

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Hasil Penelitian Terdahulu

Rediatning dan Kartini (1987) yang melakukan analisis asam amino dengan menggunakan KCKT secara derivatisasi prakolom dan pasca kolom. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum proses analisis asam amino dengan kromatografi cair kinerja tinggi secara derivatisasi prakolom dengan kondisi fase gerak larutan A (metanol:tetrahidrofur:air 2:2:96) larutan B (metanol:air 65:35), fase diam berupa *resolve speherical* C18 dan diderivatisasi oleh orthoftalaldehida/etantiol dan pasca kolom dengan kondisi fase gerak larutan dapar sitrat pH 3,0 dan larutan dapar borat pH 9,7 fase diam resin penukar kation dengan detektor fluorensen. Hasilnya menunjukkan kedua metode dapat memisahkan asam amino dan kepekaan cara derivatisasi prakolom lebih tinggi dan waktu analisisnya lebih cepat daripada pasca kolom.

Sumarno dkk (2002) melakukan analisis kadar protein melalui analisis nitrogen dan analisis asam amino pada beberapa bahan makanan seperti susu sapi, susu serbuk kerbau, susu kedelai, tahu kedelai, serbuk putih telur dengan kondisi fase diam Dowex dan fase gerak 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. Penderivat ninhidrin. Hasil yang diperoleh teknik KCKT-ninhidrin menunjukkan korelasi yang signifikan ( $r=0,9992$ ) protein sebagai asam amino dan sebagai N-total.

Aprina (2012) melakukan penelitian dengan melihat komposisi asam amino dari gelatin sapi dan gelatin babi menggunakan metode KCKT dengan kondidengan kondisi kromatografi menggunakan kolom C18, temperatur  $37^{\circ}\text{C}$ , fase gerak asetonitril 60% dan 40 % air , detektor fluorensen, laju alir 1 ml/menit dan volume penyuntikan 5 $\mu\text{l}$ . Penderivat aminokuinolit-N-hidroksisuksini-midil karbamat (AQC), dimana gelatin

babi memiliki kadar asam amino serin, asam aspartate, asam glutamate, glisin, histidin, arginine, treonin, alanine, valin, metionin, leusin, dan fenilalanin yang lebih tinggi dibandingkan dengan gelatin sapi.

## **B. Landasan Teori**

### **1. Protein**

Protein berasal dari kata proteos yang berarti pertama dan utama. Protein merupakan komponen penting atau komponen utama sel hewan atau manusia. Sel merupakan komponen penting atau komponen utama sel hewan atau manusia. Protein yang terdapat dalam makanan berfungsi sebagai zat utama dalam pembentukan dan pertumbuhan tubuh (Podjiadi, 1994).

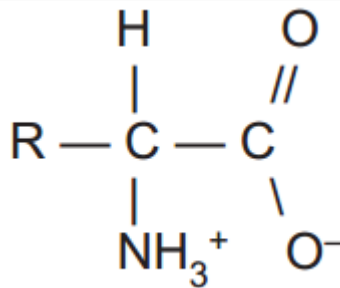
Protein merupakan salah satu kelompok makronutrien yang tidak seperti bahan makronutrien lain (karbohidrat dan lemak), protein lebih berperan dalam pembentukan biomolekul daripada sebagai sumber energi, meskipun dalam keadaan tertentu protein dapat digunakan sebagai sumber energi cadangan. Protein merupakan polimer dengan asam asam sebagai monomer. Dua asam amino berikatan melalui ikatan peptida dengan melepas satu molekul air. Protein merupakan polipeptida yang pada bagian tengah adalah rantai panjang dengan salah satu ujungnya adalah gugus karboksilat dan ujung yang lainnya adalah gugus amina (Rohman, 2007).

Protein dapat diperoleh dari makanan yang berasal dari hewan yang disebut sebagai protein hewani maupun dari tumbuhan yang disebut sebagai protein nabati. Tumbuhan akan membentuk protein dari CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, dan senyawa nitrogen. Hewan yang memakan tumbuhan akan mengubah protein nabati menjadi protein hewani. Unsur kimia yang menyusun protein adalah karbon 50%, hidrogen 7%, oksigen 23%, nitrogen 16%, belerang 0-3%, dan fosfor 0-3%. Protein yang dihidrolisis menggunakan asam atau enzim akan menghasilkan suatu produk berupa asam amino. 20 jenis asam amino terdapat dalam molekul protein. Asam asam amino ini terikat satu sama lain oleh ikatan peptide (Podjiadi,1994).

