

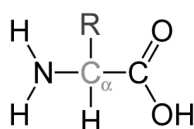
PERCOBAAN 1

PROTEIN: REAKSI UJI TERHADAP ASAM AMINO DAN PENENTUAN KONSENTRASI PROTEIN

PENDAHULUAN

1. a. Asam Amino

Asam amino adalah molekul organik dengan massa molekul kecil (100–200) yang mengandung setidaknya satu gugus karboksil ($-\text{COOH}$) dan satu gugus amino ($-\text{NH}_2$) dan merupakan komponen penting untuk biosintesis protein. Semua asam amino merupakan asam α -amino, kecuali prolin. Variasi yang terjadi pada asam-asam amino terletak pada gugus R atau rantai sampingnya (**Gambar 1.1**). Berdasarkan sifat kimia gugus R, sifat suatu asam amino dapat diramalkan, dan pengetahuan tentang sifat asam amino akan membantu identifikasi jenis gugus samping R.



Gambar 1.1. Struktur umum asam amino. Karbon- α mengikat gugus-gugus: rantai samping, karboksil, dan amino

Ditinjau dari segi struktur, asam amino diklasifikasikan ke dalam tujuh kelompok (**Tabel 1.1**). Klasifikasi ini didasarkan atas sifat kimia gugus R sehingga memudahkan dalam mengingat sifat-sifat umum masing-masing asam amino. Oleh karena itu, klasifikasi gugus R ini dapat digunakan untuk merancang metode analisis suatu asam amino (**Tabel 1.2**).

Tabel 1.1. Klasifikasi asam amino berdasarkan sifat kimia gugus R

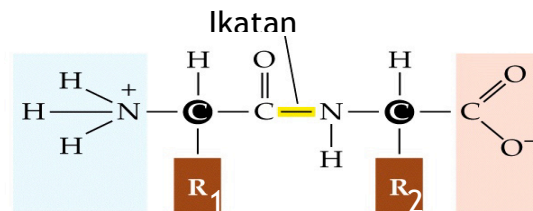
Sifat kimia gugus R	Contoh asam amino
Alifatik	Gly, Ala, Val, Leu
Aromatik	Phe, Tyr, Trp
Hidroksilik	Ser, Thr
Karboksilik	Asp, Glu
Mengandung Sulfur	Cys, Met
Imino	Pro, Hyp
Amino	Lys, Arg
Amida	Asn, Gln

Tabel 1.2. Beberapa reaksi untuk mendeteksi asam amino berdasarkan gugus R

Nama reaksi	Kondisi Reaksi	Asam amino yang dideteksi	Warna
Millon	HgNO ₃ dalam asam nitrat dengan sedikit asam nitrit	Tyr	Merah
Xantoproteik	Pendidihan dalam asam nitrat pekat	Tyr, Trp, Phe	Kuning
Hopkins-Cole	Asam glioksilat dalam H ₂ SO ₄ pekat	Trp	Ungu
Sakaguchi	α-naftol dan natrium hipoklorit	Arg	Merah
Nitroprusida	Natrium nitroprusida dalam NH ₃ encer	Cys	Merah
Pauly	Asam sulfanilat terdiazotasi dalam larutan basa	His, Tyr	Merah
Folin-Ciocalteu	Asam fosfomolibdotungstat	Tyr	Biru

1. b. Protein

Secara kimiawi, protein adalah suatu polimer asam amino. Hidrolisis lengkap protein menghasilkan campuran 20–22 macam asam amino. Struktur protein dibagi dalam empat kelas: primer, sekunder, tersier, dan kuartener. Keempat struktur protein pada dasarnya dibedakan atas jenis dan jumlah ikatan/interaksi kimia. Struktur primer hanya terdiri dari satu jenis ikatan, yaitu ikatan kovalen yang menghubungkan gugus amino dan karboksil antar asam amino atau disebut juga sebagai ikatan amida/peptida (**Gambar 1.2**). Oleh karena itu, struktur primer mengandung informasi urutan asam amino yang menyusun suatu protein.



