

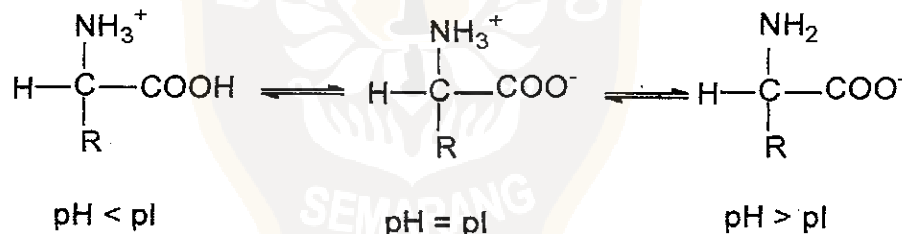
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Protein

Protein merupakan salah satu kelompok bahan makronutrien dengan berat molekul bervariasi antara 5000 sampai jutaan. Karena molekulnya yang besar, maka protein mudah sekali mengalami perubahan bentuk fisis ataupun aktivitas biologisnya [8].

Molekul protein sendiri merupakan rantai panjang yang tersusun oleh mata rantai asam-asam amino. Asam amino dalam kondisi netral (pH isoelektrik, pI) berada dalam bentuk ion dipolar. Derajat ionisasi dari asam amino sangat dipengaruhi oleh pH [9].



Gambar II.1. Rumus Dasar Asam Amino

#### 2.1.1 Sifat Fisikokimia Protein

Sifat fisikokimia setiap protein tidak sama, tergantung pada jumlah dan jenis asam aminonya. Berat molekul protein sangat besar dan bila protein dilarutkan dalam air akan membentuk suatu dispersi koloidal [9].

Adanya gugus amino dan karboksil bebas pada ujung-ujung rantai molekul protein, menyebabkan protein mempunyai banyak muatan dan bersifat amfoter. Pada pH rendah, gugus amino bereaksi dengan  $H^+$ , sehingga protein bermuatan positif. Sebaliknya pada pH tinggi molekul protein bermuatan negatif. Pada pH tertentu yang disebut titik isoelektrik muatan gugus amino dan karboksil bebas akan saling menetralkan sehingga molekul bermuatan nol. Tiap jenis protein mempunyai titik isoelektrik yang berlainan dan pengendapan paling cepat terjadi pada titik ini <sup>[9]</sup>.

### 2.1.2. Struktur Protein

Struktur primer merupakan struktur yang paling sederhana, berupa susunan linear asam amino dalam protein. Asam-asam amino yang menyusun protein dihubungkan oleh ikatan peptida dan hidrogen. Oleh karena itu rantai polipeptida yang terbentuk tidak berupa rantai lurus, melainkan berbentuk rantai terpilin. Struktur seperti ini disebut struktur sekunder <sup>[10]</sup>.

Sedangkan struktur tersier merupakan struktur yang lebih kompleks, karena adanya beberapa ikatan yang menghubungkan antara struktur sekunder yang satu dengan struktur sekunder yang lain. Ikatan-ikatan yang terlibat adalah ikatan hidrogen, ikatan ionik (elektrostatik), ikatan disulfida, ikatan hidrofobik serta ikatan hidrofilik <sup>[10]</sup>. Struktur kuarterner adalah struktur yang melibatkan beberapa polipeptida dalam membentuk suatu protein. Pada umumnya ikatan-ikatan yang terlibat sampai dengan terbentuknya protein sama dengan ikatan yang terjadi pada struktur tersier <sup>[9]</sup>.

### 2.1.3. Denaturasi Protein

Bila susunan ruang atau rantai polipeptida suatu molekul protein berubah namun tanpa merusak struktur primernya dikatakan protein ini terdenaturasi. Denaturasi dapat diartikan pula sebagai suatu proses terpecahnya ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, ikatan garam, dan terbukanya lipatan molekul<sup>[9]</sup>.

Perubahan struktur molekul protein yang terdenaturasi akan membuka gugus reaktif yang ada pada rantai polipeptida. Selanjutnya akan terjadi pengikatan kembali pada gugus reaktif yang sama atau yang berdekatan. Bila unit ikatan yang terbentuk cukup banyak sehingga protein tidak lagi terdispersi sebagai suatu koloid, maka protein tersebut mengalami koagulasi<sup>[11]</sup>.