## 2. Asam amino

Asam amino adalah asam karboksilat yang mempunyai gugus amino. Asam amino yang terdapat sebagai komponen protein mempunyai gugus  $\text{NH}_2$  pada atom karbon  $\alpha$  dari posisi gugus  $-\text{COOH}$  (Podjiadi, 1994). Asam amino dapat ditemukan pada keadaan bebas atau sebagai rantai linear pada peptida dan protein.

Protein yang dihidrolisis dengan asam, alkali atau enzim maka akan dihasilkan campuran asam amino. Asam amino terdiri dari sebuah gugus amino, sebuah gugus karboksil, atom hidrogen, dan gugus R yang terikat pada sebuah atom C yang dikenal sebagai karbon alpha ( $\text{C}\alpha$ ), gugus R merupakan rantai cabang. Asam amino dalam kondisi netral berada dalam bentuk ion dipolar atau disebut dengan ion zwitter. Asam amino yang dipolar, gugus amino mendapat tambahan sebuah proton dan gugus terdisosiasi.



Gambar 2.1 struktur asam amino dalam bentuk ion zwitter (Belitz, 2005)

Derajat ionisasi dari asam amino dipengaruhi oleh pH. Pada pH yang rendah misalnya pada pH 1, gugus karboksilnya tidak terdisosiasi, sedang gugus aminonya menjadi ion. pH yang tinggi misalnya pada pH 11, karboksilnya terdisosiasi sedang gugus aminonya tidak (Winarno, 1984).

Tidak semua asam amino yang berada dalam molekul protein dapat dibentuk oleh tubuh manusia, berdasarkan pembentukannya asam amino dibagi menjadi dua golongan yaitu asam amino esensial dan asam amino non esensial (Winarno, 1997).

Asam amino esensial adalah asam amino yang tidak dapat dibentuk oleh tubuh sehingga untuk memenuhinya harus diperoleh dari

makanan sumber protein. Beberapa asam amino esensial disajikan pada tabel 2.1 berikut :

**Tabel 2.1 Asam amino esensial (Winarno, 1997)**

Asam amino	Singkatan tiga huruf	Berat molekul (g/mol)
Lisin	Lys	146,1
Leusin	Leu	131,1
Isoleusin	Ile	131,1
Treonin	Thr	119,1
Metionin	Met	149,2
Valin	Val	117,1
Fenilalanin	Phe	165,1
Histidin	His	155,1
Arginin	Arg	174,2

**Tabel 2.2 Asam amino non esensial (Winarno, 1997)**

Asam amino	Singkatan tiga huruf	Berat molekul (g/mol)
Alanin	Ala	89,0
Asam aspartate	Asp	133,1
Asam glutamate	Glu	147,2
Glisin	Gly	75,0
Prolin	Pro	115,1
Serin	Ser	105,1
Tirosin	Tyr	181,1
Sistin	Sis	120,1

Asam amino non esensial adalah asam amino yang dapat dibentuk di dalam tubuh, beberapa asam amino esensial dapat dilihat pada tabel 2.2.

### 3. Analisis asam amino

Analisis asam amino merupakan metode penentuan komposisi asam amino atau kandungan protein dan peptida. Untuk mengidentifikasi adanya asam amino, terlebih dahulu perlu menghidrolisis asam amino dalam keadaan bebas, kemudian memisahkan, mengidentifikasi dan menghitungnya. Hidrolisis dapat dilakukan pada kondisi asam dan basa yang kuat, atau menggunakan enzim spesifik untuk memperoleh asam amino (Bailey, 1990).

Unsur asam yang diperlukan pada hidrolisis adalah HCl 6 M, suhu  $110^{\circ}\text{C}$  dan waktu 24 jam. Reaksinya dilakukan dalam tabung kaca yang tertutup. Sementara pada hidrolisis basa, ikatan amida dapat diputus dengan perlakuan terhadap peptida menggunakan NaOH 2 M pada  $100^{\circ}\text{C}$ . Hidrolisis basa menghasilkan destruksi arginine, sistein, serin dan treonin. Tubuh manusia juga dapat menghidrolisis asam amino dengan menggunakan enzim yang digunakan untuk menghancurkan makanan dengan kadar tertentu yang dapat dikatalisasi untuk memotong ikatan peptida yang dikenal sebagai peptidase. Aminopeptidase bekerja cepat dan efisien dalam hidrolisis ikatan peptida sekaligus memotong satu residu asam amino mulai dari ujung N. Tahap selanjutnya, yaitu pemisahan. Pemisahan yang umum dilakukan adalah cara kromatografi, diantara teknik kromatografi yang dapat dilakukan untuk pemisahan yaitu kromatografi penukar ion, kromatografi kertas, dan kromatografi cair kinerja tinggi (Bailey, 1990).

