

Perbandingan Metode Preparasi Sampel pada Penetapan Kadar Protein Tempe Kacang Kedelai dengan Metode Biuret

Comparison of Sample Preparation Methods in Determination of Soybean Tempeh Protein Content Using the Biuret Method

Thobias Tantra Koeswara¹, Winni Nur Auli^{1*}, Tursino Tursino²

¹Program Studi Farmasi, Institut Teknologi Sumatera, Jln. Terusan Ryacudu, Desa Way Hui, Jatiagung, Lampung Selatan, 35365, Indonesia
²Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jln. Ganesha 10, Bandung, Jawa Barat, 40132, Indonesia

Abstrak

Analisis kadar protein pada sampel pangan umumnya menggunakan metode Kjeldahl. Metode ini memiliki prinsip mengasumsikan keberadaan nitrogen total. Metode Kjeldahl dianggap tidak hanya mengukur kandungan nitrogen pada protein saja. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan metode Biuret. Akan tetapi, metode ini hanya dapat digunakan pada sampel berupa larutan. Sehingga diperlukan metode preparasi sampel yang sesuai agar diperoleh produk akhir preparasi sampel berupa larutan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh metode preparasi sampel terhadap kadar protein terukur serta memberikan rekomendasi metode preparasi sampel terbaik. Penggunaan metode Biuret pada penetapan kadar protein berdasarkan pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida, diperoleh hasil panjang gelombang maksimal 548 nm. Pada penelitian ini, digunakan empat metode preparasi. Metode pertama didasarkan pada pengendapan dengan *trichloro acetic acid* 10%; prinsip metode kedua yakni pengendapan oleh amonium sulfat dan dapar asetat; metode ketiga digunakan NaOH 10% untuk melarutkan protein, lalu diendapkan menggunakan H_2SO_4 10%; prinsip metode keempat yaitu melarutkan protein dengan NaOH 1 M serta pemanasan untuk memperkecil partikel protein. Parameter pengujian yang ditentukan adalah kadar protein, biaya, dan *simplicity*. Diperoleh kadar protein pada setiap metode secara berurutan 12,5% ($\pm 0,012$); 6,0% ($\pm 0,006$); 10,2% ($\pm 0,001$); dan 16,1% ($\pm 0,216$). Terdapat pengaruh metode preparasi sampel terhadap kadar protein. Metode keempat dijadikan metode rekomendasi untuk mengukur kadar protein tempe kacang kedelai, karena menghasilkan kadar protein yang sesuai SNI, murah, mudah, dan lebih sederhana dibandingkan dengan ketiga metode preparasi lainnya.

Diajukan: 27-06-2023

Direview: 30-09-2023

Disetujui: 01-01-2024

Kata Kunci: Metode Biuret, Protein, Tempe Kacang Kedelai.

Keywords: Biuret Method, Protein, Soy Bean Tempeh.

Korespondensi:

Winni Nur Auli

winni.auli@fa.itera.ac.id

Abstract

The determination of protein content in food commonly uses the Kjeldahl method. This method assumes the presence of total nitrogen. The Kjeldahl method is considered not only to measure the nitrogen content of proteins. Therefore, in this study, the Biuret method was used. However, this method can only be used on samples in the form of solutions. Thus, an appropriate sample preparation method is required to obtain the final sample preparation product in the form of a solution. This study aimed to determine the effect of sample preparation methods on measured protein content and to give recommended sample preparation methods. The principle of the Biuret method in determining protein content based on Cu^{2+} complex formation with peptide bonds obtained the maximum wavelength of 548 nm. In this study, four preparation methods were used. The first method is based on protein precipitation using trichloro acetic acid 10%; the second method principle is precipitation by ammonium sulfate and acetate buffer; the third method uses 10% NaOH to dissolve the protein, then precipitated using H_2SO_4 10%; the principle of the fourth method is to dissolve the protein with 1 M NaOH and heating to reduce protein particles. The specified testing parameters are protein content, cost, and simplicity. The protein content in each method was obtained respectively: 12,5% ($\pm 0,012$), 6,0% ($\pm 0,006$), 10,2% ($\pm 0,001$), and 16,1% ($\pm 0,216$). In conclusion, sample preparation methods affect protein content. The fourth method is the best for giving protein content that complies with SNI. Other than that, the fourth method is cheaper, more straightforward, and more simple compared to the other three preparation methods.



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2024 Penulis

Cara mensitasi artikel (citation style: AMA 11th Ed.):

Koeswara TT, Auli WN, Tursino T. "Perbandingan Metode Preparasi Sampel pada Penetapan Kadar Protein Tempe Kacang Kedelai dengan Metode Biuret" *J. Ilm. Medicam.*, 2024;10(1), 10-21. Doi: [10.36733/medicamento.v10i1.6902](https://doi.org/10.36733/medicamento.v10i1.6902)

PENDAHULUAN

Tempe merupakan pangan dengan bahan baku kacang kedelai, dapat dijadikan sebagai pangan pendamping nasi dengan nilai gizi yang tinggi. Berdasarkan Badan Standardisasi Nasional (BSN) data jumlah produsen tempe di Indonesia sebanyak ±81.000. Negara Indonesia disebut sebagai negara produsen tempe terbesar di dunia sekaligus menjadi pasar kedelai terbesar di Asia.¹ Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk Tempe No. 3144-2015, minimal kadar protein pada tempe yakni sebesar 15%.²

Kandungan protein yang terdapat di tempe kacang kedelai terbagi menjadi tiga tipe, yakni protein yang terlibat dalam metabolisme, protein struktural, dan protein penyimpanan, yang tidak memiliki aktivitas biologis. Sebagian besar, protein yang terkandung pada kacang kedelai yaitu globulin dengan karakteristik dapat larut air serta larut dalam larutan garam.³

Jenis protein penyimpanan pada kacang kedelai sebagian besar yang terkandung yakni *glycinin*, γ - dan β -*conglycinin*. Berdasarkan sifatnya, protein jenis ini akan mengalami pengendapan apabila berada pada pH 4,5-4,8. Selain itu, pada kacang kedelai dengan jenis protein *lectin* dapat berperan dalam pengikatan molekul yang mengandung karbohidrat.³

