

PREPARASI CONTOH UNTUK ANALISIS ASAM AMINO DARI BERBAGAI BAHAN BERPROTEIN

Sumardi

Puslitbang Kimia Terapan - LIPI

INTISARI

Preparasi contoh merupakan salah satu mata rantai yang terpenting dalam metoda analisis asam amino dari bahan berprotein, karena dalam tahap inilah dapat terjadi hal-hal yang dapat menyebabkan kesalahan dan variasi data analisis yang cukup besar. Kegiatan utama dalam preparasi contoh adalah penguraian protein menjadi asam-asam amino bebas melalui hidrolisis, baik dengan larutan asam, basa maupun enzim agar asam amino tersebut dapat dianalisis dengan berbagai teknik. Karena asam-asam amino dapat mengalami kerusakan atau degradasi dalam suasana hidrolisis tersebut maka masalah utama yang dihadapi ialah bagaimana memperkecil kesalahan analisis dengan mengusahakan agar komposisi asam amino dari larutan hidrolisat yang dihasilkan sesuai dengan contoh yang dianalisis. Dalam makalah ini akan dibahas beberapa faktor yang dapat menyebabkan kerusakan asam amino dalam media hidrolisis, usaha-usaha untuk memperbaiki kondisi hidrolisis agar kerusakan dapat ditekan, dan cara-cara koreksi untuk memperbaiki ketepatan data analisis. Cara-cara hidrolisis yang ditinjau meliputi : (i) Dengan larutan HCl 6N pada suhu 110°C dan 145°C untuk analisis sebagian besar asam amino; (ii) Dengan larutan HCl 6N setelah contoh dioksidasi dengan asam performat, untuk analisis metionin dan sistin (sistein); (iii) Dengan larutan basa yaitu natrium hidroksida atau barium hidroksida, untuk analisis triptofan. Aspek keandalan metoda yang meliputi presisi dan ketepatan data analisis yang dihasilkan melalui cara hidrolisis tersebut juga dibahas. Disimpulkan bahwa untuk dapat menganalisis seluruh asam amino dari suatu contoh diperlukan penggunaan beberapa cara hidrolisis atau p^{re}parasi contoh sekaligus.

ABSTRACT

Sample preparation is the most important step besides other analysis steps in the determination of amino acid composition of protein materials, since major inaccuracies and lack of precision of analytical data may arise from this analysis step. The sample preparation includes hydrolysis, i.e. treatment of sample with an acid, a base or enzymes to hydrolyse proteins into amino acids which may then be determined using various methods. Since the hydrolysis procedure can lead to incomplete recovery and degradation or destruction of some amino acids, it is of urgent necessity that the hydrolysis conditions used must produce protein hydrolysates that truly reflect the amino acid composition of proteins in the original sample, so that erroneous estimate of the amino acid composition may be prevented. Factors affecting the degree of destruction of amino acids in the hydrolysis step, various hydrolysis conditions for minimizing the destruction, as well as corrective measures for improving the accuracy of the

analysis results are discussed. The hydrolysis methods elaborated in this paper includes: (i) The use of 6N hydrochloric acid solution at 110 and 145°C for the analysis of most amino acids. (ii) The use of 6N hydrochloric acid solution after pre-hydro-lysis oxidation procedure using performic acid for methionine and cystine determination; (iii) The use of sodium hydroxide or barium hydroxide solutions for tryptophan determination. Both precision and accuracy of the analytical data resulted from the application of those hydrolysis methods are also discussed. It may be concluded that in order to be able to determine all of the amino acids in the sample, more than one hydrolysis procedure or sample preparation method have to be used.

PENDAHULUAN

Analisis komposisi asam-asam amino dalam protein bertujuan untuk mengetahui mutu protein tersebut sehingga dalam hal ini diperlukan ketepatan ("accuracy") dan ketelitian ("precision") data yang tinggi. Kesalahan 10 % saja untuk jenis asam amino tertentu, terutama yang termasuk dalam kategori "limiting amino acids" dapat mengakibatkan penilaian yang keliru terhadap mutu protein tersebut.

