan dan Materi Penelitian

Berbagai jenis bahan pangan dan pakan akan digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Bahan tersebut merupakan bahan pangan yang berasal dari hewan, meliputi: susu sapi, susu kerbau, air susu ibu (ASI), dan telur ayam; serta bahan pangan yang berasal dari tumbuhan, meliputi: biji kedelai, susu kedelai, dan tahu. Semua bahan didapat dari Daerah Istimewa Yogyakarta, dan ASI dari beberapa orang ibu sebagai sukarelawan.

Alat Utama

Dalam penelitian ini, digunakan 4 (empat) macam peralatan analisis kimia ialah (1) satu set alat Kjeldahl; (2). Amino Acid Analyzer Beckman Model 118 BL yang dilengkapi dengan *Six Port Injection Valve*; kolom yang berisi fase diam Resin Penukar Kation Dowex 25 cm x 4,6 mm i.d.; dan reaktor pasca kolom Ninhidrin dengan detektor kolorimetri pada 440 nm dan 570 nm. (3). HPLC Beckman yang dilengkapi dengan *Six Port Injection Valve*; kolom : kolom kerja RP C-18 25 cm x 4,6 mm i.d. dan *guard column* RP C-18 25 cm x 4,6 mm i.d.; pompa gradien, detektor fluorometer dengan eksitasi pada 340 nm dan emisi pada 455 nm. (3). Kromatografi Gas Varian 3300 yang dilengkapi dengan: (a) kolom gelas 1,8 m X 3 mm i.d. dengan EGA 5% pada Chromosorb WHP 80/100 Mesh dan (b) kolom gelas 2m X 3 mm i.d. dengan OV 101 2% pada Chromosorb WHP 80/100 Mesh, detektor nyala ionisasi dan pengolah data Chromatopac CR3A Shimadzu. (3) Freeze drier Lab Conco

Jalan Penelitian

Dalam penelitian ini, kualitas beberapa metoda analisis kimia untuk mengestimasi kadar protein dalam bahan pangan dan pakan akan dievaluasi. Metoda tersebut meliputi, metoda konvensional Kjeldahl, kromatografi gas, dan kromatografi cair tekanan tinggi. Penelitian ini dititik beratkan pada evaluasi sensitivitas dan selektivitas masing-masing metoda.

Praperlakuan terhadap Sampel

Untuk menjaga agar sampel tidak rusak dalam penyimpanan, dilakukan pengeringan beku terhadap sampel cair, seperti susu sapi, ASI dan putih telur ayam.

Penetapan Nitrogen Total secara Kjeldahl

Lebih kurang 1 gram sampel protein dimasukkan kedalam labu Kjeldahl, tambahkan 10 g natrium sulfat anhidrat dan 20 mL asam sulfat pekat, kemudian dipanaskan sampai cairan jernih tak berwarna, setelah didinginkan ditambahkan air suling 200 ml dan natrium hidroksida 45% sampai bersifat basa terhadap kertas lakmus dan didestilasi. Destilat yang mengandung ammonia ditampung dalam HCl 0,1N 100,0 ml. Destilasi dihentikan bila destilat tidak bersifat basa lagi, kelebihan HCl dititrasi kembali dengan natrium hidroksida 0,1 N. Penetapan serupa dilakukan terhadap blanko.

Penetapan Kadar Asam Amino secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Hidrolisis protein dalam suasana asam

Sampel yang telah diliofilisasi sampai kering, ditimbang tepat 5,00 mg, dihidrolisis dengan HCl 6N dengan penambahan 1 ml larutan merkaptotanol 5 ppm v/v dalam HCl pekat selama 24 jam pada $t = 110^{\circ}\text{C}$. Sisa HCl dihilangkan dengan penghampaan (dengan *Rotary evaporator*), pada $t = 60^{\circ}\text{C}$. Setelah kering dilarutkan dalam dapar sitrat (pH 2,2) sebanyak 5,0 mL dan disaring dengan penyaring Millipore 5 μm hingga didapat filtrat dan hasil pencucian 7 mL, kemudian diencerkan sampai 10,0 mL. Filtrat ini dianalisis kandungan asam aminonya dengan cara kromatografi cair kinerja tinggi.

