

FOOD CHEMISTRY

PROTEIN ANALYSIS

By. Jaya Mahar Maligan
Laboratorium Nutrisi Pangan dan Hasil Pertanian
Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
FTP - UB
2014

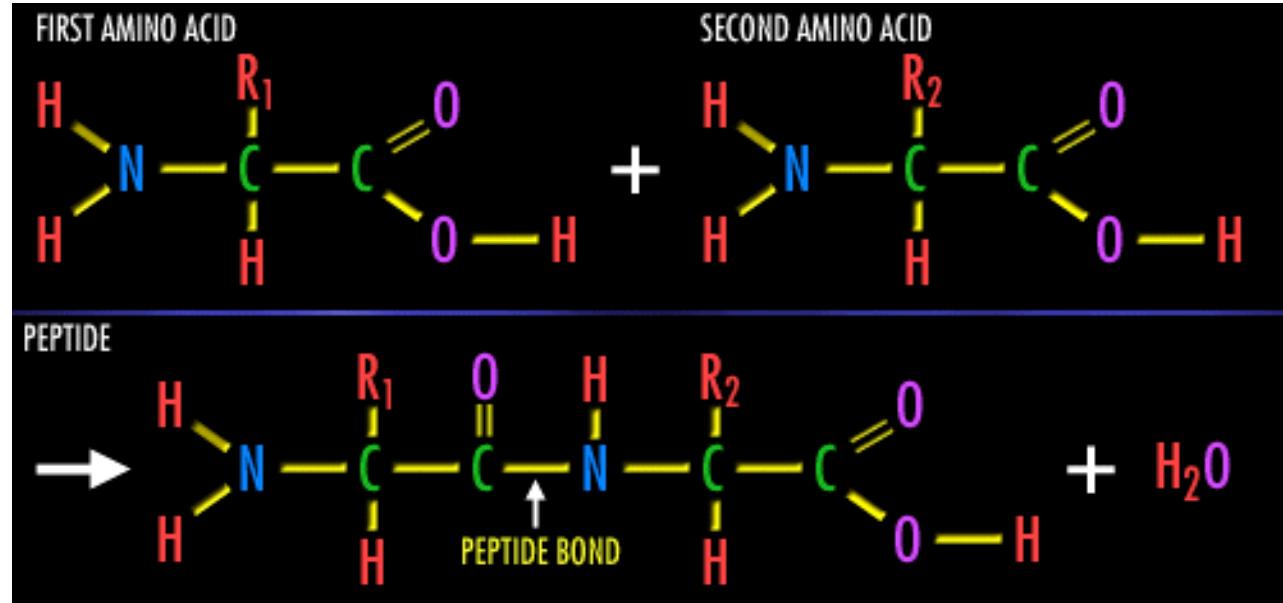


Protein

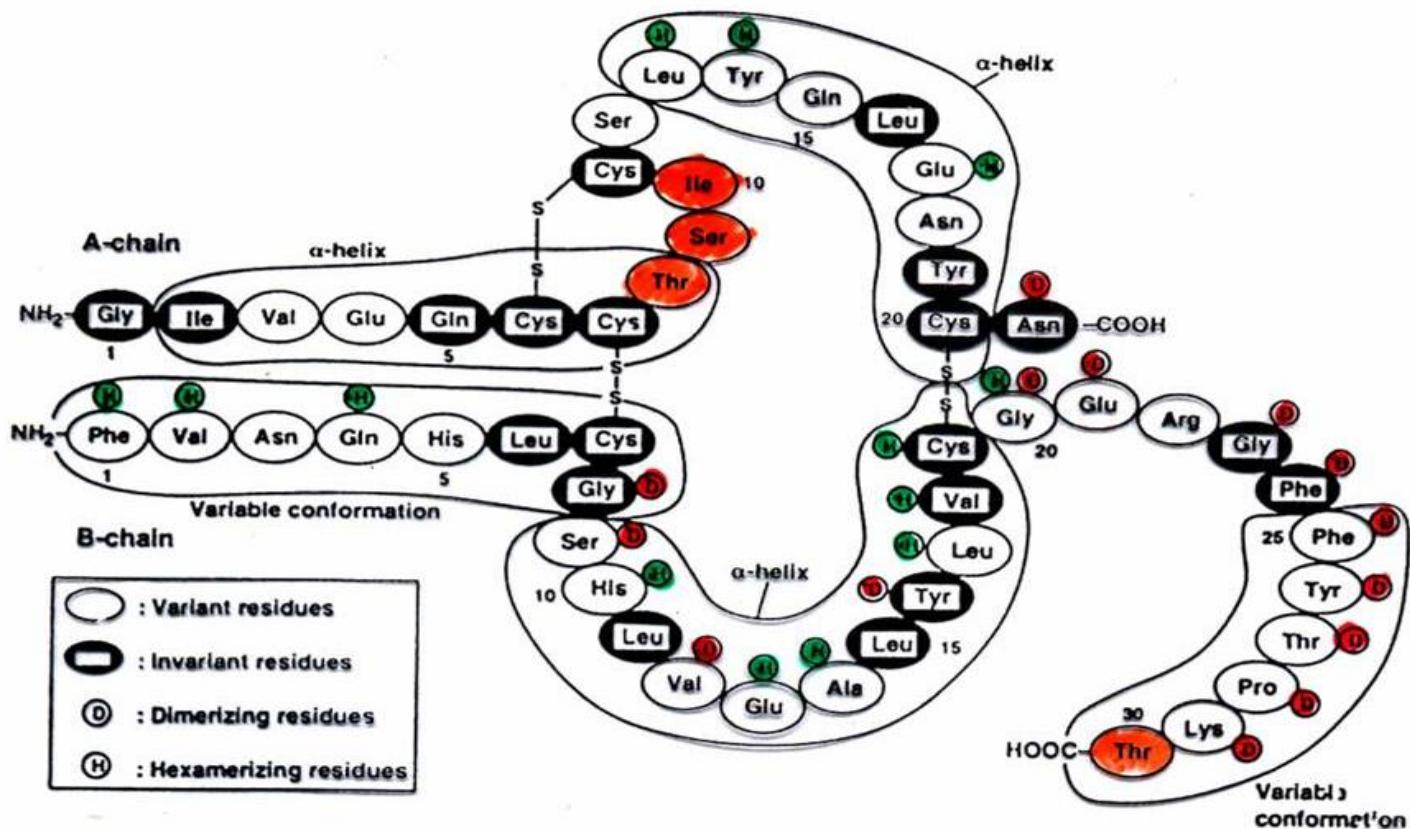


- Complex Nutrition compound that contains of Nitrogen molecule, composed from amino acids with peptide bond.
- Protein has amina group (NH_2) -> distinguished from Carbohydrate and Lipid
- Synthesize in plant and animal tissue

Protein



Protein



Protein Function



1. Essential for growth and tissue care
2. Essential compound precursor (enzyme, hormone, hemoglobin, neurotransmitter)
3. Control body liquid balance (intracellular liquid, extracellular liquid and intravascular liquid)

Protein Function



4. Maintain accumulation of acid/base
5. Stimulate antibody production
6. Nutrient transporter (carrier protein)
7. Energy source (4kkal/gr)

Protein Classification



Source :

1. Endogen protein : body tissue
2. Eksogen protein : diet

Synthesize :

1. Essential protein
2. Non essential protein

Protein Classification



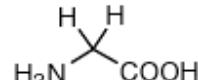
- Essential :
Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Thr, Lis, His, Met
- Conditional Essential :
Pro, Ser, Arg, Cys, Gly, Tyr
- Non Essential :
Ala, Gln, Glu, Asp, Asn

Protein Classification

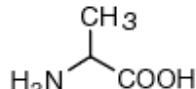


Amino Acid Precursor

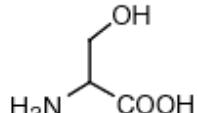
- Met, Ser : Cys
- Phe : Tyr
- Glu, Gln, Asp : Arg
- Glu : Pro
- Ser : Gly