Penetapan kadar protein dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain, metode Kjeldahl, metode Biuret, metode Lowry, dan metode penentuan asam amino.⁴ Berdasarkan standar Indonesia (SNI), metode Kjeldahl dijadikan sebagai metode standar penentuan protein yang terkandung dalam tempe.⁵

Metode Kjeldahl umumnya digunakan dalam penetapan kadar protein pada pangan. Metode ini didasarkan pada asumsi keberadaan kadar nitrogen total di suatu pangan dengan nilai 16%. Oleh karena itu, diperlukan faktor konversi dalam penentuan kadar protein di pangan sebesar 6,25 yang diperoleh dari 100/16. Berdasarkan prinsip kerjanya,

metode ini memiliki kekurangan yakni tidak hanya mengukur nitrogen pada protein saja, melainkan nitrogen dari kandungan lainnya yang terdapat dalam sampel.⁶

Pada penelitian ini digunakan metode Biuret untuk penetapan kadar protein, hal ini disebabkan karena dibandingkan metode Kjeldahl, metode Biuret lebih murah dan waktu analisis protein yang lebih singkat. Selain itu, metode Biuret memiliki persentase pengaruh zat lain sangat sedikit dan tidak mendeteksi nitrogen dari sumber non protein.⁷ Akan tetapi, metode ini hanya dapat digunakan pada sampel berupa larutan. Sehingga diperlukan teknik preparasi yang sesuai untuk menerapkan metode Biuret pada sampel berupa padatan.

Metode preparasi untuk pengujian kadar protein pada sampel makanan yang berupa padatan menggunakan metode Biuret yang sudah dipublikasikan bervariasi.^{5,6,8,9} Prinsip ekstraksi protein yang diaplikasikan pada berbagai sampel makanan dapat menggunakan prinsip pengendapan oleh pH ekstrem, garam, serta pelarut organik seperti etanol, serta prinsip kelarutan menggunakan pelarut yang cocok agar protein yang terkandung larut sempurna.^{5,6,8,9}

Untuk menentukan preparasi yang terbaik pada penetapan kadar protein menggunakan metode Biuret, diperlukan perbandingan metode preparasi sampel yang sudah dipublikasikan didasarkan pada perbedaan prinsip ekstraksi protein serta produk akhir yang didapat. Pada penelitian ini akan digunakan empat metode preparasi yang memiliki prinsip ekstraksi yang berbeda menggunakan sampel makanan yang sama yaitu tempe. Pemilihan metode preparasi terbaik dapat dipertimbangkan melalui perolehan kadar protein uji, biaya, waktu, serta produk hasil preparasi sampel. Penelitian ini akan memberikan informasi pertimbangan pemilihan metode ekstraksi protein terbaik untuk penetapan kadar protein menggunakan metode Biuret.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian.

Alat. Spektrofotometer UV-visible (*Genesys 150 IXX 9A5X215008*), sentrifuga, vortex, neraca analitik, *water bath*, *hot plate*.

Bahan. Tempe kacang kedelai yang sudah diketahui kadar protein (A-Zaki)[®], CuSO₄.5H₂O (Merck)[®], NaK tartrate (Merck)[®], NaOH (Kirsch Pharma HmbH)[®], KI (Advent)[®], *bovine serum albumin* (BSA) (SigmaA)[®], H₂SO₄ (Merck)[®], *trichloro acetic acid* (TCA), dietil eter, dapar asetat pH 5, amonium sulfat, dan *aquadest*.

Prosedur Penelitian.

Preparasi Sampel

a. Pembuatan bubur tempe

Dipotong tempe kacang kedelai dengan ukuran 5x5 cm yang kemudian dihaluskan menggunakan mortir. Tempe yang telah dihaluskan, kemudian ditimbang untuk setiap percobaan. Selanjutnya tempe yang telah dihaluskan, dilarutkan dalam *aquadest*.

b. Metode preparasi pertama

Bubur tempe yang telah dibuat, diteteskan TCA 10% sebanyak satu ml, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm. Campuran didekantasi, supernatan dibuang dan endapan diteteskan 2 ml dietil eter. Kemudian disentrifugasi kembali dan didekantasi. Padatan ditampung dan dilarutkan pada 1 ml *aquadest* untuk dijadikan larutan sampel.⁴

c. Metode preparasi kedua

Didistribusikan bubur tempe yang telah dibuat ke tabung sentrifugasi lalu protein diendapkan menggunakan amonium sulfat kristal sampai mendekati titik jenuh protein. Dipisahkan endapan protein dan larutan menggunakan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, endapan kemudian dilarutkan pada 1 ml dapar asetat pH 5.⁸

d. Metode preparasi ketiga

Diteteskan 10% NaOH pada bubur tempe hingga pH pada angka 12. Disentrifugasi bubur tempe menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Dipisahkan antara larutan dengan endapan. Larutan yang

diperoleh, disimpan di lemari pendingin selama 5 jam, yang kemudian diteteskan 10% H₂SO₄ hingga pH 5,5. Selanjutnya disimpan pada lemari pendingin selama lima jam. Setelah larutan sampel didinginkan, dilakukan sentrifugasi larutan sampel pada kecepatan dan durasi yang sama dengan sebelumnya, setelah itu didekantasi. Dilakukan pengadukan endapan protein yang dilarutkan pada *aquadest* selama 5 menit.⁹

e. Metode preparasi keempat

Bubur tempe yang telah dibuat, kemudian ditambahkan 1 ml NaOH dan *aquadest* hingga 5 ml. Kemudian dilakukan proses pemanasan di *waterbath* selama 10 menit dengan suhu 90°C dan dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada 2000 rpm. Diambil supernatannya, yang kemudian digunakan untuk penetapan kadar protein.⁶

Pembuatan Pereaksi Biuret

Dilarutkan 0,75 gram CuSO₄.5H₂O dan 2,25 gram NaK tartrate dalam 125 ml larutan NaOH 0,2 N, kemudian ditambahkan 1,25 gram KI dan dilakukan pengenceran dengan larutan NaOH hingga 250 ml.⁴

Pembuatan Larutan Protein Stok

Dibuat larutan standar bovine serum albumin (BSA) dalam *aquadest* dengan konsentrasi 20 mg/ml dengan cara menimbang 500 mg *bovine serum albumin*, kemudian dilarutkan pada 25 ml *aquadest*.⁴