Penetapan Kadar Asam Amino dengan alat Analisis Asam Amino Beckman 118BL

Asam amino dalam 50 sampai 100 μL filtrat dipisahkan dalam kolom penukar ion jenis kation kuat

(Dowex) dengan eluen dapar sitrat: pH 3,5 selama 20 menit, pH 4,1 selama 20 menit dan pH 6,4 selama 1 jam, kemudian kolom diaktivasi dengan larutan NaOH 2M selama 20 menit dan disiapkan untuk analisis berikutnya dengan dapar sitrat pH 3,5. Laju alir eluen 1,1 mL/menit. Eluat direaksikan dalam reaktor pasca kolom dengan ninhidrin yang dilarutkan dalam *methylcellosolve*, dalam suasana basa pada suhu 100°C. Warna ungu dari kompleks ninhidrin-asam amino dideteksi dengan kolorimeter pada panjang gelombang 570 nm, sedangkan warna kuning dari kompleks ninhidrin-asam amino dideteksi pada panjang gelombang 440 nm.

Penetapan Kadar Asam Amino dengan HPLC "off-line" dengan peraksi OPA

Asam amino dalam 10 µl filtrat direaksikan dengan OPA dalam suasana alkalis (dapar borat pH 9,1) dengan adanya merkaptoetanol pada suhu kamar. Derivat asam amino yang dihasilkan dipisah dalam kolom RP-C18 dengan dua eluen: (a) metanol –tetra hidro furan (THF) -dapar asetat (20:2,5:77,5) pH 5,9 dan (b) metanol-THF- dapar asetat (80:2,5:17,5) pH 5,9, yang diatur secara bertingkat. Intensitas fluoresensi derivat asam amino-OPA diukur dengan detektor fluorometer.

Penetapan Kadar Asam Amino secara Kromatografi Gas

Lebih kurang 1 gram sampel yang telah ditimbang seksama dihidrolisis dengan HCl 6N dalam lingkungan gas N₂ selama 30 menit pada suhu 100° C. Setelah didinginkan, sisa HCl diuapkan dengan distilasi hampa pada suhu 60°C sampai kering. Esterifikasi terhadap gugus -COOH dilakukan dengan penambahan 2 ml campuran *n*-butanol-HCl (1:1) pada suhu 100°C selama 2,5 jam. Setelah dingin sisa butanol diuapkan dengan distilasi hampa seperti diatas sampai kering.

Asilasi terhadap gugus -NH₂ dilakukan dengan penambahan 1 ml campuran TFA (triklor asam asetat) dalam benzen (1:1), digojok kuat dan dipanaskan pada suhu = 60°C selama 5 menit dan segera diambil 1 µl untuk dianalisis dengan kromatografi gas.

Penetapan Kadar Asam Amino Total secara Titrasi Formol

Satu ml hidrolisat protein dalam suasana asam dinetralkan terhadap fenolftalein dengan larutan NaOH. Ditambahkan 2 ml larutan formaldehida 98% netral, kemudian asam amino anion dititrasi dengan larutan standar NaOH samapi terjadi perubahan warna merah muda.

Analisis Hasil

Data hasil analisa asam amino dari berbagai metoda dikonversikan menjadi N-Protein berdasarkan kandungan N dalam masing-masing asam amino. Metoda dengan faktor korelasi (r) tertinggi menggunakan *least square analysis* terhadap korelasi N-Total versus N-Protein, dianggap sebagai metoda terpilih. Kadar protein sampel adalah jumlah asam amino tertetapan, dan faktor konversi yang dihitung dengan persamaan regresi linier.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Estimasi Kadar N Total secara Kjehldahl

Tabel I. Hasil Penetapan Nitrogen Total secara Kjehldahl

Sampel	Kode	N ₂ Total (%) ± SD
Air Susu Sapi	ASS-C	0,15 ± 0,04
Serbuk Susu Kerbau	SSK-S	1,90 ± 0,23
Susu Kedelai	SKD	1,20 ± 0,14
Tahu Kedelai	THK	0,51 ± 0,08
Serbuk Putih Telur	PTA	5,10 ± 1,1

N-total yang tertetapan adalah jumlah dari N-non protein dan N-protein. Sampel bahan makanan diatas digunakan oleh masyarakat luas sebagai sumber protein karena kandungannya yang cukup tinggi. Susu sapi pada umumnya terdiri dari ±86-90% air, 3-5% lemak, 3-4% protein, 4-5% laktosa. Putih telur pada

dasarnya adalah larutan protein dalam air dengan konsentrasi $\pm 12\%$.

