



PENENTUAN ASAM AMINO ESENSIAL DALAM LIMBAH PEMBUATAN MINYAK KELAPA (*BLONDO*)

Rugaiyah Arfah

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin
Jalan Perintis Kemerdekaan Km 10, Makassar 90245, Indonesia

ABSTRACT

The aim of this research is to find out types of essential amino acids and their levels in *blondo*, which is byproduct of coconut oil produced by fermentation or cooking processes. Analysis of amino acids was conducted by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) where parameters observed were retention time and area of sample curves compared to the ones of standard. Results showed that each of *blondo* obtained from fermentation and cooking processes contained nine essential amino acids. *Blondo* from the cooking process contained 1.17 % of lysine, 2.07 % of leucine, 1.14 % of isoleucine, 1.39 % of phenylalanine, 1.73 % of valine, 0.35 % of methionine, 4.96 % of arginine, 1.00 % of threonine and 1.01 % of histidine, whereas *blondo* from the fermentation process contained 2.50 % of lysine, 5.33 % of leucine, 3.02 % of isoleucine, 3.62 % of phenylalanine, 4.42 % of valine, 1.34 % of methionine, 10.95 % of arginine, 2.59 % of threonine and 2.35 % of histidine. The level of amino acids in *blondo* was very affected by the process of coconut oil production. The amount of amino acids in *blondo* from the fermentation process was higher than that in *blondo* from the cooking process.

Keywords : essential amino acids, *Blondo*, HPLC

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Minyak goreng yang beredar di Indonesia pada umumnya berasal dari minyak kelapa yang proses pengolahannya dengan cara kering (kopra) dan cara basah, meliputi: cara tradisional (ditanak), cara Churing, dan cara fermentasi. Ketiga cara tersebut menghasilkan produk samping atau limbah berupa protein kelapa (emulgator) yang dikenal dengan nama *blondo*. (Arbianto, 1979; Chaidi, 1990)

Blondo merupakan salah satu sumber protein nabati yang dapat diperoleh dengan mudah karena merupakan hasil samping dari pembuatan minyak dengan cara basah namun belum banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Karena manfaat dan nilai gizinya belum diketahui, maka selama ini *blondo* hanya dijadikan makanan ternak dan sambel. Woodroof (1979) melaporkan bahwa perhitungan konservatif produksi kelapa dunia adalah 5,6 juta ton per bulan. Dari jumlah ini, lebih dari 200.000 ton adalah protein kasar, hanya dalam jumlah kecil digunakan untuk konsumsi manusia.

Protein di dalam tubuh manusia berfungsi sebagai biokatalisator, alat transpor bahan makanan, sumber energi, pembentuk membran sel serta berperan dalam sistem pertahanan tubuh. Protein yang dimakan manusia akan diserap oleh usus dalam bentuk asam amino. Nilai gizi suatu protein ditentukan oleh jenis kandungan asam amino di dalamnya, protein yang banyak mengandung asam amino esensial memiliki nilai gizi yang tinggi. (Sultanry dan Kaseger, 1985; Winarno, 1989)

Telah ditemukan asam amino esensial dalam ikan bermanfaat untuk memperlancar sirkulasi darah pada orang perokok (Welch, 2003). Protein nabati sering kali kekurangan lisin, metionin, dan triptofan. Kebutuhan protein yang disarankan ialah 1 sampai 1,5 g perkilogram berat badan perhari (Poedjiadi, 1994).

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk menganalisis dan mengidentifikasi asam amino esensial yang terdapat dalam *blondo* fermentasi dan *blondo* tanak dengan menggunakan HPLC (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi), alat ini cukup sensitif, selektif, dan analisisnya relatif cepat.

Rumusan Masalah

Sulawesi Selatan merupakan penghasil kelapa yang cukup potensial, sehingga dijumpai beberapa daerah memproduksi minyak kelapa sebagai sumber makanan bergizi. Salah satu hasil samping pembuatan minyak kelapa yang merupakan limbah adalah "*Blondo*" Saat ini dimanfaatkan sebagai makanan ternak. Diduga dalam *Blondo* mengandung asam-asam amino yang esensial yang masih bermanfaat untuk pemenuhan gizi. Berdasarkan fakta tersebut perlu dilakukan penelitian kandungan asam-asam amino esensial antara lain dengan metode HPLC.