Kromatografi penukar ion umumnya sangat efisien dalam memisahkan campuran asam amino. Metode ini menggunakan kolom penukar ion secara paralel dengan metode deteksi ninhidrin yang hasilnya reproduksibel sehingga teknik ini sangat banyak digunakan dalam pemisahan dan analisis campuran asam amino. Kromatografi kertas digunakan dalam pemisahan asam amino berdasarkan fakta bahwa gugus selulosa memiliki afinitas kuat terhadap molekul air, yang terbentuk oleh ikatan hidrogen dengan gugus OH pada rantai polisakarida. Asam amino yang tidak dapat dipisahkan dengan

sempurna oleh kromatografi kertas sederhana, maka kromatogram dua dimensi dapat dicoba. tidak umum digunakan pada pemisahan asam amino, akan tetapi pemisahan asam amino dengan fase terbalik juga cukup efisien asalkan beberapa asam amino dibuat turunannya. Derivat yang dipilih menjadi kromofor kuat pada daerah UV, analisis dengan menjadi cepat, efisien dan sensitif (Bailey, 1990).

#### **4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Kromatografi adalah pemisahan berdasarkan cuplikan antara fase yang bergerak dapat berupa gas atau zat cair, dan fase diam dapat berupa zat cair atau zat padat. Kromatografi ditemukan oleh Tsweet pada tahun 1903 (Johnson and Johnson, 1991).

Asam amino tidak mempunyai serapan yang baik di daerah ultraviolet atau daerah visible, maka asam amino tidak dapat dideteksi dengan menggunakan detektor spektrofotometer UV-Vis yang merupakan detektor yang paling banyak digunakan dalam KCKT. Beberapa usaha telah dilakukan untuk mengembangkan prosedur derivatisasi yang membuat asam amino lebih mudah dideteksi. Syarat-syarat penderivat yang digunakan sebagai berikut :

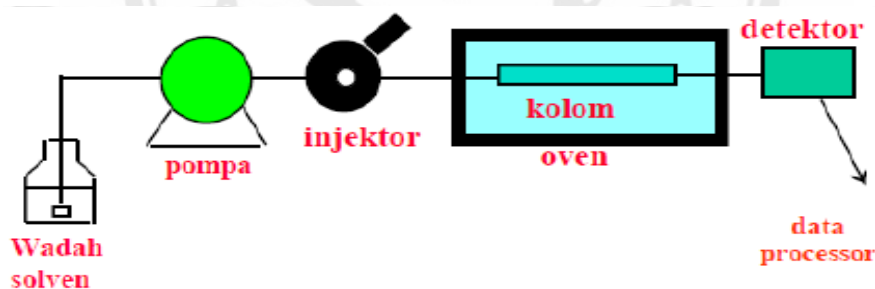
- 1) Produk yang dihasilkan harus mampu menyerap baik sinar ultraviolet atau sinar tampak atau dapat membentuk senyawa berflouresen sehingga dapat dideteksi dengan spektrofourometri
- 2) Proses derivatisasi harus cepat dan menghasilkan produk yang sebesar mungkin.
- 3) Produk hasil derivatisasi harus stabil selama proses derivatisasi dan deteksi.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang, antara lain : farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri makanan (Sudjadi, 2007).Kromatografi Cair Kinerja Tinggi adalah jenis yang khusus dari kromatografi kolom. Metode ini menggunakan cairan dengan tekanan tinggi sebagai fase gerak.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi paling sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa tertentu seperti asam amino, asam nukleat, protein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa aktif obat, proses hasil samping proses sintesis, memonitor sampel yang berasal dari lingkungan, memurnikan suatu senyawa dalam suatu campuran (Sudjadi, 2007).

Kromatografi merupakan teknik yang mana solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi solut oleh fase gerak dan fase diam. Fase gerak haruslah mempunyai sifat yang murni, tidak bereaksi dengan kemasannya, sesuai dengan detektor, dapat melarutkan cuplikan, mempunyai viskositas yang rendah, memungkinkan memperoleh kembali cuplikan dan harganya cukup terjangkau. (Johnson and Johnson, 1991).

Instrumentasi pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok yaitu: wadah fase gerak, sistem penghantaran fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung dan suatu komputer atau integrator atau perekam.