Protein yang terdenaturasi berkurang kelarutannya. Lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik berbalik keluar, sedangkan bagian luar yang bersifat hidrofil terlipat ke dalam. Peristiwa ini terjadi pada saat larutan protein telah mendekati pH titik isoelektrik dan akhirnya protein akan menggumpal dan mengendap<sup>[9]</sup>.

Faktor-faktor yang dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein adalah: temperatur panas, tekanan hidrostatik, perlakuan mekanik, pH ekstrem, penambahan pelarut organik, detergen, garam dll.<sup>[12]</sup>

Denaturasi yang disebabkan oleh pengaruh pH bersifat reversibel. Tetapi akan bersifat ireversibel apabila terjadi hidrasi pada ikatan peptida, deamidasi dari Asparagin dan Glutamin, kerusakan gugus Sulfhidril pada pH alkalin atau agregasi<sup>[12]</sup>.

#### 2.1.4. Protein Kedelai

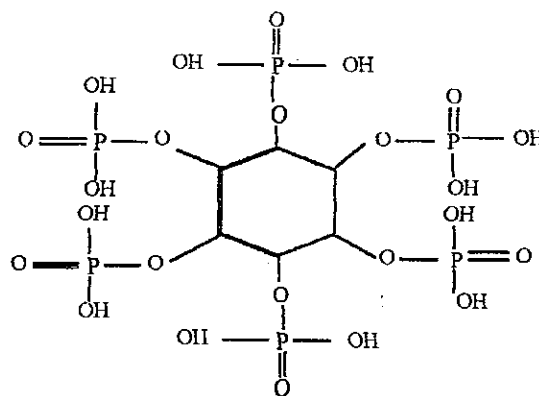
Semua asam amino esensial terdapat dalam kedelai, sehingga dengan memanfaatkan kedelai maka kepentingan gizi akan protein terpenuhi. Bagian utama penyusun protein kedelai adalah globulin yang jumlahnya hampir 90 %<sup>[13]</sup>.

Protein yang terekstrak di dalam air dapat dipisahkan menjadi empat fraksi berdasarkan pada kecepatan sedimentasinya, yaitu 2S, 7S, 11S dan 15S. Fraksi 7S ( $\beta$ -konglisinin) dan 11S (glisinin) merupakan fraksi protein dalam kedelai dengan jumlah yang relatif besar yaitu masing-masing 37 % dan 31 %. Dibandingkan fraksi 2S dan 15S yang masing-masing berjumlah 22 % dan 11 %<sup>[3]</sup>.

Kadar protein kedelai  $\pm$  40-42 %, memiliki *Protein Efficiency Ratio* (PER) 0-4 %, daya cerna 85 %, dan nilai biologis 65 %. Dengan demikian maka kedelai merupakan bahan makanan sumber protein yang sangat baik<sup>[14]</sup>.

#### 2.2. Asam Fitat

Asam Fitat pertama kali dijumpai tahun 1872 oleh Pfeffer. Struktur yang diusulkan oleh Anderson (1914) merupakan struktur yang lebih sesuai dengan asam fitat yang ada di alam, khususnya tumbuhan yaitu  $C_6H_{18}O_{24}P_6$ <sup>[15]</sup>.



Gambar II.2. Struktur Asam Fitat

Asam fitat secara umum dikenal sebagai asam mioinositol heksafosfat atau 1,2,3,4,5,6 heksakis (dihidrogen fosfat). Istilah fitin menunjukkan garam kalsium–magnesium fitat. Sedangkan fitat diartikan sebagai mono-dodeka anion dari asam fitat. Fitat biasanya disimpan dalam bentuk mudah larut seperti natrium atau kalium-fitat<sup>[16]</sup>.