Tujuan Penelitian

- Mengetahui jenis dan kadar asam amino esensial yang terkandung dalam *blondo*.
- Mengetahui pengaruh pembuatan minyak terhadap kandungan asam amino esensial dalam *blondo*.

Manfaat Penelitian

Penelitian analisis asam amino esensial dalam blondo diharapkan dapat memberikan informasi tentang kandungan asam amino dalam blondo, terutama asam amino esensial. Dengan demikian, penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan pada pengembangan penelitian lebih lanjut, terutama pengembangan bahan pangan alternatif yang bergizi tinggi untuk pemenuhan asam amino esensial.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah blondo (hasil sampiung pembuatan minyak kelapa). Untuk keperluan analisis digunakan bahan kimia meliputi larutan standar campuran 17 asam amino, pereaksi orthophthaldialdehyd (OPA), NaOH p.a, asam borat, 2-merkaptotanol, Na-EDTA, tetra-hidroksifuran (THF), Natrium Asetat, HCl p.a, asam sulfat, aseton dan eter.

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah peralatan HPLC satu set, neraca analitik, Cawan porselin, sentrifus, pompa vakum, freeze dryer, oven, eksikator, freezer, labu evaporator, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Prosedur Kerja

Penyiapan sampel blondo untuk tahap analisis

Sebanyak 10 gram blondo, baik blondo tanak maupun blondo fermentasi, diekstraksi dengan eter sampai minyak yang masih terdapat dalam blondo larut, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibekukan dalam freezer. Blondo beku dimasukkan ke dalam "freezedryer" dalam keadaan vakum selama \pm 24 jam atau sampai kering. Blondo kering yang diperoleh dianalisis kadar protein kasar, dan asam aminonya.

Penentuan kadar protein secara Kjeldahl

Ditimbang sampel blondo sebanyak \pm 0,1000 gram dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, ditambahkan 2 gram campuran selenium dan 25 ml H₂SO₄ pekat. Selanjutnya dipanaskan di atas pemanas listrik atau api pembakar sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijauan-hijauan (sekitar 2 jam). Dibiarkan dingin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan diencerkan sampai tanda garis. Kemudian dipipet 5 ml larutan dan dimasukkan ke dalam alat penyuling kemudian ditambahkan 5 ml NaOH 30 % dan beberapa tetes indikator PP, disuling selama \pm 10 menit, sebagai penampung digunakan 10 ml larutan asam borat 10 % yang telah ditambahkan indikator, lalu dititrasikan dengan larutan HCl 0,01 N. Dikerjakan penetapan blanko dan kadar protein, dihitung dengan persamaan.

$$\% N = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 0,014 \times f_k \times f_p}{w} \times 100 \%$$

Dimana :

w = bobot cuplikan

V₁ = volume HCl yang dipergunakan penitaran contoh
 V₂ = volume HCl yang dipergunakan penitaran blanko.
 N = normalitas HCl
 f_k = faktor konversi protein dan makanan secara umum : 6,25
 f_p = faktor pengenceran

Preparasi Sampel Blondo Untuk Tahap Analisis Asam amino

Dimasukkan sampel blondo yang mengandung 3 mg protein ke dalam ampul, lalu ditambahkan 1 ml larutan HCl 6 N, dibekukan campuran tersebut dalam es kering - aseton. Digunakan freeze dryer yang dihubungkan dengan pompa vakum untuk mengeringkan beku sampel. Dikeluarkan udara yang ada dalam sampel yang telah dibekukan dengan cara :

- Ampul dikeluarkan dari dalam es - aseton,
- Pada saat campuran tersebut mencair, udara yang terlarut dalam sampel akan keluar. Jika gelembung udara terlalu banyak atau keluar terlalu cepat, ampul dimasukkan ke dalam es kering - aseton dan divakumkan kembali. Cara ini diulangi sampai udara yang ada dalam sampel keluar seluruhnya.