**Gambar 2.2 Diagram alat dan komponen (Putra, 2008)**

Diagram alat seperti pada gambar 2.2 akan dijelaskan secara singkat komponen-komponen *High performance Liquid Chromatography* :

1. Pompa : Fase gerak dalam sudah tentu zat cair dan untuk menggerakkannya melalui kolom diperlukan adanya pompa.

2. Injektor : Cuplikan harus dimasukkan kedalam pangkal kolom diusahakan agar sedikit mungkin terjadi gangguan pada kemasan kolom.
3. Kolom : Kolom merupakan jantung kromatograf. Keberhasilan analisis bergantung pada pilihan kolom dan kondisi kerja yang tepat.
4. Oven : Oven merupakan bagian untuk mengatur suhu pada kolom KCKT. Temperatur pada kolom dapat berpengaruh pada selektivitas dan waktu retensi.
5. Detektor : Detektor diperlukan untuk mengindera adanya komponen cuplikan didalam eluen kolom dan mengukur jumlahnya. Detektor yang baik sangat peka, tidak banyak berbunyi, rentang tanggapan linearnya lebar dan menanggapi semua jenis senyawa (Johnson and Johnson, 1991).

#### 5. Derivatisasi.

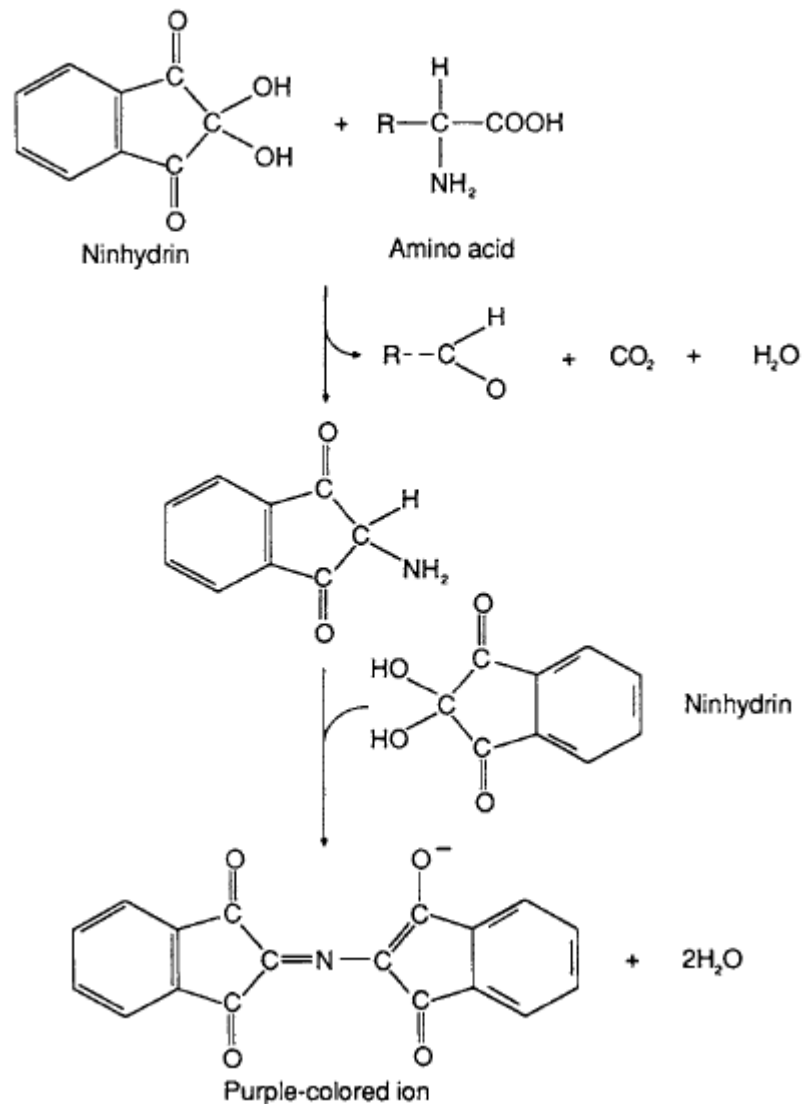
Derivatisasi merupakan suatu reaksi untuk menghasilkan suatu senyawa yang semula tidak bisa dideteksi menjadi bisa dideteksi pada daerah ultraviolet (UV) atau meningkatkan daya deteksinya sehingga dapat dideteksi. Syarat dari suatu reaksi derivatisasi yang baik, yakni : produk yang dihasilkan harus mampu menyerap baik sinar ultraviolet atau sinar tampak atau dapat membentuk senyawa berfluoresen sehingga dapat dideteksi dengan spektrofotometer, proses derivatisasi harus cepat dan menghasilkan produk yang sebesar mungkin (100%), produk hasil derivatisasi harus stabil selama proses derivatisasi dan deteksi, serta sisa preaksi untuk derivatisasi harus tidak mengganggu pemisahan kromatografi (Rediatning, 1987).