Small

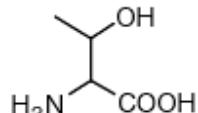
Glycine (Gly, G)
MW: 57.05



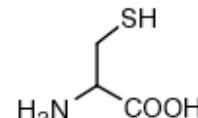
Alanine (Ala, A)
MW: 71.09

Nucleophilic

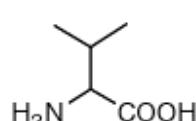
Serine (Ser, S)
MW: 87.08, pK_a ~ 16



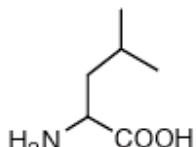
Threonine (Thr, T)
MW: 101.11, pK_a ~ 16



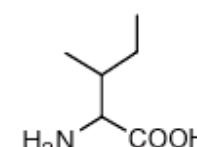
Cysteine (Cys, C)
MW: 103.15, pK_a = 8.35

Hydrophobic

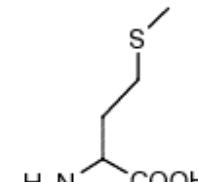
Valine (Val, V)
MW: 99.14



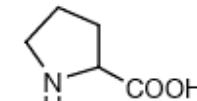
Leucine (Leu, L)
MW: 113.16



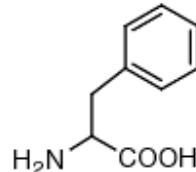
Isoleucine (Ile, I)
MW: 113.16



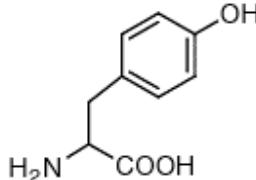
Methionine (Met, M)
MW: 131.19



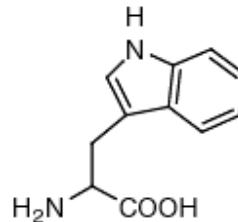
Proline (Pro, P)
MW: 97.12

Aromatic

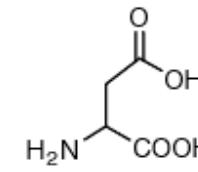
Phenylalanine (Phe, F)
MW: 147.18



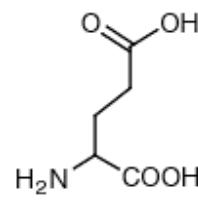
Tyrosine (Tyr, Y)
MW: 163.18



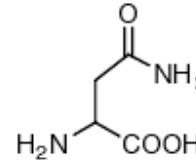
Tryptophan (Trp, W)
MW: 186.21

Acidic

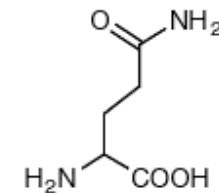
Aspartic Acid (Asp, D)
MW: 115.09, pK_a = 3.9



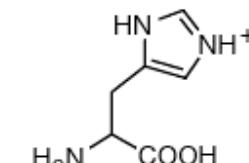
Glutamic Acid (Glu, E)
MW: 129.12, pK_a = 4.07