Gambar 1.2. Ikatan peptida

Ikatan kimia yang terdapat pada struktur sekunder adalah ikatan yang terdapat pada struktur primer (kovalen) dan ikatan hidrogen antara oksigen karbonil dan hidrogen amida (C=O---H—N). Ikatan hidrogen ini terbentuk menurut pola yang teratur sehingga membentuk struktur yang unik seperti α-heliks dan lembaran-β. Struktur tersier merupakan mengemas elemen-elemen struktur sekunder ke dalam bentuk tertentu. Struktur tersier melibatkan interaksi antar gugus samping asam-asam amino pembentuk protein, yaitu ikatan sulfida antar asam amino sistein, ikatan hidrogen, interaksi ionik antar gugus fungsi yang terionisasi, interaksi hidrofobik dan hidrofilik, dan kemungkinan juga terdapat ikatan kovalen koordinasi, seperti pada metaloprotein. Semua ikatan maupun interaksi-interaksi kimia berperan sebagai penstabil, di samping membentuk struktur tersier. Adapun Struktur terakhir adalah struktur kuartener yang terbentuk pada beberapa protein yang memiliki lebih dari satu sub-unit. Pada struktur kuartener terjadi interaksi antar struktur tersier protein membentuk suatu molekul yang

memiliki fungsi biologi tertentu. Ikatan yang terlibat biasanya non-kovalen dan kebanyakan ikatan hidrofobik antar daerah non-polar pada permukaan molekul protein. Haemoglobin, sebagai contoh, terdiri dari empat rantai polipeptida (sub-unit), α , α' , β dan β' . Seluruh sub-unit membentuk haemoglobin tetramer yang memiliki fungsi yang lebih efektif dalam mentransport oksigen dibandingkan haemoglobin monomer.

Perhatian: Beberapa percobaan berikut melibatkan pemanasan reaksi di inkubator-air mendidih. Berhati-hatilah terhadap uap atau permukaan yang panas.

PERCOBAAN

1. Uji Millon

Reagen yang digunakan dalam uji ini adalah larutan merkuri dan ion merkuro dalam asam nitrat dan asam nitrit. Warna merah yang terbentuk adalah garam merkuri dari tirosin yang ternitrasi.

Perhatian: Reagen Millon's mengandung merkuri dan HNO_3 yang bersifat toksik, korosif, oksidator kuat, pengiritasi dan dapat mengakibatkan luka bakar. Kontak dengan bahan yang mudah terbakar akan menimbulkan kebakaran. Hindari kontak mata dan kulit. Dilarang menghirup uap maupun menelan reagen tersebut.

Bahan-bahan:

- Reagen Millon
- 2% gelatin
- Albumin telur

Alat:

- Tabung reaksi
- Pipet tetes
- Gelas ukur

HNO_3

Health	3
Fire	0
Reactivity	0
Personal Protection	

Merkuri

Health	3
Fire	0
Reactivity	0
Personal Protection	

Prosedur:

1. Siapkan 2 buah tabung reaksi yang bersih dan kering, beri label: 2% gelatin dan albumin. Masukkan 2 mL dari masing masing larutan ke tabung reaksi yang sesuai.
2. Tambahkan 3 tetes reagen Millon ke masing masing tabung.
3. Tempatkan tabung reaksi di dalam inkubator air mendidih. Panaskan larutan sampai mencapai titik didihnya. Jika reagen yang ditambahkan terlalu banyak, warna yang terbentuk akan hilang pada pemanasan.
4. Catat pengamatan anda.
5. Buanglah larutan yang mengandung reagen millon ke dalam wadah berlabelkan "Discharded Millon's solution" (di lemari asam). Cucilah tabung reaksi dengan sabun dan bilas dengan air sebanyak tiga kali dan keringkan.

Pertanyaan:

- Apa yang terjadi jika garam merkuri ditambahkan ke dalam protein? Mengapa larutan albumin terkoagulasi? Larutan protein dengan karakterisasi apa yang akan memberikan uji negatif? Mengapa?

2. Reaksi Sistein dan Sistin

2.1 Sistin

Bahan-bahan:

- Sistin

Health	1
Fire	1
Reactivity	0
Personal Protection	A

- NaOH 1 N
- Kristal Pb asetat

Prosedur:

Larutkan sedikit sistin ke dalam 5 mL NaOH 1 N. Tambahkan sedikit kristal Pb-asetat. Panaskan hingga mendidih.