Kandungan protein dalam kedelai berkisar antara 32-46% protein (Fennema, 1976). Informasi mengenai kandungan protein diatas diperoleh dari konversi N-total dengan bilangan 6,25. Untuk jaringan tanaman, informasi ini kurang tepat, karena disamping protein, jaringan tanaman mungkin mengandung senyawa amina lain seperti asparagin dan glutamin, juga senyawa nitrogen seperti purin, pirimidin, nukleosida, nukleotida, betain, alkaloid, porfirin dan asam amino non protein. Meskipun penetapan kadar protein melalui metoda Kjeldahl diketahui kurang tepat, metoda ini masih digunakan secara luas. Hal ini disebabkan oleh kemampuan metoda tersebut dalam menghasilkan data N-Total yang dapat dipercaya dengan perangkat analisis yang sederhana dan tidak memerlukan keahlian khusus untuk melakukannya.

Estimasi Kadar Asam Amino secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC)

Kadar asam amino sampel yang ditetapkan secara HPLC-ninhidrin dengan alat analisis asam amino Beckman 118 B1 didapat kromatogram (gambar 1). sedangkan kadar asam amino yang ditetapkan secara HPLC-OPA dengan perangkat Beckman didapat kromatogram gambar 2.

Gambar 1. Kromatogram asam amino standar yang dinalisis dengan alat *Amino Analyzer*

Keterangan: 1= asam aspartat. 2= Treonin 3=Serin 4. Asam. Glutamat 5= Glisin 6= Alanin 7=Valin 8= Metionin 9=Isoleusin 10=Leusin 11=Tirosin 12=Fenilalanin 13=Histidin 14=Lisin 15=Amonia 16. Arginin.

Estimasi Kadar Asam Amino Secara Kromatografi Gas

Kendala yang dihadapi dalam melakukan analisis asam amino secara kromatografi gas terletak pada derivatisasi asam amino. Ternyata tidak semua asam amino dapat terderivatisasi. Dari 18 asam amino esensial standar, hanya 8 (yaitu tirosin, arginin, alanin, sistein, leusin, serin, prolin, dan lisin) yang dapat terderivatisasi dan terdeteksi dalam sistem kromatografi gas dengan dua jenis kolom dengan fasa diam yang berbeda polaritasnya: fasa diam EGA yang bersifat polar dan fasa diam OV101 yang bersifat kurang polar. Karena metoda penetapan kadar asam amino dengan kromatografi gas memberikan validitas, (ketepatan,

Sumarno

ketelitian, selektivitas dan kepekaan yang rendah, penetapan kadar asam amino dengan metoda ini tidak dilanjutkan.

Gambar 2. Kromatogram asam amino standar yang dianalisis dengan HPLC dan pereaksi OPA
Keterangan : 1= As. Aspartat 2=As. Glutamat 3=Serin 4=Histidin 5=Glisin 6=Treonin
7=Arginin 8=Alanin 9=Tirosin 10=Metionin 11=Valin 13=Fenilalanin 14=leusin 15= Lysin

Metoda Analisis Asam Amino Terpilih

Tabel II. Kandungan N dan protein (merupakan jumlah asam amino hasil analisis)

Sampel	Kandungan Protein (mg) dari tiap satu gram sampel				
	Kjehldahl (Jumlah N)	HPLC engan Ninhidrin	HPLC dengan OPA	Titration Formol	Faktor Konversi
Air Susu Ibu 1	-	3,82	0,31	3,61	6,95
Air Susu Ibu 2	-	0,55	0,05	-	
Air Susu Sapi 1	10,28	8,77	0,31	-	
Serbuk Susu sapi 2	-	-	42,21	35,19	
Tahu Kedele	35,44	34,82	24,50	222,00	8,79
Serbuk Susu Kedele	83,40	82,07	5,34	-	
Serbuk Susu Kerbau	163,29	162,84	16,06	118,61	8,79
Serbuk Putih telur	438,31	437,42	28,60	13,26	6,95-8,79

Estimasi Kadar Protein melalui Kadar Asam Amino Total secara Titration Formol

Hasil analisa kadar protein dengan cara ini tercantum dalam Tabel VI. Metoda ini diikuti sertakan dalam studi banding cara penetapan kadar asam amino karena peralatan yang digunakan sederhana dan tidak