Amide

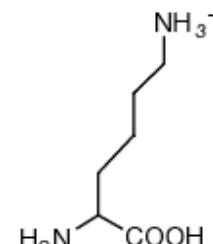
Asparagine (Asn, N)
MW: 114.11



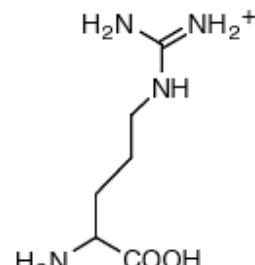
Glutamine (Gln, Q)
MW: 128.14

Basic

Histidine (His, H)
MW: 137.14, pK_a = 6.04



Lysine (Lys, K)
MW: 128.17, pK_a = 10.79



Arginine (Arg, R)
MW: 156.19, pK_a = 12.48

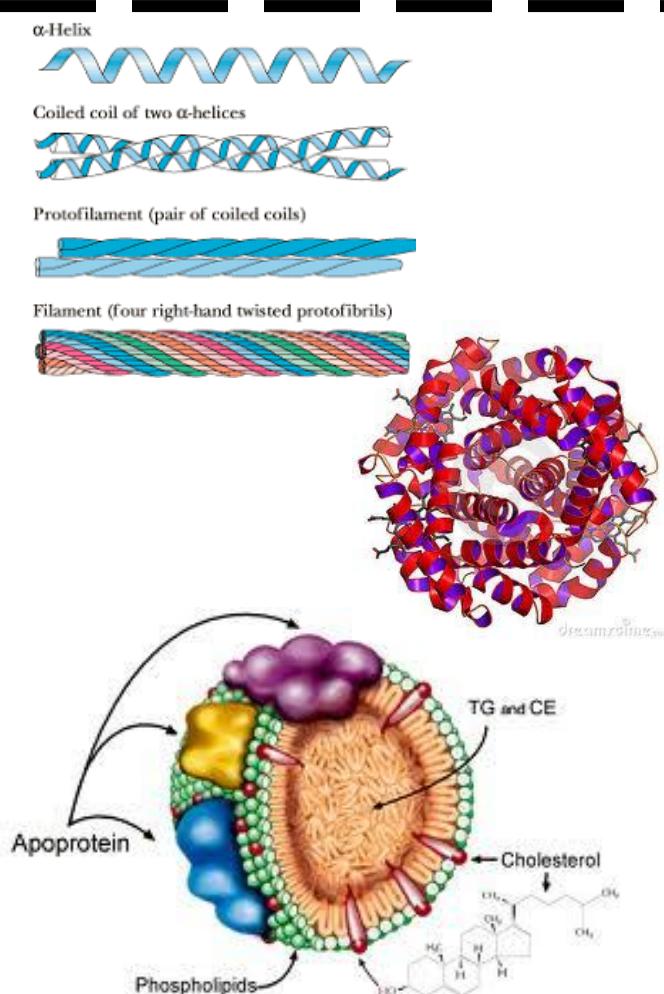
Protein Classification



Amino Acid Function :

- Incomplete protein
ex. Zein (jagung)
- Complete protein
ex. Glisin (soy), glutenin (wheat), animal prot
- Partially complete protein
ex. Gliadin (wheat), legumin (beans)

Protein Classification



Protein Form:

- Fibrous : higher mechanical stress, low solubility
ex. Collagen, elastin, keratin, miosin
- Globular : more soluble, easy denatured
ex. Albumin, globulin, histon, protamin
- Conjugated protein (bounded to prosthetic groups)
ex. Lipoprotein, phosphoprotein, nucleoprotein

Protein Structure



primary structure
(amino acid sequence)



**secondary structure
(α -helix)**



tertiary structure
(folded individual peptide)



quaternary structure
(aggregation of two or more peptides)

Protein Denaturation



Denaturation

- is a process in which proteins lose the tertiary structure and secondary structure then present in their native state,
- by application of some external stress or compound such as a strong acid or base, a concentrated inorganic salt, an organic solvent (e.g., alcohol or chloroform), or heat
- Increase the protein digestibility



Nutrition Value of Protein

Based on :

- Essential amino acid
- Amino acid balance
- Fitness to purpose
- Digestibility
- Protein content



Protein Digestibility

Influenced by :

- Processing technique
- Anti-nutrition compound
- Reaction between protein and another compound



Nilai Gizi Protein

1. Amino acid

- Essential Amino Acid
- Amino acid balance
- Limiting Amino Acid

Nuts : metionin, Cerealia : lisin



Evaluasi Nilai Gizi Protein

1. Teoritis

nilai biologis suatu protein dibatasi oleh proporsi relative asam amino esensial yang terkandung di dalamnya

- Skor Asam Amino
membandingkan kandungan AA antara bahan uji dengan protein patokan (AA yg paling defisien)
- PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score)
Peringkat kualitas protein ditentukan dengan cara membandingkan profil asam amino protein dari makanan tertentu terhadap standar profil asam amino



- Skor Asam Amino

= mg AA per gram protein uji x 100
mg AA yang sama per gram protein patokan

- PDCAAS = Skor AAE terendah x DC prot sejati

Protein	PER	Digestibility	AAS	PDCAAS
Egg	3.8	98	121	118
Cow's milk	3.1	95	127	121
Beef	2.9	98	94	92
Soy	2.1	95	96	91
Wheat	1.5	91	47	42



Evaluasi Nilai Gizi Protein

2. In Vitro

- Uji invitro : murah, singkat
- Penentuan aktivitas antitripsin dan antikimotripsin
(Berdasarkan penurunan aktivitas hidrolisis tripsin pada suatu substrat)
- Penentuan aktivitas hemaglutinin
(aktivitas hemaglutinin ekstrak kacang-kacangan didasarkan pada kemampuannya untuk mengaglutinasi sel darah merah)
- Penentuan daya cerna protein
(pepsin-tripsin, pepsin-pankreatin dan teknik multienzim : tripsin, kimotripsin dan peptidase)



