

Muyassaroh1)*, Rini Kartika Dewi2), Faidliyah Nilna Minah3): penentuan kadar protein pada spirulina platensis menggunakan metode lowry dan kjeldah

PENENTUAN KADAR PROTEIN PADA SPIRULINA PLATENSIS MENGUNAKAN METODE LOWRY DAN KJELDAH

Muyassaroh1)*, Rini Kartika Dewi2), Faidliyah Nilna Minah3)

Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, ITN Malang
Jl. Bendungan Sigura-gura No.2 Malang, 56145, Telp 0341-551431, Fax 0341-553015
* Penulis Korespondensi : muyassaroh@lecturer.itn.ac.id

Abstrak.

Kadar protein yang sangat tinggi pada spirulina platensis atau ganggang hijau kebiruan ini bisa dimanfaatkan sebagai sumber protein untuk bahan baku industri makanan. Untuk memperoleh kandungan protein yg tinggi, terlebih dahulu dilakukan kultivasi spirulina menggunakan air laut yg dicampur dg air RO dg media pupuk walne Adapun untuk menentukan kandungan protein yg terdapat pada spirulina platensis hasil kultivasi bisa digunakan metode Lowry dengan spektrofotometer UV-VIS, panjang gelombang 650 nm, reagen folin dan larutan yg lain sehingga diketahui kadar protein.nya menggunakan larutan BSA (Bovine Serum Albumin). dan sebagai perbandingan digunakan metode Kjeldahl, karena pada metode ini biasa digunakan secara Internasional dan masih merupakan metode standar untuk perbandingan terhadap semua metode lainnya. Pada metode ini presisinya tinggi dan biasa digunakan untuk estimasi protein. Sebagai pelarut digunakan HCl karena jenis pelarut ini memiliki tekanan osmotik cukup tinggi sehingga dapat dengan mudah memisahkan protein terhadap komponen yg lain. Dalam penelitian ini digunakan variabel kecepatan sentrifugal, kecepatan magnetic stirrer dan lamanya pengadukan pada magnetic stirrer, dan hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi diperoleh menggunakan metode Lowry.pada kecepatan sentrifugal 6000 rpm, kecepatan magnetic stirrer 500 rpm dan waktunya 15 menit sebesar 37,5144 %

Kata kunci : *Spirulina Platensis; Metode Lowry; Metode Kjeldahl; Spektrofotometer.*

ESTIMATION OF PROTEIN CONTENT IN SPIRULINA PLATENSIS UNDER LOWRY'S AND KJELDAHL'S METHOD

Abstract.

High protein content found in spirulina platensis or blue-green algae ranks among the best protein source for raw materials of food industry. To obtain this high protein content, cultivation process of spirulina was done by dipping spirulina into sea water which had previously mixed with RO water and walne fertilizer. In this study, protein content was estimated by applying Lowry's Method with spectrophotometer UV-VIS, with wave length of 650 mm, folin reagent and other solvents into the cultivation results, and also with the aids of BSA (Bovine Serum Albumin) solvent. Kjeldahl method was used as the comparative variable, as this method has been widely and internationally used, and long-time claimed as the standard method to estimate the protein content. HCl was used as the solvent for the reason that this short of solvent has considerably high osmotic pressure, the, it can effortlessly detach protein from other ingredients. This study employed centrifugal speed variable, magnetic stirrer speed and length of stirring on magnetic stirrer. The research result showed that Lowry's method could result in the highest protein content by setting the centrifugal speed at 6000 rpm, magnetic stirrer speed at 500 rpm in 15 minutes, the content of which was found to be 37,5144%

Keywords: *Spirulina platensis; Lowry Method; Kjeldahl Method; Spectrophotometer.*

PENDAHULUAN

Di zaman modern ini, manusia mulai menyadari pentingnya hidup sehat sehingga mengalami peningkatan perhatian terhadap makanan fungsional (Kotilainen, et al. 2006, Robertford, 2000), makanan fungsional dapat diproduksi dengan cara menambahkan bahan-bahan yang memberikan efek baik untuk kesehatan (Mollet dan Rowland, 2002, Young, 2000), dapat memberikan system kekebalan bagi tubuh dan meningkatkan system antibody, serta sebagai sumber energy dan gizi (Roberfroid, 2000).