Pertanyaan:

Apa warna endapan? Senyawa apa yang mengendap?

2.2 Sistein (Reaksi Nitroprusida)

Reaksi antara gugus sulfidril dari asam amino (sistein), peptida (glutathion) atau protein dengan nitroprusida dalam suasana amoniak berlebih dapat diterangkan dengan reaksi berikut:



Gambar 1.3 Reaksi yang terlibat dalam uji Nitroprusida

Prosedur:

1. Larutkan sedikit kristal sistein hidrokksida dalam 5 mL air.
2. Tambahkan 0,5 mL larutan nitroprusida 1%
3. kemudian tambahkan 0,5 mL NH_4OH .

Pertanyaan:

1. Apakah warna hasil percobaan? Apakah warna tersebut stabil?
2. Apakah sistin akan memberikan uji positif? Mengapa?
3. Gugus apa dari sistein yang memberikan hasil positif dengan uji nitroprusida?

DAFTAR PUSTAKA

1. Harrow, B. "Laboratory Manual of Biochemistry", Ed. V, 1960
2. Mathews, C.K., Holde, K.E. (1990). Biochemistry, the Benjamin/Cummings Publishing Co., Redwood City, USA

2. Penentuan Kadar Protein Secara Lowry

Penentuan konsentrasi protein merupakan proses yang rutin dilakukan jika bekerja dalam bidang biokimia. Ada beberapa metode yang biasa digunakan untuk menentukan konsentrasi protein, yaitu metode Biuret, Lowry dan lain sebagainya. Masing-masing metode mempunyai kekurangan dan kelebihan. Pemilihan metode yang terbaik dan tepat untuk suatu pengukuran bergantung pada beberapa faktor seperti: banyaknya material atau sampel yang tersedia, waktu yang tersedia untuk melakukan pengukuran, alat spektrofotometri yang tersedia UV atau VIS.

Reagen pendeteksi gugus-gugus fenolik seperti reagen Folin-Ciocalteu telah digunakan untuk menentukan konsentrasi protein oleh Lowry (1951) yang kemudian dikenal dengan metode Lowry. Dalam bentuk yang paling sederhana, reagen Folin-Ciocalteu dapat mendeteksi residu tirosin dalam protein karena kandungan fenolik residu tersebut mampu mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat, yang merupakan konstituen utama reagen Folin-Ciocalteu, menjadi tungsten dan molibdenum yang berwarna biru. Hasil reduksi ini menunjukkan puncak absorpsi yang lebar pada daerah merah dari spektrum sinar tampak 600–800 nm.

Sensitifitas metode Folin-Ciocalteu ini mengalami perbaikan yang cukup signifikan apabila digabung dengan ion-ion Cu (metode Biuret). Kompleks Cu-protein yang dihasilkan oleh reagen Biuret akan menyebabkan reduksi pada fosfotungstat dan fosfomolibdat, seperti yang terjadi pada reagen Folin-Ciocalteu. Kira-kira 75% dari reduksi yang terjadi diakibatkan oleh adanya kompleks Cu-protein tersebut, sementara residu-residu tirosin dan triptofan mereduksi 25% sisanya. Reagen Folin-Ciocalteu merupakan suatu komposisi kompleks yang diperoleh dengan cara pemanasan refluks senyawa Na-tungstat dan Na-molibdat dengan asam orthofosfat. Selain itu disertakan pula komponen-komponen lain untuk meningkatkan kestabilan reagen yang dalam kondisi normal berwarna kuning pucat.

Pada saat menentukan konsentrasi protein dalam suatu sampel, harus dilakukan pula pengukuran terhadap beberapa larutan protein standar yang memiliki rentang konsentrasi tertentu di mana konsentrasi sampel protein berada di dalam rentang tersebut. Protein ditambahkan pertama kali ke dalam tabung reaksi dan diikuti air. Seluruh tabung harus mempunyai volume akhir yang sama dan selalu dilakukan pengadukan setelah penambahan zat/reagen. Reagen penghasil warna selalu ditambahkan terakhir dan biasanya diperlukan selang waktu tertentu untuk terjadi reaksi yang sempurna.