Untuk analisis asam-asam amino itu sendiri dewasa ini telah dapat dilakukan dengan berbagai teknik seperti kromatografi penukar ion, kromatografi cairan berkinerja tinggi, kromatografi gas, yang sudah dikembangkan sedemikian rupa sehingga dapat memberikan ketepatan dan ketelitian yang tinggi. Namun sebelum contoh bahan berprotein itu dianalisis dengan teknik tersebut, perlu dilakukan penguraian protein tersebut menjadi komponen-komponen asam aminonya. Penguraian protein ini dilakukan melalui cara hidrolisis dengan asam, alkali atau enzim. Di sini diharapkan bahwa komposisi asam amino dalam hidrolisat yang dihasilkan dapat mencerminkan komposisinya dalam contoh yang dianalisis.

Masalah utama yang dihadapi dalam analisis asam-asam amino dalam berbagai bahan adalah bagaimana kita dapat memperoleh larutan hidrolisat yang kadar asam-asam aminonya sesuai dengan komposisi asam amino dalam contoh tersebut. Jadi apabila sebuah contoh yang mengandung protein dihidrolisis, misalnya dengan larutan HCl 6N pada suhu 110°C selama 24 jam dalam suatu tabung tertutup, protein yang terkandung dalam contoh itu diharapkan terurai dengan sempurna menjadi asam-asam amino bebas. Hasil analisis asam-asam amino tersebut

diharapkan sesuai dengan komposisi asam-asam amino yang sebenarnya dalam contoh di atas. Namun telah banyak diketahui bahwa beberapa asam amino tertentu dapat mengalami kerusakan (degradasi) atau perubahan dalam kondisi hidrolisis seperti di atas. Besar-kecilnya degradasi, selain tergantung kepada kondisi hidrolisis, juga kepada zat-zat atau komponen lain yang berasal dari matriks contoh (yaitu karbohidrat, lemak, unsur mineral dan sebagainya); bahkan asam amino yang satu dapat berinteraksi dengan asam amino yang lain. Dengan demikian komposisi asam amino dalam larutan hidrolisat menjadi kurang sesuai dengan komposisinya dalam contoh yang dihidrolisis. Maka hasil analisis hidrolisat mengandung kesalahan yang perlu dikoreksi. Selain itu juga belum tentu bahwa semua asam amino telah dibebaskan dengan sempurna dari struktur proteininya.

Makalah ini akan meninjau cara preparasi, khususnya hidrolisis dari contoh, yang diperlukan dalam analisis komposisi asam amino dari berbagai bahan, baik bahan nabati, hewani maupun protein murni. Cara hidrolisis dengan enzim yang dewasa ini kurang dipakai, tidak akan ditinjau di sini.

Masalah-masalah yang akan dibicarakan terutama adalah: (i) Kondisi hidrolisis yang dapat menghasilkan larutan hidrolisat yang sesuai komposisi asam-asam amino-nya dengan contoh yang dianalisis; (ii) Apabila komposisi itu kurang sesuai, tindakan korektif apa yang dapat dilakukan untuk memperbaiki ketepatan hasil analisisnya. Untuk dapat memecahkan masalah-masalah di atas, perlu diketahui lebih dahulu sifat masing-masing asam amino dalam kondisi hidrolisis tersebut. Sifat-sifat yang dimaksud meliputi kemungkinan degradasi (kerusakan) maupun reaksi-reaksi yang dapat dialami. Kemudian akan ditinjau langkah-langkah yang telah dilakukan orang untuk menghindarkan degradasi tersebut serta cara-cara koreksi yang telah dilakukan untuk memperoleh hasil analisis yang lebih tepat. Akhirnya akan ditinjau cara-cara preparasi (khususnya hidrolisis) contoh yang dewasa ini dianggap paling memadai untuk analisis asam-asam amino dalam berbagai jenis bahan berprotein atau bahan biologis.

KERUSAKAN ASAM - ASAM AMINO DALAM PROSES HIDROLISIS DENGAN LARUTAN HCl 6N

Cara hidrolisis contoh yang paling banyak dipakai saat ini adalah cara yang menggunakan larutan HCl 6N. Maka pembicaraan disini akan dibatasi pada yang menyangkut penggunaan larutan HCl 6N tersebut.