Evaluasi Nilai Gizi Protein

3. In Vivo

Uji invivo : hewan coba & manusia
(biologis)

- Protein Efficiency Ration (PER)
- Net Protein Ratio (NPR)
- Biological Value (BV)
- Net Protein Utilization (NPU)
- Daya Cerna Sejati (DC Sejati) / True digestibility



Evaluasi Nilai Gizi Protein

PER

- Metode ini dikembangkan oleh Osborne, Mendel dan Ferry tahun 1919, merupakan evaluasi nilai gizi protein yang banyak digunakan.
- Telah ditetapkan sebagai metode resmi FDA untuk penetapan mutu protein dalam *nutrition labelling*.
- PER dilakukan selama 28 hari pada hewan coba tikus, menggunakan jenis pakan standart (AIN/ANRC).



Evaluasi Nilai Gizi Protein

PERHITUNGAN PER →

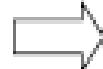
PER = Pertambahan berat badan
Jumlah protein yang dikonsumsi



Perhitungan PER ⇒ dihitung untuk tiap ekor tikus
rata-ratanya untuk tiap group/kelompok.



Nilai PER kontrol
(ransum kasein)
atau PER kasein dikoreksi



$\frac{2.5}{\text{PER kasein yang diperoleh}}$



Evaluasi Nilai Gizi Protein

PER

- PER sampel = perub BB / jumlah protein konsumsi
- PER kasein terkoreksi = $2.5 / \text{PER kasein teranalisis}$
- PER terkoreksi = PER sampel / PER kasein terkoreksi



Evaluasi Nilai Gizi Protein

NPR

- NPR dikembangkan untuk memecahkan masalah teoritis pada PER, dimana dalam penetapan PER semua protein yang dikonsumsi diasumsikan digunakan semua untuk pertumbuhan, tidak mengantisipasi fungsi protein pemeliharaan.
- Pelaksanaan NPR sama dengan PER, hanya terdapat grup tikus yang diberi ransum non protein dan lama waktu NPR hanya 10 hari

$$NPR = \frac{\text{Pertambahan berat} \\ (\text{protein yang diuji}) - \text{Penurunan berat} \\ (\text{non protein})}{\text{Konsumsi protein yang diuji}}$$



Evaluasi Nilai Gizi Protein

BV, DC dan NPU

- Metode ini dikembangkan untuk mengevaluasi protein secara biologis dengan menggunakan subjek manusia, namun pada perkembangan selanjutnya metode BV ini diadopsi untuk dilakukan pada hewan coba tikus



Evaluasi Nilai Gizi Protein

$$BV = \frac{N_{konsumsi} - (N_{feses} - N_{metabolik}) - (N_{urin} - N_{endogen})}{N_{konsumsi} - (N_{feses} - N_{metabolik})}$$

$$D = \frac{N_{konsumsi} - (N_{feses} - N_{metabolik})}{N_{konsumsi}}$$



Evaluasi Nilai Gizi Protein

NPU

perbandingan antara jumlah nitrogen yang diretensi dalam tubuh dengan jumlah nitrogen yang dikonsumsi.

$$\text{NPU} = \frac{\text{N konsumsi} - (\text{N feses} - \text{N metabolik}) - (\text{N urine} - \text{N endogen}) \times 100}{\text{N yang dikonsumsi}}$$



Analisis Protein

Prinsip:

- Pengukuran jumlah atau kadar N dalam bahan pangan
- Reaksi spesifik suatu senyawa/reagen dengan ikatan peptida

Metode:

- Kualitatif : Biuret, Ninhidirin
- Kuantitatif : Kjeldahl, Biuret, Titrasi Formol



Metode Kjeldahl

- Analisis protein kuantitatif protein tak langsung
- Penentuan protein kasar (crude protein)
- Pengukuran kadar N dalam bahan pangan
- Tahapan : destruksi, destilasi, titrasi
- Kadar Protein = Kadar N x faktor konversi
- Faktor konversi : $100/16 = 6.25$ (umum)