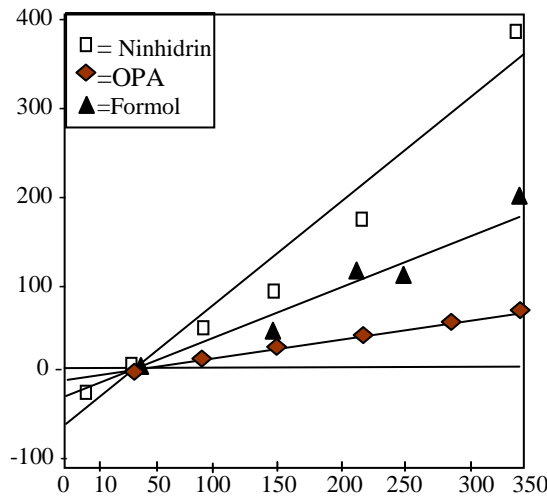
diperlukan kemampuan khusus untuk melakukannya. Tetapi dari hasil yang diperoleh jelas terlihat bahwa data titrasi formol sangat berbeda baik terhadap data HPLC-ninhidrin maupun data HPLC-OPA, sehingga cara ini dianggap tidak dapat digunakan.

Dari kelima metoda penetapan kadar asam amino yang dilakukan dalam penelitian ini, yaitu metoda HPLC-ninhidrin, metoda HPLC-OPA, metoda HPLC-dansil, metoda kromatografi gas dengan derivatisasi TFA-butanol, dan metoda titrasi formol, ternyata hanya metoda HPLC-ninhidrin yang mempunyai kolerasi nyata ($r= 0,9992$) antara N-protein sebagai asam amino dan N-total. Oleh karena itu metoda penetapan kadar asam amino HPLC-ninhidrin dianggap sebagai metoda terpilih (Tabel II)

Estimasi Faktor Konversi Protein dengan N – total

Pada gambar 3 terlihat adanya kolerasi linier antara kadar N-total, N-protein dan protein. Untuk mendapatkan faktor konversi yang tepat, dilakukan regresi linier terhadap data kadar N-total (sebagai x) dan kadar protein dari metoda HPLC-ninhidrin (sebagai y). Persamaan yang diperoleh :