Verifikasi Metode

a. Uji linieritas

Dibuat seri larutan standar BSA 1 mg/ml; 2 mg/ml; 3 mg/ml; 4 mg/ml; 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, dan 8 mg/ml. Dipipet setiap konsentrasi larutan standar BSA, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya direaksikan dengan reagen Biuret sesuai prosedur penentuan protein dengan metode Biuret. Data absorbansi yang diperoleh, dilakukan uji linieritas dengan cara pembuatan kurva linieritas dengan persamaan sebagai berikut.^{4,10}

$$(y = bx+a).....(1)$$

b. Akurasi

Dibuat larutan standar BSA dengan konsentrasi 5,4 mg/ml, 6 mg/ml, dan 7,2 mg/ml yang akan dihitung nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-visible dengan pengulangan uji sebanyak tiga kali. Selanjutnya dihitung %recovery dengan syarat hasil %recovery berada pada rentang nilai rata-rata 98% - 102%.¹⁰

$$\%recovery = \frac{\text{Konsentrasi uji}}{\text{Konsentrasi teori}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

c. Presisi

Diukur absorbansi larutan standar BSA (6 mg/ml) yang telah dibuat pada kondisi yang sama serta pada waktu yang sama. Prosedur uji presisi repeatability dilakukan sebanyak enam kali pengulangan, kemudian dilakukan perhitungan %RSD dengan syarat %RSD < 2%. Selain dilakukan repeatability, dilakukan pula pengujian presisi reproducibility yang dilakukan selama tiga hari, dengan cara mengukur absorbansi dari larutan standar BSA (6 mg/ml) sebanyak enam kali pengulangan di setiap harinya. Dilakukan penentuan nilai %RSD dengan kriteria nilai %RSD < 2%.¹⁰

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

Penetapan Kadar Protein dengan Biuret

Sejumlah 1 ml larutan protein dimasukkan kedalam tabung reaksi, setelah itu dilakukan penambahan pereaksi Biuret ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 ml, dilakukan penggojokan tabung reaksi atau dapat menggunakan vortex.

Setelah dilakukan penggojokan, disimpan larutan protein pada suhu ruang selama 30 menit hingga terjadi perubahan warna menjadi ungu.⁴

Setelah terjadi perubahan warna menjadi ungu, dilakukan pengukuran absorbansi sampel uji secara bergantian menggunakan instrumen spektrofotometer UV-visible pada panjang gelombang 548 nm.⁴

Analisis Data.

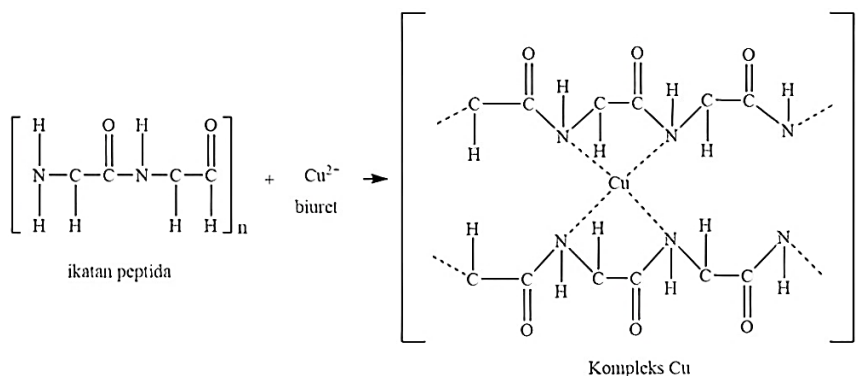
Pengujian kadar protein pada sampel dengan spektrofotometer UV-visible dapat dilakukan dengan cara mensubstitusikan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan regresi linier, yang kemudian dilanjutkan dengan perhitungan kadar.

$$\%Kadar\ protein = \frac{\text{Konsentrasi uji (mg/ml)}}{\text{Bobot sampel (mg)}} \times Fp \times 100\% \dots \dots (4)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penetapan Kadar Protein dengan Metode Biuret

Prinsip uji protein menggunakan metode Biuret didasarkan pada proses pembentukan kompleks Cu²⁺ dengan ikatan peptida. Kompleks Cu²⁺ antara Biuret dan ikatan peptida dapat teramati dengan adanya perubahan warna sampel menjadi ungu.¹¹ Intensitas perubahan warna yang terjadi berkorelasi dengan konsentrasi protein, apabila perubahan warna yang terjadi semakin pekat, maka konsentrasi protein yang terkandung akan semakin meningkat.⁴ Adapun mekanisme reaksi kompleks Cu²⁺ seperti pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Mekanisme Reaksi Kompleks Cu²⁺

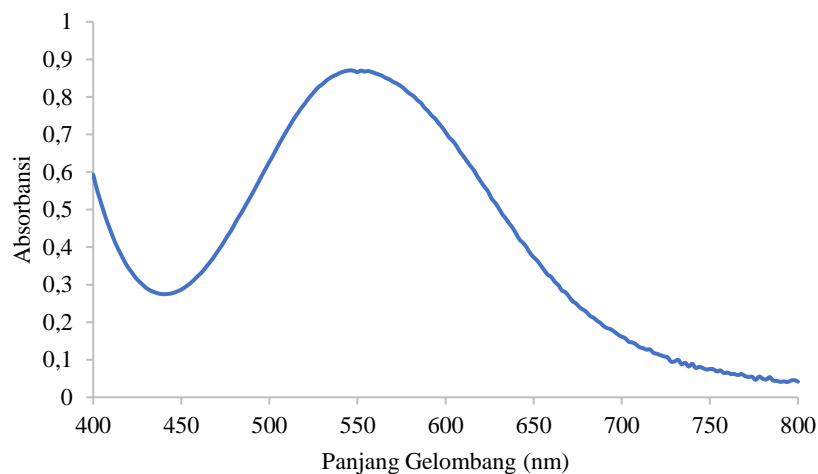
Pembentukan kompleks Cu²⁺ dapat terjadi antara ikatan peptida atau polipeptida dalam larutan alkali kuat dengan ion Cu²⁺ dari reagen

Biuret, sehingga nantinya akan menghasilkan perubahan warna menjadi ungu, yang menandakan terdapat dua ikatan peptida atau lebih.^{11,12}

Identifikasi protein menggunakan metode Biuret secara kuantitatif dapat menggunakan spektrofotometer UV-visible untuk memperoleh absorbansi dan panjang gelombang maksimal (λ_{max}) larutan uji. Pengujian secara kuantitatif dengan spektrofotometer UV-visible dapat digunakan pada protein yang berupa larutan atau telah larut sempurna.