Ampul divakumkan kembali selama 20 menit, kemudian ditutup dengan cara memanaskannya di atas api, dimasukkan ampul yang telah tertutup tersebut ke dalam oven pada suhu 110° C selama 24 jam dan dinginkan sampel yang telah dihidrolisis pada suhu kamar. Dipindahkan isinya ke dalam labu evaporator 50 ml. Ampul dibilas dengan 2 ml HCl 0,01 N dan dimasukkan ke dalam labu evaporator diulangi 2 - 3 kali. Sampel dikeringkan dengan menggunakan *Freeze dryer* dalam keadaan vakum, lalu ditambahkan 5 ml HCl 0,01 N ke dalam sampel yang telah dikeringkan. Larutan sampel ini siap untuk dianalisis kandungan asam aminonya.

Analisis asam amino dengan menggunakan HPLC

Sampel yang telah dihidrolisis disaring dengan kertas saring milipore 0,45 mikron, ditambahkan dapar kalium borat pH 10,4 dengan perbandingan 1 : 1. Ke dalam vial kopsong yang bersih dimasukkan 10 μ l sampel yang telah dicampur dengan dapar kalium boprat dan tambahkan 25 μ l pereaksi OPA, biarkan selama 1 menit agar proses derivatisasi sempurna. Diinjeksikan ke dalam kolom HPLC sebanyak 5 μ l kemudian ditunggu sampai semua asam amino memisah (sekitar 25 menit). Perhitungan konsentrasi asam amino dalam sampel dilakukan dengan cara :

$$\frac{\text{Luas puncak sampel}}{\text{Luas puncak standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

$$\frac{\text{Luas puncak sampel}}{\text{Luas puncak standar}} \times 0,5 \mu\text{mol/ml} \times 5 \text{ ml}$$

Perhitungan persen asam amino dalam sampel dilakukan dengan cara :

$$\% AA = \frac{\mu \text{ mol AA} \times \text{BM AA}}{\mu\text{g sampel}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penetapan Kadar Protein

Persen kadar protein yang diperoleh dengan cara tanak (pemanasan), dan fermentasi dapat dilihat pada Tabel 1 .

Tabel 1. Hasil penetapan kadar protein (%)

Sampel	Pengulangan	Bobot sampel (g)	Volume HCl 0,996 N		Kadar Protein	Rata-rata
			Sampel (ml)	Blanko (ml)		
Pemanasan (tanak)	I	0,1009	3,6	0,1	30,23	30,23
	II	0,1038	3,7	0,1	30,23	
	III	0,1023	3,65	0,1	30,24	
Fermentasi	I	0,1009	8,4	0,1	71,66	71,69
	II	0,0997	8,4	0,1	71,71	
	III	0,1015	8,45	0,1	71,72	

Pada tabel 1 terlihat bahwa kadar protein blonde hasil tanak lebih rendah dibandingkan dengan blonde hasil fermentasi. Hal ini disebabkan karena pada proses pembuatan minyak secara tanak menggunakan pemanasan pada suhu 100°C selama ± 2 jam, dimana pemanasan suhu tinggi menyebabkan putusannya ikatan peptida pada protein, bahkan dengan pemanasan yang terlalu lama pada suhu 100°C akan mengakibatkan terurainya asam-asam amino penyusun protein blonde menjadi CO_2 dan NH_3 yang mudah menguap. Menurut Winarno (1989), protein sangat peka terhadap pemanasan yang terlalu lama sehingga menurunkan nilai gizi protein.

Kadar protein blonde hasil fermentasi adalah 71,64 %, hal ini disebabkan proses pembuatan minyak secara fermentasi menggunakan aktivitas mikroba yang dapat memecah emulsi santan. Santan terdiri dari minyak, air, protein, dan karbohidrat. Menurut Pasulleang dkk (1982), karbohidrat yang terdapat dalam santan diurai oleh mikroba menjadi alkohol dan asam yang akan menurunkan pH campuran. Penurunan pH campuran ini menggumpalkan protein. Kadar protein blonde hasil fermentasi dan tanak pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan kadar protein blonde proses enzimatik, yaitu 3 %. Hal ini disebabkan proses pembuatan minyak secara enzimatik sebagian besar minyak terekstraksi dan protein terhidrolisis menjadi asam amino yang dapat larut dalam cairan substrat (Mahdar dkk, 1990)