$$y = -10,18 + 8,77 x$$

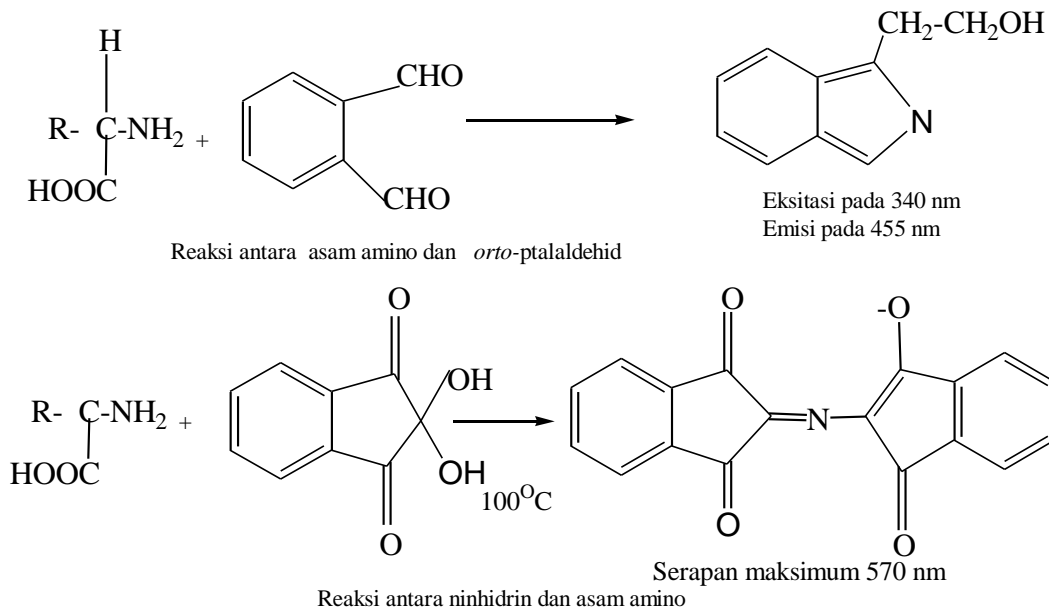


Gambar 3. Hubungan kadar N-total dan protein berdasarkan asam amino dalam sampel

Faktor konversi yang diperoleh adalah 8,77. Bila faktor konversi ini diaplikasikan terhadap kadar N-total sampel, kadar protein yang diperoleh mempunyai perbedaan cukup besar dari kadar protein HPLC-ninhidrin. Pada kadar kecil, perbedaan mencapai 30 %. Hal ini menunjukkan bahwa faktor konversi tersebut hanya berlaku untuk suatu kisaran yang sempit. Perbedaan ini akan lebih kecil apabila regresi dilakukan terhadap data dengan N-total rendah (1,48 sampai dengan 12,00) dan data dengan N-total tinggi (19 sampai dengan 51). Untuk N-total rendah diperoleh faktor konversi 6,95, sedangkan faktor konversi untuk N-total tinggi : 8,59, sebagai contoh terlihat pada persamaan kurva regresi linier normal.

Aplikasi kedua faktor konversi tersebut tercantum dalam Tabel II, Terlihat bahwa persentase perbedaan kadar protein yang ditetapkan melalui N-total terhadap kadar protein melalui asam amino secara HPLC-ninhidrin relatif rendah, kecuali pada sampel dengan kadar N-total terendah (17%).

Dari penelitian ini juga terlihat bahwa faktor konversi tidak dipengaruhi oleh jenis sampel. Hal ini dimungkinkan karena kandungan protein dalam sampel tinggi, sehingga kesalahan yang ditimbulkan oleh adanya N-non protein relatif kecil dan dapat diabaikan. Kemungkinan yang lain adalah sebagian besar hasil hidrolisa senyawa N-non protein berupa asam amino sehingga memperbesar jumlah asam amino, sehingga pada pereaksi ninhidrin menunjukkan respon yang tinggi dibanding respon OPA



Mengamati reaksi yang terjadi, ternyata ninhidrin lebih baik hasilnya, hampir semua asam amino dapat terdeteksi dengan kadar tinggi, sebab dengan adanya pemanasan mempercepat reaksi, sedangkan dengan pereaksi OPA kurang reaktif sehingga jumlah asam amino yang didapat lebih kecil (Tabel II). Kalau dilihat dari kepekaan dengan pereaksi OPA menunjukkan hasil dengan angka yang lebih rendah dapat terdeteksi, sedangkan pada penggunaan pereaksi ninhidrin tidak dapat terdeteksi. Hal ini karena pereaksi OPA digunakan detektor flourometer maka lebih peka.

Bilangan perpindahan penggunaan kedua faktor konversi tersebut ditentukan dengan mengambil titik tengah antara N-total 12,00 dan 19,00, yaitu 15,5, karena perbedaan pada kisaran tersebut kecil.

KESIMPULAN

Metoda analisis asam amino secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan pereaksi ninhidrin pasca kolom, merupakan metoda terpilih.

Validitas (keteletian, ketepatan, selektivitas dan kepekaan) hasil analisis asam amino secara kromatografi gas dengan derivatisasi TFA-butanol, relatif rendah.

Adanya korelasi antara kadar N-total, N-protein dan protein sebagai asam amino, memungkinkan estimasi kadar protein melalui kadar N-total.

Faktor konversi protein – N – total untuk N-total <15,5 adalah 6,95 dan untuk N-total >15,5 adalah 8,59.

DAFTAR PUSTAKA

- Bodanszky M., 1993, *Chemistry of Peptide*, Springer-Verlag, Berlin 47-52
- Fennema, O.W., 1976, *Principles of Food Science, Food Chemistry*, Part I, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Grob, R.L., 1977, *Modern Practice of Gas Chromatography*, John Willey & Sons, New York.
- Latupeiressa, S.B., Hadi, H., dan Susilowati., 2000, Perilaku Ibu Hamil Kurang Energi Kronik dalam Program Pemberian Makanan Tambahan Pemulihan di Kecamatan Wates dan Temon N Kabupaten Kulon Progo. *Sins Kesehatan* 13 1-14.
- Lehninger, A.L., 1975, *Biochemistry, The Moleculare Basis of Cell Structure and Function*, 2nd. Ed., Worth