Pada penelitian ini, dilakukan pengujian secara kuantitatif dengan metode Biuret untuk

memperoleh panjang gelombang maksimal (λ_{max}) dan absorbansi sampel. Diperoleh panjang gelombang maksimal (λ_{max}) pada penelitian ini sebesar 548 nm dengan perubahan warna menjadi ungu (**Gambar 2**). Berdasarkan pada penelitian lain, ikatan peptida yang merupakan penyusun protein dapat terbaca pada panjang gelombang 500-600 nm dengan panjang gelombang maksimal pada 540 nm.^{5,6}



Gambar 2. Spektrum UV-visible Larutan Standar Bovine Serum Albumin

Perbedaan panjang gelombang maksimal pada penelitian ini terhadap penelitian sebelumnya dikarenakan terjadinya proses pergeseran batokromik yang disertai dengan pergeseran panjang gelombang ke arah kanan yang disebabkan oleh efek pelarut maupun adanya substituen pada molekul kromofor sampel.^{13,14} Panjang gelombang maksimal yang diperoleh, selanjutnya dapat digunakan pada pengukuran absorbansi seri konsentrasi larutan standar BSA dan sampel.

Verifikasi Metode

a. Linieritas

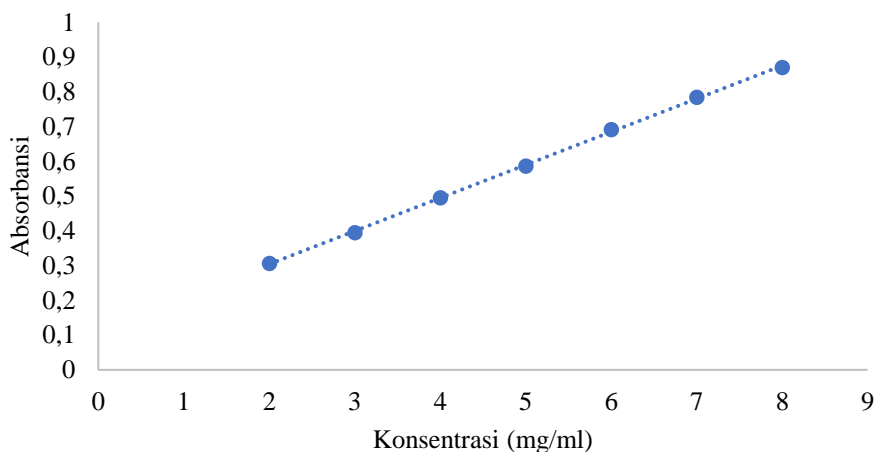
Uji linieritas dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan standar BSA (2-8 mg/ml) sebanyak tiga kali replikasi pada panjang gelombang maksimal yang telah diperoleh yakni 548 nm. Adapun hasil pengukuran absorbansi larutan tersebut termuat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil Uji Pengukuran Absorbansi Linieritas

Konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi	Rata-rata absorbansi \pm SD
2	0,306	0,306 \pm 0,001
	0,305	
	0,308	
3	0,392	0,395 \pm 0,005
	0,392	
	0,401	
4	0,499	0,495 \pm 0,005
	0,489	
	0,499	
5	0,587	0,586 \pm 0,001
	0,585	
	0,587	
6	0,692	0,691 \pm 0,0005
	0,692	
	0,691	
7	0,781	0,784 \pm 0,004
	0,783	
	0,789	
8	0,864	0,878 \pm 0,008
	0,864	
	0,881	

Berdasarkan data (**Tabel 1**), dilakukan pembuatan regresi linier antara perolehan absorbansi (y) dengan konsentrasi uji (x), sehingga diperoleh persamaan $y = 0,0952x - 0,114$ dengan nilai $R = 0,9997$ (**Gambar 3**). Hal tersebut menunjukkan bahwa telah sesuai dengan syarat

keberterimaan yaitu $>0,997$ atau mendekati 1.^{15,16} Selain itu, hasil menunjukkan bahwa terjadi peningkatan konsentrasi yang berkorelasi dengan peningkatan absorbansi serta respon alat pada metode yang digunakan.



Gambar 3. Kurva Linieritas Larutan Standar *Bovine Serum Albumin*

b. Akurasi

Pengujian akurasi menggunakan larutan standar BSA pada tiga tingkat konsentrasi berbeda, yaitu 80% setara dengan konsentrasi 5,4 mg/ml, 100% setara dengan konsentrasi 6 mg/ml, dan 120% setara dengan konsentrasi 7,2 mg/ml. Secara berurutan, diperoleh rata-rata *%recovery* pada ketiga tingkat konsentrasi tersebut adalah 101,605%, 101,132%, dan 101,491% yang tersaji pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Uji Akurasi

Konsentrasi teori (mg/ml)	Konsentrasi uji (mg/ml)	<i>%Recovery</i>	Rata-rata <i>%recovery</i> ± SD
5,4	5,504	101,929	101,605 ± 0,297
	5,483	101,540	
	5,472	101,346	
6	6,071	101,190	101,132 ± 0,101
	6,060	101,015	
	6,071	101,190	
7,2	7,300	101,394	101,491 ± 0,084
	7,310	101,540	
	7,310	101,540	

Berdasarkan data tersebut, pengujian akurasi telah memenuhi syarat yaitu 98% - 102%. Perolehan nilai *%recovery* dari ketiga konsentrasi uji, terdapat sebuah penyimpangan antara konsentrasi uji dengan konsentrasi teori. Perbedaan konsentrasi

uji terhadap konsentrasi teori yang tidak menghasilkan *%recovery* sebesar 100% dapat dikarenakan proses pemipetan atau peralatan yang digunakan.¹⁵

c. Presisi

Pengujian presisi pada penelitian ini, dilakukan dengan mengukur konsentrasi uji larutan standar BSA (6 mg/ml) sebanyak enam kali replikasi. Uji presisi *repeatability* dilakukan dengan kondisi dan hari yang sama pada setiap pengujiannya, sedangkan uji presisi *reproducibility* dilakukan dalam tiga hari pengujian oleh analis yang sama, serta menggunakan alat dan pada laboratorium yang sama.