Spirulina sp (*cyanobacteria*) merupakan sumber pangan fungsional potensial yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku industri makanan karena mengandung protein 60–71%, lemak 8%, karbohidrat 16%, dan vitamin serta 1,6% *Chlorophyll-a*, 18% *Phycocyanin*, 17% β -*Carotene*, dan 20–30% γ -linoleic acid dari total asam lemak (Jongkon P., Siripen T and Richard D. L. 2008). Kandungan nutrisi mikroalga jenis ini memiliki potensi yang besar untuk dimanfaatkan sebagai sumber protein. Mikroalga jenis ini tidak hanya bertindak sebagai sumber protein sel tunggal (PST), tetapi juga memberikan beberapa manfaat lainnya antara lain: makanan pelengkap atau suplemen, sumber karotenoid, klorofil dan sumber mikronutrien (Phang, et.al, 2000). Dalam perkembangannya, *Spirulina* sp digunakan sebagai bahan tambahan untuk pembuatan biscuit, roti dan minuman, bahkan oleh International Association of Applied Microbio-logy menyatakan bahwa *spirulina* sp merupakan sumber makanan masa depan. Di negara Jepang, Amerika, Eropa, Australia dengan perkembangan bioteknologi telah meluncurkan produk pangan yang dikenal dengan makanan kesehatan. Di Indonesia suplemen yang bahan dasarnya diperoleh dari mikroalga diberi nama dengan Hi-Liena dari jenis *spirulina*, sp. (Kabinawa, 2001). Colla et al. (2004) melaporkan bahwa pengolahan *Spirulina* yang dijual dalam bentuk kapsul atau di dalam makanan seperti aneka minuman dan pasta telah menunjukkan khasiat pengobatan dalam perlakuan kondisi seperti hiperkolesterolemia dan aterosklerosis.

Untuk mendapatkan kadar protein yang tinggi dalam *spirulina* dikenal dengan berbagai macam metode untuk memisahkan protein dengan kandungan yang lain yang terdapat dalam *spirulina platensis*, diantaranya adalah metode Kjeldahl dan metode Lowry.

Metode Kjeldahl

Analisis protein dalam bahan pangan dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode kuantitatif dan kualitatif. Kadar protein yang ditentukan berdasarkan cara Kjeldahl disebut sebagai kadar protein kasar (crude protein) karena terikat senyawaan N bukan

protein. Prinsip kerja dari metode Kjeldahl adalah protein dan komponen organik dalam sampel didestruksi dengan menggunakan asam sulfat dan katalis. Hasil destruksi dinetralkan dengan menggunakan larutan alkali dan melalui destilasi. Destilat ditampung dalam larutan asam borat. Selanjutnya ion-ion borat yang terbentuk dititrasi dengan menggunakan larutan HCl. Metode Kjeldahl merupakan metode yang sederhana untuk penetapan nitrogen total pada asam amino, protein dan senyawa yang mengandung nitrogen. Sampel didestruksi dengan asam sulfat dan dikatalisis dengan katalisator yang sesuai sehingga akan menghasilkan amonium sulfat. Setelah pembebasan dengan alkali kuat, amonia yang terbentuk didistilasi secara kuantitatif ke dalam larutan penyerap dan ditetapkan secara titrasi. Metode ini telah banyak mengalami modifikasi. Metode ini cocok digunakan secara semimikro, sebab hanya memerlukan jumlah sampel dan pereaksi yang sedikit dan waktu analisa yang pendek. Cara Kjeldahl digunakan untuk menganalisis kadar protein kasar dalam bahan makanan secara tidak langsung, karena yang dianalisis dengan cara ini adalah kadar nitrogennya. Dengan mengalikan hasil analisis tersebut dengan angka konversi 6,25, diperoleh nilai protein dalam bahan makanan itu. Untuk beras, kedelai, dan gandum angka konversi berturut-turut sebagai berikut: 5,95, 5,71, dan 5,83. Angka 6,25 berasal dari angka konversi serum albumin yang biasanya mengandung 16% nitrogen. (Kurniawan, 2013)