Asam fitat merupakan tempat penyimpanan 60 % - 90 % fosfor yang terdapat pada berbagai bijian<sup>[17]</sup>. Kandungan asam fitat dari berbagai varietas kedelai berkisar antara 1 % - 4,7 % (b/b) berat kering dengan kandungan total fosfor antara 51,4 % - 57,1 % (b/b)<sup>[18]</sup>. Setelah kedelai diolah lebih lanjut menjadi produk makanan seperti susu kedelai, tahu serta produk kedelai non fermentasi lainnya ternyata tidak mempengaruhi kadar asam fitatnya, hanya pada produk hasil fermentasi menunjukkan adanya penurunan kadar asam fitat<sup>[4]</sup>.

### **2.2.1. Interaksi Fitat dengan Protein**

Fitat membentuk ikatan elektrostatik yang kuat dengan asam amino bergugus basa pada pH rendah sehingga mampu mengendapkan beberapa jenis protein. Pada kondisi pH netral dan alkali baik fitat maupun protein memiliki muatan negatif yang mengakibatkan disosiasi di antara ke duanya<sup>[19]</sup>.

Fitat adalah agen pengkelat yang kuat yang dapat mengikat mono dan divalen ion logam dan protein membentuk kompleks fitat yang tak larut<sup>[20]</sup>.

Kelarutan protein di bawah titik isoelektriknya dipengaruhi oleh fitat karena pada kondisi tadi fitat dapat berikatan dengan gugus basa dari protein melalui gugus lisil, histidil, arginil dan gugus amino termal. Presipitasi protein dari larutan di bawah titik isoelektrik oleh asam kompleks tertentu dan polifosfat

(fitat) dapat dianggap sebagai pembentukan garam tak terionisasikan. Dimana protein bertindak sebagai kation dan fitat menyediakan anion untuk bereaksi<sup>[15]</sup>.

Fitat mempunyai muatan negatif pada pH rendah, pH netral maupun pada pH tinggi, jadi perubahan pH tidak akan mempengaruhi muatan listrik Fitat. Perubahan pH akan merubah muatan gugus karboksil atau gugus amino pada molekul protein. Ikatan secara langsung antara fitat dengan protein di atas titik isoelektriknya karena gugus  $\text{NH}_2$  terminal atau  $\text{NH}_2$  lisil dari protein masih dalam bentuk terprotonasi<sup>[15]</sup>. Pendapat yang lain yaitu ikatan tersebut dapat terjadi dengan perantaraan ion logam polivalen<sup>[5]</sup>.

Meski pada titik isoelektrik protein bermuatan netral namun ternyata fitat masih dapat berikatan dengan protein. Ikatan ini adalah bersifat spesifik, yakni ketika protein-fitat telah berikatan maka tidak bisa lagi diendapkan<sup>[21]</sup>.

### 2.2.2. Manfaat Fitat

Fitat memiliki manfaat yang banyak bagi kesehatan manusia. Misalnya, karena afinitasnya yang kuat terhadap kalsium maka memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi salah satu bahan dalam produk untuk menjaga kesehatan gigi dan mulut serta untuk mencegah teresorpsi tulang. Makanan dengan kadar fitat yang tinggi juga terbukti efektif untuk mengobati pasien yang menderita batu ginjal dan hiperkalsiuri. Hasil penelitian epidemiologi juga menunjukkan bahwa konsumsi fitat memiliki korelasi negatif dengan insiden batu ginjal. Penggunaan eritrosit yang diperkaya oleh fitat terus dikembangkan untuk mengatasi gangguan akibat organ iskemia, himolitik anemia, depresi pernafasan dan eritrositosis. Penghambatan  $\alpha$ -amilase oleh fitat bisa memperkecil kenaikan kadar gula dalam

darah, hal ini tentu bermanfaat bagi penderita diabetes. Fitat juga bermanfaat untuk menurunkan kadar kolesterol darah serta sebagai penawar keracunan timah hitam. Namun demikian sejauh ini manfaat fitat bagi kesehatan justru dimungkinkan berawal dari kemampuannya sebagai antioksidan yang dapat memperkecil resiko terjadinya kanker<sup>[4]</sup>.