Hasil Hidrolisis Sampel Blonde

Alat penganalisa asam amino pada penelitian ini menggunakan HPLC dengan kolom fase terbalik, karena efektif untuk pemisahan asam amino hasil derivatisasi sebelum kolom. Fase diam yang digunakan berupa senyawa nonpolar yaitu, hidrokarbon 18 ($\text{R} = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$) oktadesil, sedangkan fase mobil terdiri dari dapar A (dapar asetat 0,0025 M ; pH 6,5) dan dapar B (larutan metanol 95% dengan gradien), menggunakan detektor fluoresensi sehingga hanya senyawa berfluoresensi yang dapat terdeteksi dengan alat ini. Asam amino sekunder seperti prolin

tidak terdeteksi dengan alat ini karena pereaksi OPA yang digunakan tidak dapat bereaksi dengan asam amino sekunder.

Adapun proses pemisahan asam amino dalam kromatografi cair kinerja tinggi sangat ditentukan oleh mekanisme absorpsi, partisi, penukar ion, dan polaritas larutan, sehingga asam-asam amino akan bergerak ke bawah dengan kecepatan berbeda. Asam aspartat paling cepat bergerak ke bawah, sedangkan lisin paling lambat pergerakannya. Alat penganalisa asam amino berlangsung secara otomatis, sehingga analisis setiap fraksi dan pencatatan dapat dilakukan secara komputerisasi.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa dari hasil analisis diperoleh 15 asam amino baik pada blonde tanak maupun blonde fermentasi dengan kadar yang berbeda. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perbedaan cara pembuatan minyak tidak mempengaruhi jumlah dan jenis asam amino, namun kadarnya sangat dipengaruhi oleh cara pembuatan minyak yaitu kadar asam amino blonde fermentasi secara umum lebih tinggi dibandingkan dengan blonde tanak.

Data jenis asam amino seperti terlihat pada tabel 2 diperoleh dengan cara membandingkan waktu retensi sampel dengan waktu retensi standar. Apabila waktu retensinya sama maka jenis asam aminonya sama, sedangkan konsentrasi diperoleh dengan cara membandingkan luas area di bawah kurva sampel dengan standar asam amino.

Dari hasil analisis diperoleh 15 asam amino, yang paling tinggi kadarnya adalah asam glutamat, sedangkan yang paling rendah adalah metionin, tidak ditemukan triptofan, sistin, glutamin, asparagin, dan prolin. Tidak ditemukannya triptofan karena sampel blonde dihidrolisis dengan asam, sehingga triptofan rusak. Untuk menganalisa asam amino triptofan diperlukan basa kuat seperti NaOH atau $\text{Ba}(\text{OH})_2$, serta asam meta sulfonat yang harganya cukup mahal, sehingga kami tidak menganalisisnya. Selain triptofan, asam amino yang rusak oleh asam adalah glutamin dan asparagin. Kedua asam amino tersebut mengalami deaminasi menjadi glutamat dan aspartat.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa kandungan asam amino esensial dalam blonde ada 9 jenis, jadi blonde tersebut mengandung hampir seluruh asam amino esensial yang sangat dibutuhkan oleh manusia, ini berarti blonde ini merupakan sumber protein nabati yang baik

Tabel 2 . Hasil analisis asam amino dalam blondo

No.	Asam amino	Kadar % (b/b)	
		Blondo tanak	Blondo fermentasi
1.	Asam asparat (Asp)	2,64	6,31
2.	Asam glutamat (Glu)	7,05	13,94
3.	Serin (ser)	1,32	3,31
4.	Histidin (His)*	1,01	2,37
5.	Glisin (Gy)	1,54	3,68
6.	Theonin (THR)*	1,00	2,59
7.	Arginin(ARG)*	4,96	10,95
8.	Alanin (Ala)	1,62	3,56
9.	Tyrosin (Try)	0,57	1,53
10.	Methonin (Met)*	0,35	1,34
11.	Valin (VAL)*	1,73	4,42
12.	Fenilalanin (Phe)*	1,39	3,62
13.	Isoleusin (Ile)*	1,14	3,02
14.	Leusinn (Leu)*	2,07	5,33
15.	Lysin (Lys)*	1,17	2,50
	Kadar total	29,56	68,47