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(A-B) \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 100\%}{\text{Berat sampel}} \quad (1)$$

Keterangan :

A : Volume (ml) HCl untuk mentitrasi larutan dalam contoh

B : Volume (ml) HCl larutan blanko

N : Normalitas HCl standar yang digunakan

14,007 : Berat atom Nitrogen

6,25 : Faktor konversi protein

Metode Lowry

Pemilihan metode yang baik 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 (VIS atau UV). Reagen pendeteksi gugus-gugus fenolik seperti reagen folin dan ciocalteu telah digunakan dalam penentuan 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 dalam residu tersebut mampu mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat, yang merupakan konstituen utama

Muyassaroh1)*, Rini Kartika Dewi2), Faidliyah Nilna Minah3): penentuan kadar protein pada spirulina platensis menggunakan metode lowry dan kjeldahl

reagen folin ciocalteu, menjadi tungsten dan molibdenum yang berwarna biru.

Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Beberapa pereaksi yang digunakan dalam metode Lowry
Pereaksi A: 2 g Na₂CO₃ dilarutkan dalam 100 ml Na

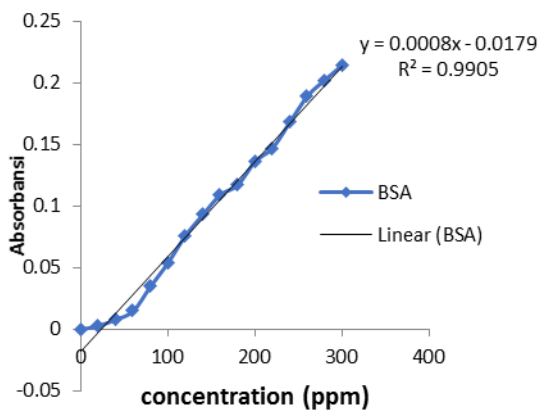
mL NaOH

Pereaksi B: 5mLCuSO₄.5H₂O1% ditambahkan ke dalam 3 mL larutan Na/K tartarat 1%

Pereaksi C: 2 mL pereaksi B+100 ml pereaksi A

Pereaksi D: Reagen folin cioceleau diencerkan dengan aquadest (1:1)

Larutan Standar: Larutan BSA (Bovine Serum Albumin).



Gambar 1. Kurva Standar BSA

Metode dalam penentuan konsentrasi protein:

Filtrat hasil ekstraksi diambil sebanyak 1 ml lalu ditambahkan aquadest hingga volumenya 4 ml. Dicampurkan dengan 5 mL pereaksi C dan campuran diaduk rata kemudian dibiarkan selama 15 menit pada suhu kamar. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Serapannya diukur menggunakan Spektrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 650 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein pada mikroalga Spirulina sp. Digunakan kurva standar BSA (Bovine Serum Albumin). Larutan standar BSA dibuat dengan konsentrasi 0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 220; 240; 260; 280; 300 ppm

METODE PENELITIAN

Metode Lowry

Ekstraksi

- Spirulina sp. Hasil kultivasi dengan metode miquel allen dengan pencahayaan matahari yang sudah kering (serbuk) ditimbang sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dengan 50 ml buffer fosfat pH 7.

- Dilakukan pengadukan dengan Magnetic stirrer pada suhu kamar, selama (15, 20, 25, 30, 35 menit) dengan kecepatan bervariasi 250, 500, 750, 1000, 1250 rpm.
- Dicentrifuse untuk memisahkan filtrate dan endapan pada suhu kamar selama 30 menit dengan kecepatan bervariasi 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 rpm,
- filtrate terpisah dari endapan, filtrate digunakan untuk menentukan kadar protein dan endapan digunakan untuk uji karbohidrat.

Metode Kjeldahl

Analisis kadar protein metode mikrokjeldahl.