Diperoleh *%RSD* presisi *repeatability* (hari ke-1) pada penelitian ini sebesar 0,367%, sedangkan pada uji presisi *reproducibility* diperoleh *%RSD* sebesar 0,548%, yang dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Berdasarkan hasil *%RSD* yang diperoleh, uji presisi *repeatability* menunjukkan bahwa telah sesuai dengan syarat $<2\%$, serta hasil uji menunjukkan keseksamaan metode setelah dilakukan berulang kali oleh peneliti pada kondisi dan hari yang sama. Sama halnya dengan uji presisi *reproducibility* telah menunjukkan keseksamaan

metode setelah dilakukan uji pada kondisi yang berbeda.¹⁵

Tabel 3. Hasil Uji Presisi

Replikasi ke-	Konsentrasi uji (mg/ml)			Gabungan (Hari ke-1,2,3)
	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	
1	6,050	6,078	6,155	Rata-rata = 6,096 SD = 0,033 %RSD = 0,548
2	6,089	6,103	6,075	
3	6,070	6,082	6,099	
4	6,113	6,068	6,131	
5	6,061	6,085	6,148	
6	6,075	6,078	6,162	
Rata-rata	6,076	6,083	6,129	
SD	0,022	0,012	0,035	
%RSD	0,367	0,191	0,565	

Penetapan Kadar Protein Tempe Kacang Kedelai

Setiap produk hasil preparasi sampel yang telah melewati proses preparasi sampel, kemudian direaksikan dengan reagen Biuret menggunakan perbandingan (1:1) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya produk hasil preparasi sampel dari masing-masing metode diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-visible pada panjang gelombang 548 nm, sehingga dapat diperoleh %kadar protein.

Tabel 4. Hasil Perolehan Kadar Protein Tempe Kacang Kedelai

Metode preparasi ke-	Bobot protein (gr)	Bobot tempe (gr)	Bobot protein/tempe (gr)	%Kadar protein \pm SD
1*	0,05	0,4	0,125	12,5 \pm 0,012
2*	0,06	1	0,06	6,0 \pm 0,006
3*	0,204	2	0,102	10,2 \pm 0,001
4**	0,161	1	0,161	16,1 \pm 0,216

* berupa suspensi protein ** berupa larutan protein

Berdasarkan hasil pada **Tabel 4**, penetapan kadar protein tempe kacang kedelai menggunakan keempat metode preparasi yang berbeda, diperoleh hasil yang bervariasi. Metode pertama, kedua, dan ketiga menunjukkan hasil yang belum memenuhi standar SNI 3144:2015 dengan minimal kadar protein sebesar 15% serta terdapat perbedaan dengan informasi gizi pada kemasan produk sebesar 18,3% dan masih kurang baik dibandingkan dengan metode Kjeldahl sebagai metode standar. Sedangkan pada metode keempat diperoleh persentase kadar protein tertinggi sebesar 16,1%. Perolehan persentase kadar protein pada metode keempat telah memberikan hasil yang sesuai

dengan SNI 3144:2015, namun belum selaras dengan informasi gizi yang terdapat pada kemasan produk.

Pada metode preparasi pertama, faktor yang mempengaruhi terjadinya ketidaksesuaian antara hasil uji dengan SNI 3144:2015, informasi gizi pada kemasan produk serta lebih rendah dengan metode Kjeldahl dapat dikarenakan dengan penggunaan TCA 10%. Penggunaan TCA 10% selain sebagai agen pengendap protein serta dapat menghilangkan kontaminan, termasuk garam yang terkandung pada sampel dengan prinsip mempengaruhi ionisasi protein. Ionisasi protein dapat terjadi dengan adanya perubahan muatan protein menjadi nol, oleh karena itu nantinya protein akan lepas dari pelarutnya dan membentuk sebuah agregat baru.^{17,18}

Berdasarkan penelitian lain, disebutkan bahwa rentang konsentrasi TCA terbaik untuk mengendapkan protein yaitu berkisar pada angka 15%-45%, namun hal tersebut hanya dapat mengendapkan sebanyak 70% protein sampel.¹⁹ Pada penelitian ini digunakan TCA 10%, sehingga terdapat kemungkinan bahwa protein tempe kacang kedelai tidak dapat mengendap dengan sempurna oleh TCA 10%. Penggunaan TCA pun dapat memberikan pengaruh kurang baik terhadap pengendapan protein pada metode ini, yang dikarenakan TCA dapat merusak ikatan hidrogen pada protein, sehingga protein sampel akan kehilangan struktur sekundernya.¹⁷ Penggunaan TCA 10% dinilai kurang efektif untuk mengendapkan protein pada tempe kacang kedelai.

Faktor lain yang mengakibatkan hasil uji kurang maksimal pada metode preparasi pertama yakni pada proses sentrifugasi. Tahapan sentrifugasi dengan kecepatan tinggi dapat membentuk sebuah endapan protein yang keras di dasar tabung, sehingga dapat membatasi aktivitas TCA untuk menghilangkan kontaminan.²⁰

Pada metode preparasi kedua, faktor yang mempengaruhi ketidaksesuaian antara perolehan kadar protein uji dengan teori serta lebih rendah dengan perolehan protein menggunakan metode Kjeldahl dapat disebabkan oleh amonium sulfat yang ikut mengendap dengan protein serta kurang maksimalnya penggunaan dapar asetat pH 5.