* Asam amino esensial

Pada Tabel 2 terlihat kadar total asam amino yang diperoleh dari masing-masing cara adalah blondo tanak 29,56% dan blondo fermentasi 68,47% sedangkan kadar protein masing-masing blondo seperti pada Tabel 4 yaitu blondo tanak 30,23%, dan blondo fermentasi 71,69%. Adanya perbedaan kadar total asam amino dengan kadar protein kemungkinan karena prolin yang diperkirakan terdapat dalam blondo tidak bereaksi dengan OPA untuk membentuk derivat yang berfluorosensi, triptofan dirusak oleh asam, dan sistein yang teroksidasi menjadi sistin, sehingga mengakibatkan penurunan kadar asam amino total. Selain itu, asam amino lain tidak terdeteksi karena terbatasnya asam amino standar yang tersedia (hanya 15 asam amino).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Blondo fermentasi dan blondo tanak masing – masing mengandung 9 (sembilan) asam amino

esensial hanya konsentrasi yang berbeda yaitu pada blondo tanak mengandung lysin 1,17%, leusin 2,07%, isoleusin 1,14%, fenil alanin 1,39%, valin 1,73% meteonin 0,35% arginin,4,96%, threonin 1,00% dan histidin 1,01%, sedangkan blondo minyak fermentasi mengandung lysin 2,50%, leusin 5,33 %, isoleusin 3,02%, fenil alanin 3,62%, valin 4,42% meteonin 1,34% arginin 10,95%, threonin 2,59% dan histidin 2,35%,

Perbedaan cara pembuatan minyak tidak mempengaruhi jumlah dan jenis asam amino, namun kadarnya sangat dipengaruhi oleh cara pembuatan minyak yaitu kadar asam amino blondo fermentasi secara umum lebih tinggi dibandingkan dengan blondo tanak.

Saran

Blondo Fermentasi dan blondo tanak mengandung asam amino esensial, sehingga diharapkan dapat dijadikan sumber makanan alternatif untuk pemenuhan gizi masyarakat

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1990, *Cara Uji Makanan dan Minuman SII*, Laboratorium Terpadu IPB, Bogor.
- Arbianto, P., 1979, *Production of Coconut Oil by the Fermentation Process*, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung.
- Arbianto, P., 1993, *Biokimia. Konsep-konsep Dasar*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta.
- Chaidi, Z., 1990, Proses Pembuatan Minyak Goreng dari Kelapa Secara Fermentasi dengan Menggunakan Mikroba yang Terdapat pada Tapai Singkong, *Jurnal Matematika dan Pengetahuan Alam* 1 (1): 108-114.
- Lehninger, A.L., 1990. *Dasar-dasar Biokimia*, Diterjemahkan oleh Meggy Thunawidjaya, Jilid I, Erlangga, Jakarta.

- Noor, A., W. Permadi, dan P. Budi, 1997, *Sistem Instrumentasi Kromatografi Gas dan Cair*, Seri Monograf Kapita Selekta Kimia Analisis, Laboratorium Kimia Radiasi Jurusan Kimia FMIPA UNHAS. Makassar.
- Parakkasi, A., 1992, *Biokimia, Nutrisi, dan Metabolisme. Pemakaian Secara Klinis*, UI Press, Jakarta.
- Perham, R.N., 1975, *Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis*. Department of Biochemistry and St. John's College, Cambridge, Academic Press London, New York, San Fransisco.
- Poedjarti, S., 1993, *Penentuan Kualitatif dan Kuantitatif Asam Amino dalam Kapang dengan Penganalisis Asam Amino Otomatis*, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, UI Press, Jakarta.
- Sultanry, R., dan Kaseger, B., 1985, *Kimia Pangan*, Badan Kerjasama Perguruan Tinggi Negeri Indonesia Bagian Timur, Ujung Pandang.
- Welch, L., 2003., *Amino Acid Found in Fish Helps Maintain Circulation in Smokers*, Alaska Journal of Commerce.
- Winarno, F.G., 1989, *Kimia Pangan dan Gizi*, Gramedia, Jakarta.
- Wirahadikusumah, M., 1983, *Biokimia, Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*, ITB, Bandung.