Prinsip kerjanya adalah sejumlah sampel ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam tabung kjeldahl 30 ml. Kedalamnya ditambahkan 1, gram K₂SO₄, 40mg HgO dan 20 ml H₂SO₄. Jika sampel lebih dari 15 mg kemudian di tambahkan 0,1ml H₂SO₄ untuk setiap 10 mg bahan organik. Selanjutnya sampel di didihkan selama 1-1,5 jam sampai cairan jernih dan di dinginkan. Isi labu kjeldahl di pindah kan dalam alat destilasi.labu di cuci dan dibilas 1-5 kali dengan 1-2 ml air.Air cucian di masukan dalam alat destilasi kemudian di tambahkan 8-10 ml larutan NaOH-Na₂S₂O₃. Erlemeyer 125 ml yang berisi 5 ml H₃BO₃ dan 2-4 tetes indikator di letakan di bawah kondensor. Ujung tabung kodensor harus terendam di bawah larutan H₃BO₃. setelah itu di lakukan destasi sampai di peroleh kira kira 15 ml destilasi dalam erlenmeyer. Tabung kondensor dibilas air dan bilasanya di tampung dalam erlenmeyer yang sama. Isi erlenmeyer di encerkan sampai 50 ml kemudian dititras dengan HCl 0,02 N sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu. Hal ini di lakukan terhadap blanko

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Standar BSA

Kurva standar BSA perlu dilakukan karena menjadi dasar penentuan konsentrasi kadar protein di dalam larutan. Sebagai kurva standar yang menghubungkan antara konsentrasi dan absorbansinya. Konsentrasi standar BSA sebelumnya didapatkan dari nilai absorbansi panjang gelombang maksimum BSA. Setelah itu, pada nilai panjang gelombang 650 nm dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi BSA. Selanjutnya, kurva standar digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang konsentrasinya belum diketahui. Kurva standar BSA dibuat menggunakan larutan BSA dengan variasi konsentrasi 0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 220; 240; 260; 280; 300 ppm. Sebagai blanko digunakan aquades dan didapatkan kurva standar BSA sebagai berikut

Dari kurva standart BSA, diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0008X - 0,0179$ dimana x sebagai konsentrasi dan y absorbansi. Koefisien korelasi 0,9905. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai konsentrasi protein pada spirulina sp. Hal ini bisa dilihat pada Tabel 1, 2 dan 3

Tabel 1. Kadar protein Spirulina sp dengan variasi kecepatan Magnetic stirrer bervariasi

| Sampel (rpm) | Rata-rata Absorbansi | Konsentrasi (ppm) | Total N | % protein (lowry) | %protein (kjeldahl) |
|--------------|----------------------|-------------------|---------|-------------------|---------------------|
| 250 | 0,0030 | 26,150 | 0,0167 | 33,3151 | 20,55 |
| 500 | 0,0044 | 27,913 | 0,0188 | 37,5144 | 23,48 |
| 750 | 0,0032 | 26,346 | 0,0159 | 31,7204 | 22,50 |
| 1000 | 0,0030 | 26,121 | 0,0146 | 29,2553 | 23,48 |
| 1250 | 0,0034 | 26,654 | 0,0168 | 33,5843 | 20,85 |

Tabel 2. Kadar protein Spirulina sp dengan variasi kecepatan sentrifuse

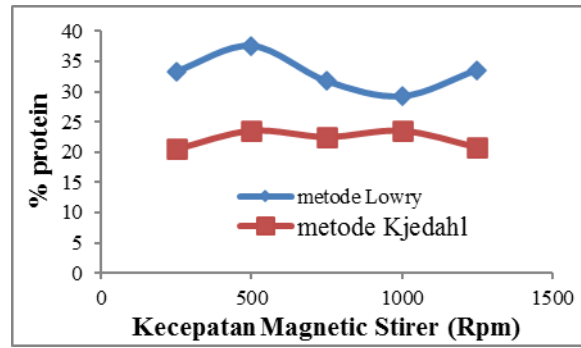
| Sampel (rpm) | Rata-rata Absorbansi | Konsentrasi (ppm) | Total N | % protein (lowry) | %protein (kjeldahl) |
|--------------|----------------------|-------------------|---------|-------------------|---------------------|
| 2000 | 0,002 | 25,025 | 0,0151 | 30,1301 | 27,08 |
| 3000 | 0,003 | 25,929 | 0,0167 | 33,3242 | 24,98 |
| 4000 | 0,004 | 26,825 | 0,0146 | 29,2929 | 23,48 |
| 5000 | 0,004 | 27,271 | 0,0179 | 35,8121 | 28,65 |
| 6000 | 0,004 | 27,913 | 0,0188 | 37,5144 | 24,15 |