Penggunaan amonium sulfat sebagai agen pengendapan protein, seharusnya dapat dilanjutkan proses dialisis dengan prinsip osmosis.²¹ Residu amonium sulfat maupun zat terlarut lainnya akan menembus pori-pori kantung dialisis dan protein tertinggal di kantung dialisis, hal tersebut dikarenakan ukuran molekulnya yang lebih besar dibandingkan dengan pori-pori kantung dialisis.^{22,23}

Penggunaan amonium sulfat berperan dalam proses pengendapan protein atau disebut dengan proses *salting out*, yang disebabkan terjadinya penurunan kelarutan protein, apabila berada pada lingkungan dengan kekuatan ion yang tinggi.^{22,24} Amonium sulfat digunakan dalam pengendapan protein didasarkan karena amonium sulfat memiliki kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan garam fosfat lainnya serta memungkinkan dijadikan larutan dengan kekuatan ion yang tinggi.^{22,25}

← *salting out*

Anion : PO₄>SO₄>CH₃COO>Cl>Br>ClO₄>SCN

Kation : NH₄>Rb>K>Na>Li>Mg>Ca>Ba

→ *salting in*

Penambahan dapar asetat pH 5 pada endapan yang diperoleh dengan tujuan untuk menahan perubahan pH yang berkisar 3,8 sampai 5,8, sehingga dapat mendekati *isoelectric point* protein kacang kedelai sekaligus untuk kembali mengendapkan protein pada *isoelectric point* (pI) dari kacang kedelai yaitu pada pH 4,5–4,8.^{3,26,27}

Proses ekstraksi yang kurang maksimal dapat menjadi faktor yang mempengaruhi perbedaan antara hasil uji dengan SNI 3144:2015, informasi gizi pada kemasan produk yang lebih rendah dibandingkan metode Kjeldahl pada metode preparasi ketiga. Pada metode preparasi ini dilakukan penyesuaian pH menjadi 12 dan dilanjutkan dengan perubahan pH menjadi 5,5.

Penyesuaian pada pH 12 bertujuan untuk melarutkan protein pada pelarutnya. Hal tersebut sejalan dengan penelitian terdahulu, bahwa pada pH basa diperoleh kelarutan protein yang lebih tinggi sekitar tiga puluh kali lipat dibandingkan pada pH asam.²⁸ Peningkatan kelarutan protein dapat disebabkan pada pH 12, yang mana protein tempe kacang kedelai memiliki kecenderungan untuk memecah, oleh karena itu akan terjadi pula proses penurunan ukuran partikel protein sehingga

protein cenderung lebih larut dibandingkan sebelumnya.²⁸

Perubahan dari pH 12 menjadi 5,5 bertujuan untuk mengendapkan protein, namun hal tersebut dinilai kurang efektif untuk mengendapkan protein. Jenis protein yang terkandung pada kacang kedelai yakni 80-90% adalah globulin. Jenis protein tersebut dapat mengendap pada pH 4,5-4,8. Hal tersebut dapat menjadi faktor kecilnya perolehan kadar protein terukur, dikarenakan pH yang digunakan masih kurang mendekati *isoelectric point* protein kacang kedelai.³

Penambahan NaOH 1 M pada metode preparasi sampel keempat memiliki kesamaan fungsi seperti pada metode ketiga yaitu untuk meningkatkan kelarutan protein, sehingga dapat diperuntukkan mengekstraksi protein.²⁹ Penggunaan NaOH sebagai peningkat kelarutan protein selaras dengan penelitian lainnya, bahwa NaOH 1 M dapat menghasilkan hasil ekstraksi yang lebih baik dibandingkan dengan NaOH 0,5 M serta air sebagai pelarutnya.³⁰

Selain dilakukan penambahan NaOH 1 M pada sampel, dilakukan pula proses pemanasan sampel di waterbath pada suhu 90°C selama 10 menit. Pemanasan sampel bertujuan untuk menurunkan viskositas protein sampel serta memperkecil ukuran partikel, sehingga dapat meningkatkan kelarutannya.³¹

Penggunaan temperatur 90°C sebagai peningkat kelarutan protein, memiliki perbedaan dengan penelitian lainnya. Denaturasi protein globulin pada tempe dapat dimulai pada suhu 80°C, yang mana suhu tinggi dapat mempengaruhi kerusakan struktur sekunder serta terbukanya struktur tersier protein tersebut.³²

Faktor ketidaksesuaian antara hasil uji dengan SNI, informasi gizi pada kemasan produk, atau lebih rendah dibandingkan metode Kjeldahl, dapat dikarenakan pemilihan pelarut. *Aquadest* dinilai kurang memberikan hasil yang maksimal untuk melarutkan protein sampel. Berdasarkan dengan jenis protein di tempe kacang kedelai yaitu globulin, protein ini memiliki kelarutan yang rendah pada *aquadest*, melainkan protein jenis ini dapat larut dengan baik pada pelarut garam encer.³³ Oleh karena itu keempat metode ini dinilai tidak dapat

mengisolasi protein secara sempurna dikarenakan beberapa faktor-faktor tersebut.

Berdasarkan perolehan persentase kadar protein pada **Tabel 4** jika dibandingkan dengan metode Kjeldahl sebagai metode standar, keempat metode preparasi sampel pada penelitian ini dinilai memiliki performa yang kurang baik dibandingkan metode standar pada penetapan kadar protein tempe. Berdasarkan dengan penelitian lain

menggunakan metode Kjeldahl, diperoleh kadar protein terukur berkisar pada angka 17-37%.³⁴⁻⁴¹ Rendahnya hasil perolehan kadar protein terukur pada tempe kacang kedelai di penelitian ini dibandingkan dengan metode Kjeldahl, dapat dipengaruhi beberapa faktor yang telah dijelaskan sebelumnya, antara lain pH yang digunakan, pemilihan pelarut, dan produk hasil preparasi sampel.

Tabel 5. Perbandingan Metode Preparasi Sampel

Parameter Uji	Metode preparasi sampel ke-			
	1	2	3	4
Produk hasil preparasi sampel	Suspensi	Suspensi	Suspensi	Larutan
Waktu	30 menit	20 menit	10 jam 15 menit	30 menit
Biaya	Rp 130.000	Rp 200.000	Rp 55.000	Rp 35.000
<i>Simplicity</i>	Mudah dan sederhana, namun tidak ramah lingkungan	Mudah namun tidak terlalu sederhana, karena perlu menentukan titik jenuh protein uji	Rumit karena dilakukan penyesuaian pH dan pendinginan yang lama	Mudah dan sederhana

Perbandingan Metode Preparasi Sampel

Penetapan kadar protein tempe kacang kedelai dilakukan dengan empat metode preparasi sampel, yang kemudian keempat metode tersebut dibandingkan terhadap beberapa parameter. Berdasarkan data pada **Tabel 5** metode preparasi sampel keempat menunjukkan hasil yang lebih menjanjikan untuk digunakan, dibandingkan dengan ketiga metode preparasi sampel lainnya. Metode preparasi keempat menghasilkan produk hasil preparasi sampel yang sesuai dengan syarat spektrofotometer UV-visible yakni berupa larutan, menggunakan waktu dan biaya yang lebih sedikit, serta tahapan preparasi yang mudah dan sederhana.