Metode Kjeldahl

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



Metode Kjeldahl

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



Metode Kjeldahl

1. Tahap Destruksi

- Tujuan : melepaskan nitrogen dari protein
- Sampel dipanaskan dalam larutan asam sulfat pekat
- Unsur C dan H teroksidasi menjadi H_2O , CO_2 , CO
- Unsur N berubah menjadi amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Asam sulfat juga mendestruksi KH dan lemak



Metode Kjeldahl

1. Tahap Destruksi

- Diperlukan katalisator untuk mempercepat proses destruksi
- Tujuan : Mempertinggi titik didih asam sulfat, Suhu destruksi lebih tinggi (370-410 C)

Jenis:

- Campuran Na₂SO₄ dan HgO (20:1)
- K₂SO₄
- CuSO₄



Metode Kjeldahl

2. 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



Metode Kjeldahl

3. Tahap titrasi

- Jika larutan asam penampung yang digunakan HCl, sisa asam klorida yang tidak bereaksi dengan amonia (membentuk NH₄Cl) dititrasi dengan NaOH
- Jika digunakan indikator PP akhir titrasi adalah perubahan larutan menjadi merah muda permanen (dari asam ke basa)
- atau jika digunakan indikator MR larutan berubah menjadi kuning
- Buat titrasi untuk blanko (tanpa sampel)



Metode Kjeldahl

3. Tahap titrasi

- Jika larutan asam penampung yang digunakan HCl, sisa asam klorida yang tidak bereaksi dengan amonia (membentuk NH₄Cl) dititrasi dengan NaOH
- Jika digunakan indikator PP akhir titrasi adalah perubahan larutan menjadi merah muda permanen (dari asam ke basa)
- atau jika digunakan indikator MR larutan berubah menjadi kuning
- Buat titrasi untuk blanko (tanpa sampel)



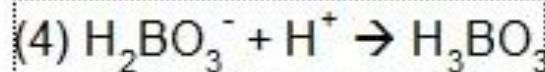
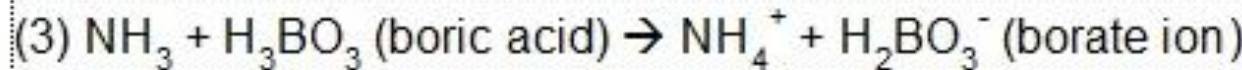
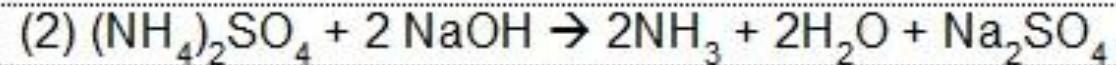
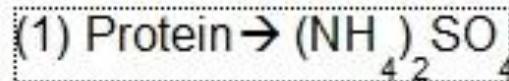
Metode Kjeldahl

3. Tahap titrasi

- Jika larutan penampung adalah asam borat/HBO₃ (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



Metode Kjeldahl





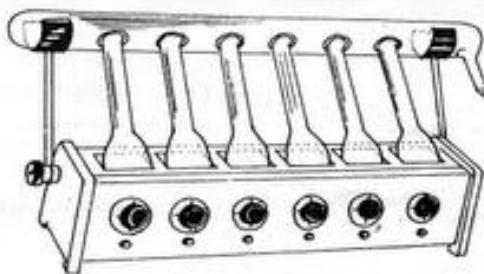
Metode Kjeldahl

Perhitungan

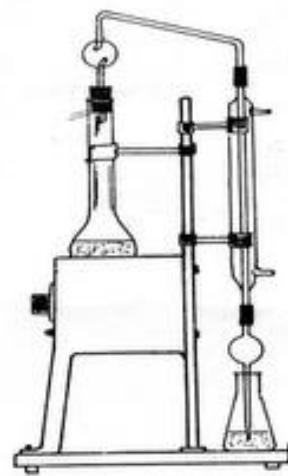
- $$\% \text{ N} = \frac{\text{ml NaOH (blanko-sampel)} \times \text{N NaOH} \times 14.008}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$
- Kadar protein : % N x faktor konversi