Kadar protein dalam bahan biologis dapat berkisar dari nol hingga 30 - 40 %, kecuali untuk protein murni yang dapat mendekati 90 % atau lebih. Untuk menganalisis komposisi asam amino dalam bahan seperti ini tidaklah mudah, terutama apabila protein harus dipisahkan dari komponen-

komponen matriks bahan yang lain (karbohidrat, lemak, dan sebagainya) terlebih dahulu. Maka orang memilih untuk menganalisis langsung contoh yang telah dihidrolisis, tentunya dengan menyadari semua konsekuensinya. Masalah utama yang dihadapi ialah efek komponen matriks terhadap penguraian protein dan terhadap asam-asam amino yang telah dibebaskan dalam larutan hidrolisat.

Kesulitan dalam cara hidrolisis dengan larutan HCl 6N adalah: (i) Lambatnya pemecahan ikatan-ikatan peptida yang tersembunyi dan yang amat kuat sifat ikatannya; (ii) Mudah rusaknya beberapa asam amino tertentu oleh asam atau zat lain yang dapat bereaksi dengannya. Selain protein, komponen bahan lainnya seperti karbohidrat juga akan mengalami penguraian dalam proses hidrolisis itu. Kemudian hasil-hasil penguraian itu dapat berinteraksi dengan asam amino. Yang paling tak dikehendaki ialah berubah atau rusaknya asam-asam amino yang telah dibebaskan dari struktur proteininya. Kemungkinan reaksi-reaksi itu akan berkurang apabila kadar komponen non-protein lebih kecil, sehingga efek matriks lebih kecil.

Karbohidrat dapat mengganggu karena terbentuknya senyawa humin, yang berupa partikel-partikel yang dapat menyerap asam-asam amino tertentu seperti sistin, triptofan, tirosin, arginin dsb. (16). Beberapa asam amino justru tidak terpengaruh, misalnya leusin, valin, isoleusin (26). Lemak yang juga dapat mengganggu dapat dihilangkan dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut organik. Dengan demikian tantangan yang dihadapi ialah bagaimana meningkatkan ketabilan atau mencegah kerusakan asam-asam amino dalam proses hidrolisis yang dipakai tersebut. Asam-asam amino yang tak dilaporkan mengalami degradasi ialah prolin, glisin, alanin, leusin, sedangkan asam-asam amino yang lain akan mengami kerusakan (3, 24, 32) yaitu seperti diuraikan di bawah ini.

(i) Sistin

Apabila sistin dipanaskan dalam larutan HCl 6N, sebagian akan berubah menjadi sistein.



Adanya oksigen (dari udara) dapat mempercepat reaksi tersebut (3), lebih-lebih bila ada triptofan atau karbohidrat (7). Apabila ada karbohidrat, dalam hidrolisat akan terjadi humin, yaitu produk dekomposisi karbohidrat atau karbohidrat protein yang berwarna coklat tua. Partikel-partikel humin dapat mengadsorpsi sistin dan berkondensasi dengan sistein. Makin banyak humin yang terjadi, makin banyak sistin yang hilang (15). Hal yang sama akan dialami oleh triptofan, tirosin dan arginin (16,26). Dipercepatnya dekomposisi sistin oleh adanya karbohidrat dapat disebabkan oleh bereaksinya sistein dengan gula sederhana yang terjadi sebagai hasil penguraian polisakarida oleh asam (23,9). Untuk menghilangkan efek merusak dari karbohidrat terhadap asam amino, orang telah menggunakan volum HCl 6N yang berlebihan untuk hidrolisis

("500 volumes"), namun ternyata bahwa sistin dan metionin masih tetap terdegradasi dalam kondisi tersebut (5).

(ii) Metionin

Metionin dapat teroksidasi oleh oksigen dari udara membentuk metionin sulfoksida. Maka hidrolisis dengan kondisi yang bebas oksigen telah dicoba (20), demikian pula penambahan fenol ke media hidrolisis untuk mencegah oksidasi tersebut (13). Efek merusak dari karbohidrat terhadap metionin juga telah diamati orang (7).