Tabel 3. Kadar protein Spirulina sp dengan variasi waktu Magnetic stirrer

| Sampel (rpm) | Rata-rata Absorbansi | Konsentrasi (ppm) | Total N | % protein (lowry) | %protein (kjeldahl) |
|--------------|----------------------|-------------------|---------|-------------------|---------------------|
| 15 | 0,00443 | 27,912 | 0,0187 | 37,5144 | 23,48 |
| 20 | 0,004 | 27,363 | 0,0172 | 34,3235 | 15,38 |
| 25 | 0,003 | 26,467 | 0,0167 | 33,3480 | 16,95 |
| 30 | 0,004 | 27,358 | 0,0172 | 34,4715 | 19,28 |
| 35 | 0,003 | 26,675 | 0,0168 | 33,6105 | 16,43 |

Persentase protein dengan variabel kecepatan Magnetic Stirrer

Dalam penentuan kadar protein pada spirulina sp, variasi kecepatan magnetic stirrer dibutuhkan untuk menghomogenkan suatu larutan antara spirulina sp dengan buffer fosfat, jika kecepatannya kurang mengakibatkan kurang homogen dan menyebabkan kadar proteinnya terpisah tidak sempurna dan hasilnya jadi kecil.

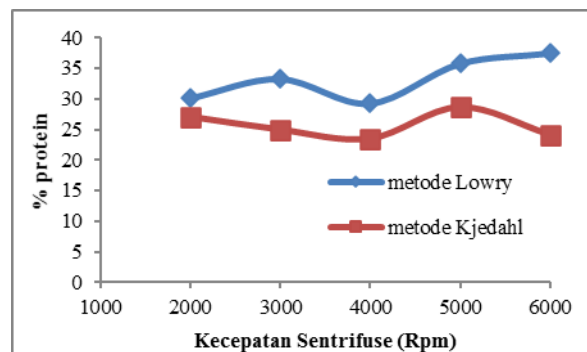


Gambar 2. Hubungan antara kecepatan Magnetic Stirrer dengan kadar protein

Kadar protein spirulina sp dengan menggunakan metode Kjeldahl nilainya lebih tinggi jika dibandingkan dengan metode lowry untuk variasi kecepatan Magnetic stirrer terlihat pada Gambar 2 hal ini disebabkan karena dalam metode kjeldahl yang di analisa adalah kadar protein kasar (crude protein) yaitu senyawaan N bukan protein, prosedurnya lebih panjang sehingga memungkinkan terjadi kesalahan karena kurang teliti yang dapat mempengaruhi hasil akhir. Sedangkan untuk metode Lowry prosedur lebih sederhana dan hanya tergantung dari keakuratan alat spektrofotometer dan kadar protein tertinggi dicapai angka 37,5144 % pada kecepatan magnetic stirrer 500 rpm.

Kecepatan Centrifuse

Kecepatan centrifuse mempengaruhi terpisahnya antara filtrate dan endapan, jika endapan terpisah sempurna dengan filtrate akan menghasilkan analisa kadar protein yang sempurna, dimana filtratnya akan digunakan untuk uji kadar protein dan endapannya untuk uji karbohidrat. Semakin tinggi kecepatannya tentunya membutuhkan waktu yang relative singkat.



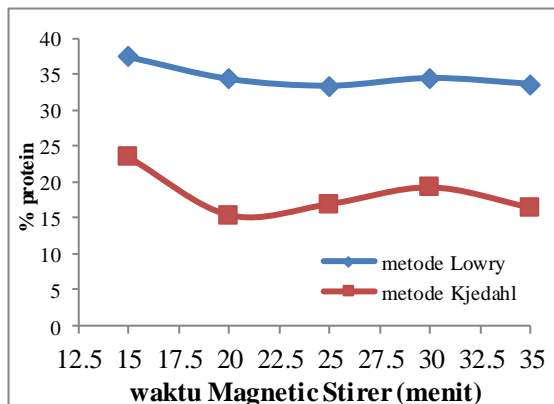
Gambar.3 Hubungan antara kecepatan Centrifuse dengan kadar protein