Metode yang Direkomendasikan

Penggunaan empat metode preparasi sampel pada penelitian ini, selain untuk mengetahui keberhasilannya pada penetapan kadar protein tempe kacang kedelai, pun guna memberikan rekomendasi metode preparasi terbaik.

Berdasarkan dengan perolehan hasil %kadar protein dari setiap metode preparasi sampel seperti pada **Tabel 6** serta mengacu pada **Tabel 5**, metode preparasi sampel keempat dapat dijadikan metode

yang direkomendasikan untuk penetapan kadar protein tempe kacang kedelai.

Tabel 6. Perolehan %Kadar Protein dari Keempat Metode

Metode ke-	%Kadar protein
1	12,5%
2	6,0%
3	10,2%
4	16,1%

Pemilihan metode preparasi keempat sebagai metode rekomendasi didasarkan pada perolehan %kadar protein tempe kacang kedelai yang telah sesuai dengan SNI 3144:2015 sebesar $\geq 15\%$ serta mempertimbangkan dari parameter produk hasil preparasi sampel, waktu, biaya, dan *simplicity* dari metode preparasi tersebut.

Perolehan hasil persentase kadar protein pada penelitian ini menunjukkan bahwa setiap metode preparasi sampel protein tidak dapat dijadikan acuan dalam penetapan kadar protein dengan jenis sampel yang berbeda. Pemilihan metode preparasi sampel pada penetapan kadar protein harus mempertimbangkan jenis protein yang terkandung pada sampel serta sifat fisikokimia protein uji meliputi bentuk, kelarutan, *isoelectric point*, serta stabilitas jenis protein terhadap suhu.

SIMPULAN

Hasil penetapan kadar protein tempe kacang kedelai dari keempat metode preparasi sampel menggunakan metode Biuret, ditemukan pengaruh metode preparasi sampel terhadap hasil akhir. Metode preparasi pertama, kedua, dan ketiga dinilai tidak dapat mengekstraksi protein secara sempurna dibandingkan dengan metode keempat yang telah memenuhi syarat mutu SNI 3144:2015 sebesar $\geq 15\%$. Metode preparasi keempat dapat dijadikan rekomendasi metode untuk penetapan kadar protein tempe kacang kedelai menggunakan metode Biuret. Namun keempat metode preparasi sampel pada penelitian ini belum cukup mengungguli perolehan kadar protein tempe kacang kedelai menggunakan metode Kjeldahl sebagai metode standar dalam penetapan kadar protein tempe.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Institut Teknologi Sumatera atas kesediaannya memfasilitasi sarana dan prasarana yang untuk menyelesaikan penelitian ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan antar penulis dalam naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Standarisasi Nasional I. *Tempe: Persembahan Indonesia Untuk Dunia*. Badan Standarisasi Nasional; 2012.
2. Badan Standarisasi Nasional I. *Tempe Kedelai SNI 3144:2015*. Badan Standarisasi Nasional ; 2015.
3. García MC, Torre M, Marina ML, Laborda F, Rodriquez AR. Composition and characterization of soyabean and related products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1997;37(4):361-391. doi:10.1080/10408399709527779
4. Yenrina R. *Metode Analisis Bahan Pangan Dan Komponen Bioaktif*. Andalas University Press; 2015.
5. Martina V, Vojtech K. a Comparison of Biuret, Lowry and Bradford Methods for Measuring the Egg'S Proteins. *Mendelnet*. 2015;Vol. 1(No. 1):394-398.
6. Sylvia D, Apriliana V, Rasydy LOA. Analisis Kandungan Protein yang Terdapat dalam Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) menggunakan Metode Kjeldahl & Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Farmagazine*. 2021;8(2):64. doi:10.47653/farm.v8i2.557
7. Nielsen SS. *Food Analysis*. 4th ed. (Nielsen SS, ed.). Springer US; 2010. doi:10.1007/978-1-4419-1478-1
8. Nurlaili N, Maulida A, Theresia C, Sandika FA, Hairah U. Aplikasi Ekstrak Tanaman Kecombrang (*Etilingera elatior*) Sebagai Pengawet Alami pada Daging Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Application. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 2020;3(1):242-247.
9. Syauqi A, Fuadi M, Santoso H. Comparative Study of References and Protein Quantifications Using Biuret-Spectrophotometric Method. *Chimica et Natura Acta*. 2018;6(2):42. doi:10.24198/cna.v6.n2.19224
10. Harmita H. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2004;1(3):117-135. doi:10.7454/psr.v1i3.3375
11. Wahdania W, Porodjia F, Nurkamiden S. Protein Test with Chemical Solution in Identifying Nutrient Content in Food Material. *Journal of Health, Technology and Science (JHTS)*. 2021;2(4):22-30. doi:10.47918/jhts.v2i4.252
12. Shen CH. Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Molecular Biology*. Published online 2019:187-214. doi:10.1016/b978-0-12-802823-0.00008-0
13. Suhartati T. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis Dan Spektrofotometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. 1st ed. (AURA, ed.); 2017.
14. Sayuthi MI, Kurniawati P. Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Parasetamol dalam Sediaan Tablet secara Spektrofotometri UV-Visible. In: *Prosiding Seminar Nasional Kimia FMIPA UNESA*. Universitas Negeri Surabaya; 2017:190-201. https://diploma.chemistry.uin.ac.id/wp-content/uploads/2018/01/PUJI_Prosiding-Seminar-Nasional-Kimia-Di-UNESA-1.pdf
15. Riyanto R. *Validasi & Verifikasi Metode Uji: Sesuai Dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian Dan Kalibrasi*. Deepublish Publisher; 2019.
16. Napitupulu RM, Julia D, Panggabean AS. Validasi Metode Penentuan Mn Dalam Oli

