



# 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: primer, sekunder, tersier, kuarterner

# 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
- Reaksi spesifik asam amino tertentu dengan suatu reagen (misal metode Lowry: reaksi tirosin dan triptofan dengan fosfotungstat-fosfomolibdat)

- Reaksi antara protein dengan suatu senyawa seperti metode fenol (protein bereaksi dengan fenol)
- Metode spektrofotometri: absorpsi spesifik protein pada panjang gelombang uv misal 280 nm
- Turbidimetri: berdasarkan kekeruhan
- dll

# 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
- Misal:
- Protein gandum : 5.70
- Protein susu : 6.38
- Gelatin : 5.55

# 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  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CO$
- Unsur N berubah menjadi amonium sulfat  $(NH_4)_2SO_4$
- 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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dan  $\text{HgO}$  (20:1)
  - $\text{K}_2\text{SO}_4$
  - $\text{CuSO}_4$

# 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  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) dititrasi dengan NaOH
- Jika digunakan indikator PP akhir titrasi adalah perubahan larutan menjadi merah muda permanen (dari asam ke basa) atau jika digunakan MR larutan berubah menjadi kuning
- Dibuat 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/ $\text{HBO}_3$  (asam lemah), banyaknya asam borat yang bereaksi dengan amonia dapat diketahui dengan titrasi dengan  $\text{HCl}$  0.1 N dengan indikator MR+BCG
- $\text{HCl}$  akan mentitrasi amonium-borat menjadi amonium klorida sehingga pada akhir titrasi terjadi kelebihan  $\text{HCl}$ /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

$$\text{Kadar protein (\%)} = \text{Kadar N} \times \text{FK}$$

# 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  $\text{Cu}^{2+}$ /kupri pada kondisi alkali

# 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

# KADAR N-AMINO (METODE TITRASI FORMOL)

- Digunakan untu mengukur kadar n-amino
- Dapat digunakan untuk mengukur tingkat hidrolisis protein
- Reaksi antara formol dengan gugus amino tetapi tidak dapat membedakan antara gugus amino dengan gugus amin yang lain



# Prinsip analisis

- Larutan protein dinetralkan dengan basa NaOH kemudian ditambah formalin
- Formalin akan bereaksi dengan gugus amino dari protein atau asam amino membentuk dimethilol
- Gugus karboksil tetap bebas (COOH)
- Gugus karboksil bebas ditentukan jumlahnya dengan titrasi menggunakan larutan NaOH

# Perhitungan

Titration formol = vol. titration second – vol. titration blank

$$\% \text{ N} = \frac{\text{titration formol}}{\text{g material} \times 10} \times \text{N NaOH} \times 14.008$$