- Publisher Inc.
- Linder M.C., 1992, *Biokimia, Nutrisi dan Metabolisme* (diterjemahkan oleh Aminuddin dan Amwila A,Y). Universitas Indonesia Press. Jakarta 89-115.
- Lottspeich, F., A. Henschen, K.P. Hupe (Editors), 1981, *High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry: Proceedings of International Symposium, January 1981, at Max-Planck-Institute for Biochemistry, Munich, Walter de Gruyter, Berlin.*
- Lydia,K, 1997, Kadar Albumin Serum dan Faal Ginjal Anak, *Bul.Penel, Kes 25*, 20-26
- Maynard, L.A., J.K. Loosli, H.F. Hintz, R.G. Warner, 1984, *Animal Nutrition*, 7th edition, Tata McGraw – Hill Pub. Co. Ltd, New Delhi.
- Sihadi, 1998/1999, Beberapa Faktor yang Berhubungan dengan Gizi dari Gizi Buruk Menjadi Gizi Kurang di Klinik Gizi Bogor (KGB), 1982-1997, *Bul Pen. Kes.26* 47-62.
- Smith, R.M., 1988, *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*, John Willey & Sons, Chichester.
- Sya'bani, M, 1998, Arti Klinis Pemeriksaan Albumin Serum Sebagai Pertanda Progres Malnutrusi dengan Metode Brom Cresol Green (BCG), dan Elektroforesis pada Penderita Hemodialisis Rutin, *B.I.Ked. 30* , 181-187

Tabel IV Hasil Analisis Asam Amino dalam Beberapa Sampel dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi pasca kolom *Ortoftalaldehid* (PTA)

Sampel	Susu sapi	B.Susu kerbau	B.Susu Kerbau F	B. Susu Kedele	Air susu ibu 1	Air susu Ibu 2	Tahu Kedele	Serbuk putih telur
Kode As. amino	ASS-C	ASK-S	ASK-F	ASI-1	ASI-2	SKD	THK	PTA
Alanin	32	364	721	378	ND	3	328	2482
Arginin	21	469	644	710	17	2	ND	2215
Asparagin	18	500	353	806	17	2	1373	3247
Sistein	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glutamin	12	1317	875	1036	27	3	2609	4978
Glisin	53	329	365	324	15	5	481	1445
Histidin	18	ND	ND	57	10	1	ND	949
Isoleusin	19	56	1833	403	28	5	279	1586
Leusin	9	112	520	186	3	1	354	875
Lisin	7	139	996	ND	16	8	2163	662
Metionin	40	2063	3429	690	16	4	2471	4262
Fenilalanin	65	2308	804	ND	58	6	6716	762
Prolin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Serin	21	259	535	339	7	2	479	1906
Tironin	18	73	433	901	10	2	ND	4531
Tirosin	24	198	478	200	23	3	823	585
Valin	13	2779	4079	200	63	ND	6422	1116

Tabel V. Hasil Analisis Asam Amino dalam Beberapa Sampel dengan alat Analisis Asam Amino (*Amino Acid Analyzer*), Beckman Model 118 BL “

Sampel	Susu sapi	B.Susu kerbau	B.Susu Kerbau F	B. Susu Kedele	Air susu ibu 1	Air susu Ibu 2	Tahu Kedele	Serbuk putih telur
Kode As. amino	ASS-C	ASK-S	ASK-F	ASI-1	ASI-2	SKD	THK	PTA
Alanin	1128	9253		1891	200	196	3938	50562
Arginin	ND	ND		16417	ND	ND	ND	33539
Asparagin	907	15852		ND	585	150	2943	38550
Sistein	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND
Glutamin	ND	28576		2702	788	ND	464	7863
Glisin	297	5224		938	215	ND	2489	19163
Histidin	808	6137		5118	123	ND	ND	ND
Isoleusin	ND	9879		ND	250	ND	3425	ND
Leusin	ND	17306		ND	403	ND	5797	ND
Lisin	1612	ND		13168	ND	ND	6461	ND
Metionin	ND	2876		8051	ND	ND	485	24651
Fenilalanin	ND	9236		6768	165	ND	5695	ND
Prolin	1626	20289		ND	ND	ND	ND	ND
Serin	606	8332		ND	194	98	3485	38947
Tironin	522	7486		8104	202	ND	3949	44616
Tirosin	ND	10481		1574	459	ND	626	ND
Valin	1267	11710		8749	234	104	3666	59823

Sumarno