- Lubrikan Dengan Metode Pengenceran Langsung Menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom. *Indo J Chem Res*. 2019;6(2):94-100. doi:10.30598/ijcr.2019.6-ama
17. Koontz L. TCA precipitation. *Methods in Enzymology*. 2014;541:3-10. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00001-X
 18. Santi SS, Maulida F, Khumairoh S, Rahmani TPD. Effect of pH and Extraction Time on Isolation Proteins from Red Kupang (Musculita Senhousia). *Journal of Physics: Conference Series*. 2021;1899(1). doi:10.1088/1742-6596/1899/1/012058
 19. Rajalingam D, Loftis C, Xu JJ, Kumar TKS. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2009;18(5):980-993. doi:10.1002/pro.108
 20. Hao R, Adoligbe C, Jiang B, Zhao X, Gui L, Qu K. An Optimized Trichloroacetic Acid / Acetone Precipitation Method for Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analysis of Qinchuan Cattle Longissimus Dorsi Muscle Containing High Proportion of Marbling. Published online 2015:1-12. doi:10.1371/journal.pone.0124723
 21. Penataseputro T, Agungpriyono DR, Handharyani E, Prastowo BW. Evaluasi Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat pada Pemurnian Gama Imunoglobulin anti-Aeromonas hydrophila Poliklonal untuk Uji Imunohistokimia. *Acta VETERINARIA Indonesiana*. 2021;9(3):187-194. doi:10.29244/avi.9.3.187-194
 22. Duong-Ly KC, Gabelli SB. *Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation*. Vol 541. 1st ed. Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0
 23. Rahmi H, Hariyanti R, Putri A, Wulandari D. Analysis of Protease and Lipase Fractionation Originated from the Digestive Tract of Vannamei Shrimp (Litopenaeus vannamei). *Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 2020;7(December):194-202.
 24. Novák P, Havlíček V. Protein Extraction and Precipitation. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads: Second Edition*. Published online 2016:52-62. doi:10.1016/B978-0-444-63688-1.00004-5
 25. Wingfield PT. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*. 2001;13(1):1-8. doi:10.1002/0471140864.psa03fs13
 26. Bestman A, Thomas SL, Randle M, Pitt H, Daube M. Large Volume Precipitation of Proteins with Ammonium Sulfate Using Thermo Scientific Fiberlite Carbon Fiber Rotors. *Harm Reduction Journal*. 2018;15(1).
 27. Ferrier DR. Biokimia Edisi Keenam Jilid Satu. Published online 2020:9-27.
 28. Yildiz G. Effect of pH-shifting method on solubility and emulsifying properties of soy protein concentrate. 2019;23(2):159-166. doi:10.29050/harranziraat.427438
 29. Bello I, Adeniyi A, Mukaila T, Hammed A. Optimization of Soybean Protein Extraction with Ammonium. Published online 2023.
 30. Gerde JA, Wang T, Yao L, Jung S, Johnson LA, Lamsal B. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted Nannochloropsis microalgae biomass. *Algal Research*. 2013;2(2):145-153. doi:10.1016/j.algal.2013.02.001
 31. O'Flynn TD, Hogan SA, Daly DFM, O'Mahony JA, McCarthy NA. Rheological and solubility properties of soy protein isolate. *Molecules*. 2021;26(10). doi:10.3390/molecules26103015
 32. Li X, Chen L, Hua Y, Chen Y, Kong X, Zhang C. Effect of preheating-induced denaturation during protein production on the structure and gelling properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*. 2020;105(October 2019):105846. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105846
 33. Warastuti RA, Paute VYJ, Jailani SMD. Test The Content of Globulin, Biuret and Hemoglobin in Blood in Adolescent Women. *Journal of Health, Technology and Science (JHTS)*. 2021;2(1):51-59. doi:10.47918/jhts.v2i1.213
 34. Laksono AS, Marniza, Rosalina Y. Karakteristik Mutu Tempe Kedelai Lokal Varietas Anjasmoro Dengan Variasi Lama Perebusan Dan Penggunaan Jenis Pengemas. *Jurnal Agroindustri*. 2019;9(1):8-18.
 35. Supriyanto, Setyawan B, Ulfa R. Analisis Kandungan Protein Dan Organoleptik Tempe Dengan Media Yang Berbeda. C. 2022;1(1):471-482.
 36. Vital R, Bassinello P, Cruz Q, Carvalho R, de Paiva J, Colombo A. Production, Quality, and Acceptance of Tempeh and White Bean Tempeh Burgers. *Foods*. 2018;7(9):136. doi:10.3390/foods7090136
 37. Suhartanti PD, Handajani S, Nandariyah N. Physical characteristics of the seeds of soybean (Glycine max) varieties and the effect of fermentation time on the chemical characteristics of tempeh. *Cell Biology and*

- Development*. 2019;3(2):63-68.
doi:10.13057/cellbioldev/v030203
38. Rizal S, Kustyawati ME, Suharyono AS, Suyarto VA. Changes of nutritional composition of tempeh during fermentation with the addition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodiversitas*. 2022;23(3):1553-1559.
doi:10.13057/biodiv/d230345
39. Tahir A, Anwar M, Mubeen H, Raza S. Evaluation of Physicochemical and Nutritional Contents in Soybean Fermented Food Tempeh by *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*. 2018;17(1):1-9.
doi:10.9734/jabb/2018/26770
40. Hartantie K, Susilowati E, Sutrisno AD, Sumartini S. Effect of Soybean (*Glycine max*) and Lupin (*Lupinus angustifolius*) Ratios Starter Types, and Both Interactions on Characteristics of Substitued Tempeh. *JURNAL PERTANIAN*. 2020;11(1):1. doi:10.30997/jp.v11i1.2036
41. Ellent SSC, Dewi L, Tapilouw MC. Karakteristik Mutu Tempe Kedelai (*Glycine max* L.) yang Dikemas dengan Klobot. *AGRITEKNO: Jurnal Teknologi Pertanian*. 2022;11(1):32-40.
doi:10.30598/jagritekno.2022.11.1.32