Sifat-sifat antioksidan yang dimiliki oleh fitat bisa dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami. Efek antioksidatif fitat diketahui mampu bertahan sampai 12 bulan ketika dikaji penggunaannya pada emulsi air dalam minyak pada suhu kamar. Penggunaan fitat ternyata dapat mengurangi pembentukan senyawa malonaldehida pada produk daging ayam yang sudah dimasak dan disimpan pada suhu 4 °C<sup>[4]</sup>. Penelitian tentang penggunaan fitat pada daging sapi giling yang sudah dimasak juga dilaporkan bisa menghambat laju kerusakan yang diakibatkan oleh reaksi oksidasi lemak. Diduga dalam hal ini fitat mampu mengikat besi yang dibebaskan dari mioglobin dan membuatnya tidak bisa berperan lagi sebagai katalisator dalam reaksi oksidatif<sup>[22]</sup>.

### **2.3. Tahu**

Menurut standar industri Indonesia (SII), tahu adalah makanan padat yang dicetak dari susu kedelai dengan proses pengendapan protein pada titik isoelektriknya tanpa atau dengan penambahan bahan lain yang diijinkan<sup>[23]</sup>.

#### **2.3.1. Nilai Gizi**

Komposisi tahu sedikit bervariasi antara lain ditentukan oleh jenis kedelai yang digunakan sebagai bahan dasar serta macam proses pengolahan yang

dilakukan. Atas dasar bahan kering, tahu mengandung 59,18 % protein, 30,24 % lemak, 2,69 % abu dan 7,89 % karbohidrat (b/b)<sup>[24]</sup>.

Selain sebagai sumber protein tahu juga merupakan sumber kalsium yaitu mineral yang sangat penting untuk kesehatan gigi dan tulang. Mineral lainnya yang terdapat dalam tahu adalah besi, fosfat, kalium, natrium, vitamin B kolin dan vitamin E<sup>[25]</sup>.

### 2.3.2. Koagulan

Koagulan pada pembuatan tahu adalah bahan yang ditambahkan pada susu kedelai agar protein kedelai menggumpal<sup>[25]</sup>. Ada berbagai macam penggumpal yang dapat digunakan :

1. Tipe nigari atau klorida:  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CaCl_2$ , air laut<sup>[26]</sup>.
2. Tipe sulfat:  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ <sup>[27]</sup>.
3. "*Glucono Delta Lactone*" (GDL), merupakan ester yang didehidrasi satu molekul  $H_2O$  dari asam glukonat, yang berupa serbuk warna putih dan tidak berbau<sup>[28]</sup>.
4. Tipe Asam: asam asetat<sup>[29]</sup>, asam sitrat<sup>[30]</sup>, asam laktat.

Penggumpalan susu kedelai merupakan tahap yang penting pada pembuatan tahu. Faktor-faktor yang mempengaruhi penggumpalan tahu antara lain: varietas bahan dasar, prosentase protein dalam kedelai, suhu pemanasan susu kedelai, konsentrasi susu kedelai, suhu penggumpalan, pH, tipe penggumpal dan lain sebagainya<sup>[31]</sup>.



### 2.3.3. Protein Rekoveri Tahu

Tahu diharapkan memiliki kadar protein rekoveri yang tinggi, karena akan menguntungkan baik ditinjau dari segi pemenuhan gizi maupun dari segi ekonomi. Ada tiga hal yang berpengaruh terhadap hal ini yaitu kondisi ekstraksi protein, penggumpalan serta jenis protein yang digumpalkan. Ekstraksi protein umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu : perbandingan bahan dengan pelarut, suhu dan lama waktu ekstraksi <sup>[24]</sup>.

Kadar protein rekoveri juga dipengaruhi oleh faktor lain yaitu jenis protein yang hendak digumpalkan. Fraksi-fraksi kecil seperti 2S dan 7S memiliki kecenderungan sulit untuk bergabung dengan ikatan yang kuat<sup>[3]</sup>.

### 2.3.4. Tekstur Tahu

Tekstur tahu sangat erat berhubungan dengan jenis bahan penggumpal yang digunakan dan juga jenis protein bahan dasar. Pada penggumpalan protein menggunakan asam akan dihasilkan tahu yang mempunyai tekstur lebih lunak dibandingkan bila menggunakan penggumpal tipe nigari atau sulfat <sup>[24]</sup>.