Muyassaroh1)*, Rini Kartika Dewi2), Faidliyah Nilna Minah3): penentuan kadar protein pada spirulina platensis menggunakan metode lowry dan kjeldahl

Pada Gambar 3, kadar protein tertinggi diperoleh 37,5144% pada kecepatan centrifuse 6000 rpm menggunakan metode Lowry dan terendah 23,48 rpm pada kecepatan centrifuse 4000 rpm menggunakan metode Kjeldahl. Pada variasi kecepatan centrifuse ini dihasilkan kadar protein tertinggi juga dihasilkan dari metode Lowry hal ini disebabkan pada metode Kjeldahl kurang akurat bila diperlukan pada senyawa yang mengandung atom nitrogen yang terikat secara langsung ke oksigen atau nitrogen dan spirulina sp termasuk ke dalam golongan ini.

Lamanya pengadukan dalam Magnetic stirrer.

Waktu pengadukan dalam magnetic stirrer bertujuan untuk mencampur spirulina sp dengan buffer fosfat agar tercampur secara merata yang dapat mempengaruhi proses berikutnya yang pada akhirnya dapat menentukan hasil dari kadar protein. Jika proses pemisahan antara protein dengan komposisi lainnya misalnya karbohidrat dan yang lainnya terpisah secara sempurna, maka akan diperoleh kadar protein yang tinggi yang dapat dimanfaatkan untuk keperluan yang lain, misalnya sumber protein dalam makanan fungsional, kecantikan dan yang lain.



Gambar 4. Hubungan antara waktu Magnetic Stirrer dengan kadar protein

Dalam variasi waktu magnetic stirrer dihasilkan kadar protein tertinggi yaitu 37,5144% terjadi pada waktu pengadukan 15 menit, waktu yang tidak lama karena jika diaduk terlalu lama menyebabkan larutan menjadi terpisah yang menyebabkan kadar protein akan berkurang.

SIMPULAN

Metode Lowry menghasilkan kadar protein yang lebih tinggi dibanding dengan metode kjeldahl baik untuk variasi waktu pengadukan dengan magnetic stirrer, kecepatan magnetic stirrer dan kecepatan centrifuse. Kadar protein tertinggi yang dihasilkan dari penelitian ini yaitu 37,5144% terjadi pada waktu pengadukan dengan magnetic stirrer 15 menit, kecepatan magnetic stirrer 500 rpm dan kecepatan sentrifuse 6000 rpm menggunakan metode Lowry. Metode kjeldahl kurang baik digunakan untuk pemisahan protein terhadap komponen lainnya khususnya untuk spirulina sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Borowitzka, A.M., dan Lesly B. J. 1988. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Australia
- Colla LM, Bertolin TE, Costa JAV. 2004. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Z. Naturforsch* 59c: 55-59.
- Jongkon P., Siripen T and Richard D. L. 2008. Phytoremediation of Kitchen Wastewater by *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geiteler: Pigment content, Production Variable Cost and Nutritional Value. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 2 (2): 159– 171
- Kabinawa, I.N.K. 2001. Mikroalga sebagai sumber daya hayati perairan dalam perspektif bioteknologi Puslitbang Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Bogor.
- Kotilainen, L., R. Rajalahti, C. Ragasa, E. 2006 Health enhancing foods opportunities for strengthening the sector in developing countries Agriculture and Rural Development discussion paper 30
- Kurniawan, Gigih 2013 Protein Analysis Kjeldahl Method, <http://chemistryinorganic.blogspot.com/013/03/Protein-Kjeldahl.html> (online). Diakses pada tanggal 31 Oktober 2013
- Lowry HO, Rosenbrough, NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 193:265-275
- Miftahur Rohman dan Andi Setiawan Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Lampung, Bandar Lampung.

Mollet, B., & I. Rowland. 2002. Functional food; At the frontier between food and pharma current opinion in biotechnology, 13;483-485.

Roberfroid, M.B. 2000. a Concepts and strategy of functional food science : The European perspective. The American Journal of Clinical Nutrition, 71:S660-S1664.