PERCOBAAN

Alat-alat:

Tabung reaksi, spektrofotometer *visible*, *stopwatch*, dan batang pengaduk/vortex

Bahan-bahan:

2% Na₂CO₃ dalam 0,1 N NaOH, 2,7% Natrium Kalium Tartrat, 1% CuSO₄ dalam H₂O, 1 N Reagen Folin-Ciocalteu (Reagen Fenol), dan Standar protein: larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi antara 20–200 µg.

Natrium Kalium Tartrat

Health	2
Fire	1
Reactivity	0
Personal Protection	E

Prosedur:

- Campur larutan protein standar dan air sehingga volumenya tidak melebihi 0,5 mL. Campurkan pula sampel protein dengan air sehingga volume akhir 0,5 mL. (tabel di bawah)
- Tambahkan 2 mL larutan Biuret yang telah disiapkan ke dalam masing-masing tabung
- Inkubasi secara tepat 10 menit pada suhu kamar. Selang waktu ini amatlah kritis. Gunakan stopwatch (nyalakan stopwatch) ketika menambahkan larutan Biuret pada tabung 1, tunggu hingga selang waktu tertentu (minimal 30 detik) sebelum menambahkan larutan biuret pada tabung 2 dan seterusnya.
- Setelah 10 menit tambahkan 0,2 mL reagen fenol ke dalam masing-masing tabung. Kocok segera dengan alat vortex atau pengadukan. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Waktu inkubasi ini dapat dimulai setelah penambahan/pencampuran reagen fenol ke dalam tabung terakhir.
- Baca absorbansinya pada $\lambda = 700 \text{ nm}$ dengan alat spektrofotometer menggunakan tabung-1 sebagai blanko.

Tabel 1.3. Penentuan protein dengan metode Lowry

Penambahan (mL)	Nomor Tabung						
	1	2	3	4	5	6	7
Standar BSA (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-
Sampel protein	-	-	-	-	-	-	0,5
H ₂ O	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-	-
Reagen Biuret	2	2	2	2	2	2	2
Aduk hingga tercampur rata. Inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar							
Reagen Fenol	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Aduk segera hingga tercampur rata. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Baca absorbansinya pada $\lambda = 700 \text{ nm}$ dengan menggunakan tabung 1 sebagai blanko.							
%T _{700nm}							
A _{700nm}							
$\mu\text{g}/\text{aliquot}$ ($\mu\text{g}/\text{tabung}$)							

Pertanyaan :

1. Buatlah kurva standar ($A_{700\text{nm}}$ vs μg protein) dan tentukan konsentrasi protein suatu larutan yang diberikan!
2. Apa kebaikan dan kelemahan metode Lowry ini?
3. Berikan sedikitnya dua metode lain (secara spektrofotometri) yang biasa digunakan untuk menentukan konsentrasi protein selain metode Lowry. Berikan penjelasan mengenai metode-metode tersebut berikut kelebihan dan kekurangannya dibandingkan dengan metode Lowry!

TUGAS PENDAHULUAN

1. Jelaskan prinsip percobaan ini!
2. Gambarkan :
 - a. Struktur asam amino-asam amino penyusun protein yang mengandung gugus fenolik
 - b. Struktur senyawa kompleks Cu-protein hasil reaksi Biuret

3. Mengapa metode Lowry lebih peka dibandingkan metode Biuret dalam menganalisis protein?
4. Adakah metode lain selain spektrofotometri untuk menentukan konsentrasi protein? Jika ada berikan penjelasan mengenai metode tersebut berikut kelebihan dan kekurangannya!

DAFTAR PUSTAKA

1. Colowick, S.P and Kaplan, N.O (1957), "Methods in Enzymology", vol. V, Acad. Press Inc, New York, p. 448-450.
2. Holme, D.J and Peck, H (1993), "Analytical Biochemistry", 2nd Ed., Longman Scientific and Technical, New York.
3. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A and Randall, R.J (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, p.265-275.
4. Alexander, R.R and Griffiths, J.M (1993), "Basic Biochemical Methods", 2nd Ed., A John Wiley & Sons, Inc., New Cork.