Selain jenis bahan penggumpal, jenis protein yang terkandung pada bahan dasar juga sangat berpengaruh terhadap kekompakan tekstur tahu. Tahu yang dibuat dari fraksi 11S memiliki sifat lebih keras dan lebih elastis dibandingkan dengan fraksi 7S atau fraksi yang lebih kecil lagi yang dapat menyebabkan tahu menjadi lunak<sup>[3]</sup>.

Fitat juga dapat mempengaruhi tekstur tahu. Penambahan sejumlah fitat pada susu kedelai pada proses pembuatan tahu yang digumpalkan dengan Kalsium Sulfat menyebabkan tahu berkurang kekerasannya<sup>[19]</sup>. Penjelasan dari fenomena

ini adalah bahwa fitat bereaksi dengan kation divalen dan protein menghasilkan endapan koloidal yang dapat mengikat lebih banyak air dalam gel tahu. Alasan yang lain adalah bahwa terjadi kompetisi antara fitat dengan protein guna memanfaatkan penggumpal untuk mengendap<sup>[3]</sup>.

#### **2.4. Metode Kjeldahl**

Metode Kjeldahl digunakan untuk menganalisis kadar protein kasar dalam bahan makanan secara tidak langsung, karena yang dianalisis dengan cara ini adalah kadar nitrogennya (N)<sup>[9]</sup>.

Dasar perhitungan penentuan protein menurut metode ini adalah hasil penelitian dan pengamatan yang menyatakan bahwa umumnya protein alamiah mengandung unsur N rata-rata 16 %<sup>[31]</sup>.

Penentuan protein berdasarkan jumlah N menunjukkan protein kasar karena selain protein juga terikut senyawaan N bukan protein, misalnya: urea, asam nukleat, amonia, nitrat, nitrit, asam amino, amida, purin dan pirimidin<sup>[31]</sup>.

##### **2.4.1 Tahap Destruksi<sup>[31]</sup>**

Pada tahapan ini sampel dipanaskan dalam asam sulfat pekat sehingga terjadi destruksi menjadi unsur-unsurnya. Elemen karbon, hidrogen, teroksidasi menjadi CO, CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O sedangkan nitrogennya (N) akan berubah menjadi (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Untuk mempercepat proses destruksi sering ditambahkan katalisator berupa campuran Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrid dan CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O. Melalui penambahan katalisator tersebut titik didih asam sulfat akan dipertinggi sehingga destruksi

berjalan lebih cepat. Kadang-kadang juga diberikan selenium untuk mempercepat proses oksidasi karena zat tersebut selain menaikkan titik didih juga mudah mengadakan perubahan dari valensi rendah atau sebaliknya.

#### 2.4.2 Tahap Distilasi<sup>[31]</sup>

Pada tahap ini, amonium sulfat dipecah menjadi  $\text{NH}_3$  (amonia) dengan penambahan NaOH sampai alkalis dan dipanaskan. Agar selama distilasi tidak terjadi “*superheating*” ataupun pemercikan cairan atau timbulnya gelembung gas yang besar, maka dapat ditambahkan logam zink dan batu didih.

Amonia yang dibebaskan selanjutnya akan ditangkap oleh larutan asam standar dalam jumlah yang berlebihan. Asam standar yang digunakan adalah asam klorida atau asam borat.

#### 2.4.3 Tahap Titrasi

Apabila penampung distilat digunakan asam klorida maka sisa asam klorida yang tidak bereaksi dengan amonia dititrasi dengan NaOH standar. Akhir titrasi bila menggunakan indikator fenolftalein ditandai dengan perubahan warna larutan dari jernih menjadi merah muda dan tidak hilang selama 30 detik<sup>[31]</sup>.

Apabila penampung destilat digunakan asam borat maka banyaknya asam borat yang bereaksi dengan amonia dapat diketahui dengan titrasi menggunakan HCl dengan indikator hijau bromkresol dan merah metil. Akhir titrasi ditandai dengan perubahan warna larutan dari biru menjadi merah muda<sup>[32]</sup>.