Derivatisasi pada KCKT dapat dilakukan baik sebelum masuk ke kolom (*pre-column derivatization*) atau setelah kolom (*post-column derivatization*). Derivatisasi setelah kolom, analit diderivatisasi terlebih dahulu sebelum diinjeksikan ke dalam kromatografi. Pereaksi yang umum digunakan untuk deteksi asam amino dengan spektrofotometri Uv-Vis diantaranya *phenyl isothiocyanate (PITC)*, *butylisothiocyanate*

(*BITC*), dan *diethyl ethoxymethylenemalonate*, *o-phtalaldehyde* (*OPA*) (Rohman, 2007).

Derivatisasi setelah kolom, analit diinjeksikan dahulu ke dalam kolom lalu diderivatisasi setelah keluar dari kolom (sebelum mencapai detector). Keuntungan dari derivatisasi setelah kolom adalah sifat kromatografis zat dapat digunakan untuk pemisahan dan menghindari adanya gangguan dari zat penderivat, sedangkan kerugian utamanya adalah terjadinya sejumlah pelebaran pita, dan kemungkinan zat dirusak oleh proses oksidasi, reduksi, dan lain-lain. Untuk melakukan derivatisasi setelah kolom, system KCKT harus dimodifikasi dengan penambahan sistem penghantaran cairan sekunder. Sistem reaksi derivatisasi setelah kolom adalah mencampur aliran eluen dari kolom KCKT dengan aliran larutan pereaksi kemudian campuran mengalir melalui reactor selama waktu tertentu untuk reaksi kimia. Reaktor dapat dipanaskan, untuk mempercepat proses derivatisasi. Campuran aliran selanjutnya dilewatkan melalui detector. Pereaksi yang bisaa digunakan untuk derivatiasai *post-column* yakni *ninhidrin*, *fluorescamine*. (Rohman, 2007).

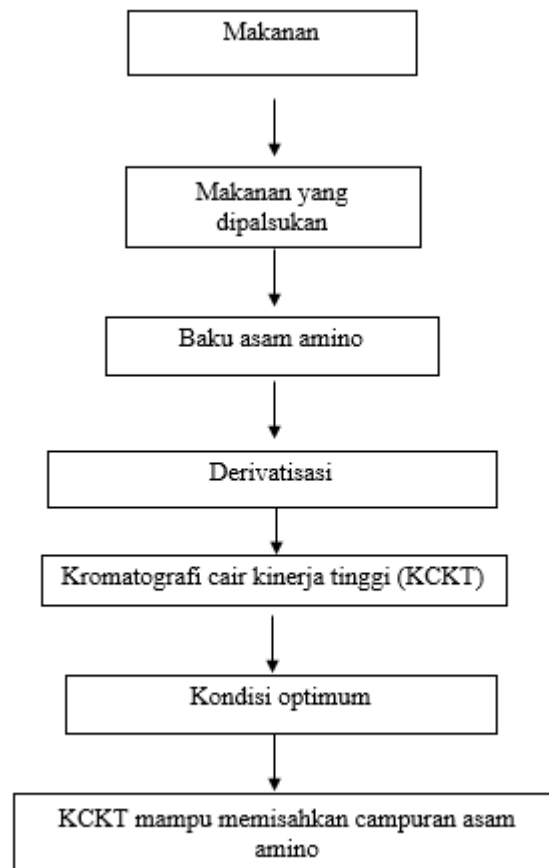
Reaksi derivatisasi asam amino dengan penderivat ninhidrin dapat dilihat pada gambar 2.3



**Gambar 2.3 Reaksi asam amino dengan ninhidrin (Dyer, 1991)**

Asam amino dengan ninhidrin akan bereaksi membentuk aldehida dengan satu atom C lebih rendah dan melepaskan molekul  $NH_3$  dan  $CO_2$ . Ninhidrin yang telah bereaksi akan membentuk hidrindantin. Hasil reaksi ditandai dengan terbentuknya kompleks yang berwarna ungu yang disebabkan oleh molekul ninhidrin dan hidrindantin yang bereaksi dengan  $NH_3$  setelah asam amino tersebut dioksidasi.

### C. Kerangka Konsep



Gambar 2.3 Kerangka konsep penelitian