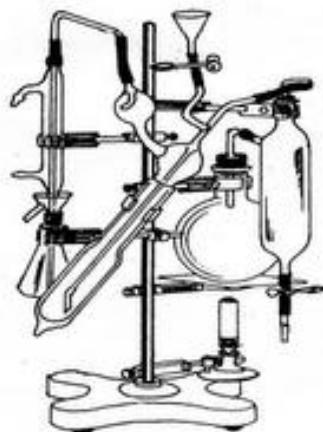
Metode Kjeldahl



Gambar 19a. Pendidihan (destruksi) bahan dalam labu Kjeldahl



Gambar 19b. Alat distilasi



Gambar 19c. Alat distilasi mikro Kjeldahl





Metode Biuret

- Pengukuran jumlah ikatan peptida dalam protein
- Semakin tinggi kadar protein bahan, jumlah ikatan peptida semakin banyak

Prinsip analisis:

- bahan yang mengandung ikatan peptida dua atau lebih membentuk kompleks berwarna ungu dengan ion Cu²⁺/kupri pada kondisi alkali



Metode Biuret

Keunggulan

- Pengukuran kadar protein (*direct method*)
- Mendeteksi ikatan peptida protein (spesifik)
- Tidak mendeteksi nitrogen dr senyawa non peptida
- Sederhana, cepat, murah

Tahapan analisis:

- Pembuatan kurva standart, preparasi, penetapan sampel dg spektrofotometer, perhitungan



Metode Biuret

Keunggulan

- Pengukuran kadar protein (*direct method*)
- Mendeteksi ikatan peptida protein (spesifik)
- Tidak mendeteksi nitrogen dr senyawa non peptida
- Sederhana, cepat, murah



Metode Biuret

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 masing2 sebanyak 4 ml.
- Tambahkan 6 ml pereaksi Biuret ke dalam masing2 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.



Metode Biuret

Preparasi sampel

- Timbang sampel padat. Hancurkan sampel padat dengan menggunakan waring blender. Hancuran yang diperoleh disaring lalu disentrifugasi.
- Supernatandidekantasi 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 menganggu seperti glukosa maka harus dilakukan perlakuan sebagai berikut:



Metode Biuret

- 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 masingmasing tabung reaksi sehingga protein akan terdenaturasi.
- Sentrifusa pada 3000 rpm selama 10 menit sampai protein yang terdenaturasi mengendap, supernatan dibuang dengan cara dekantasi.



Metode Biuret

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



Studi Kasus

1. Jelaskan bagaimana kecernaan protein untuk produk dendeng dan tauge !
2. Hitung nilai PER terkoreksi dari bahan XY jika diketahui PER kasein teranalisis 2,35. Perubahan berat badan tikus rata-rata dari 213 g menjadi 249 g selama masa pemeliharaan 30 hari dengan asupan pakan XY. Rerata jumlah konsumsi pakan 19.5 gr/hari dan kadar protein bahan XY adalah 76%.
3. Jelaskan arti nilai PER dari soal no 2 tersebut!
4. Tentukan nilai NPR soal no. 2 jika diketahui pada kelompok kontrol terjadi penurunan BB tikus sebanyak 5 gr selama masa pemeliharaan!



Studi Kasus

5. Jika berat sampel susu bubuk yang digunakan 1.49 g dalam analisis protein (kjeldahl) dan jumlah larutan NaOH (0.9 N) yang dibutuhkan untuk titrasi sampel adalah 0.28 ml dan untuk blanko 40.56 ml, berapa kadar protein sampel?
6. Konsentrat protein kacang tunggak sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 10 ml akuades. Kemudian 1 ml larutan sampel tersebut diencerkan menjadi 100 ml. Sebanyak 1 ml sampel digunakan untuk penetapan protein dengan metode Biuret. Jika absorbansi adalah 1,08 berapa kadar protein dalam konsentrat tersebut (%b/b)?



Studi Kasus

Tabel absorbansi (soal no 6) sebagai berikut

Volume (ml)	A
0	0.01
0.1	0.23
0.2	0.47
0.4	0.62
0.6	0.85
0.8	1.06
1.0	1.28

7. Jelaskan prinsip analisis protein metode lowry dan titrasi formol!