(iii) Triptofan

Dalam kondisi hidrolisis dengan larutan HCl 6N, triptofan dalam keadaan sendiri akan terdegradasi; terlebih -lebih apabila bercampur dengan asam-asam amino yang lain. Di lain pihak, dalam larutan NaOH 5N pada suhu 100°C, triptofan stabil dalam keadaan sendiri dan terdegradasi sedikit bila bercampur dengan asam-asam amino seperti sistin, sistein serin, treonin dan lantionin termasuk dengan karbohidrat (28). Maka dari itu cara hidrolisis untuk analisis triptofan tidak menggunakan asam, melainkan menggunakan basa.

(iv) Fenilalanin, lisin, arginin, histidin, asam glutamat

Dalam pustaka tak ditemukan terjadinya degradasi fenilalanin kecuali dari Anderson *et al.* (3) yang melaporkan kehilangan 5,5 % dalam hidrolisis dengan HCl 6N di bawah nitrogen. Demikian juga untuk lisin, kecuali yang dilaporkan oleh Smith dan Stockell (24) pada hidrolisis di bawah hampa. Degradasi histidin, asam glutamat dan arginin dilaporkan oleh Tristram (32).

(v) Asam aspartat, serin, treonin dan tirosin

Adalah menguntungkan bahwa ikatan peptida yang mengandung serin, treonin dan asam aspartat amat mudah dihidrolisis dari pada ikatan yang mengandung asam-asam amino lainnya (24,32). Maka hidrolisis selama 20 jam pada suhu 110°C dengan HCl 6N sudah dapat membebaskan mereka dari struktur proteinnya. Sebaliknya serin, treonin, asam aspartat dan tirosin diketahui selalu terdegradasi pada kondisi hidrolisis tersebut, meskipun di bawah hampa sekalipun (3, 25, 21, 32, 10, 14, 12). Kecepatan degradasinya sekitar 0-15 % dalam 24 jam hidrolisis, dengan ammonia sebagai salah satu hasil akhir degradasinya. Degradasi tirosin pernah diduga dikatalisasi oleh asam aspartat, atau karena klorinasi oleh klor. Klorinasi ini sebabkan adanya oksidator kuat dalam media HCl; fenol dapat dipakai untuk mencegahnya (3).

(vi) Valin dan isoleusin

Ikatan peptida yang mengandung isoleusin atau valin amat sulit diuraikan dengan hidrolisis asam ini. Diperlukan waktu hidrolisis yang lama pada 110°C (100 jam atau lebih) untuk membebaskan semua valin dan isoleusin dari

protein induknya (3,32). Misalnya kecepatan hidrolisis peptida valil-glisin dan glisil-valin masing-masing hanya 1,5 % dan 31 % dari glisil-glisin. Yang perlu dicatat ialah bahwa valin dan isoleusin stabil dalam kondisi hidrolisis dengan larutan HCl 6N ini.

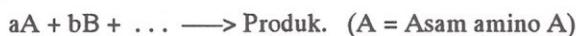
CARA-CARA MENCEGAH KERUSAKAN ASAM AMINO DAN CARA-CARA KOREKSI UNTUK MEMPERBAIKI KETEPATAN HASIL ANALISISNYA

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa masalah masalah yang dihadapi dalam proses penguraian protein melalui hidrolisis dengan HCl 6N adalah: (i) Ketidaksempurnaan penguraian, dimana sebagian asam amino (misalnya isoleusin dan valin) masih terikat dalam ikatan peptida atau dalam struktur protein, meskipun waktu hidrolisis sudah cukup panjang; (ii) Kerusakan asam-asam amino disebabkan mudah berasiksinya asam amino yang bersangkutan dengan asam, oksigen atau komponen lain dalam larutan hidrolisat. Kerusakan asam amino dalam larutan hidrolisat terjadi: (a) Sewaktu asam amino yang bersangkutan sudah dibebaskan dari protein induknya. Besar kerusakan disini belum dapat diukur. (b) Sewaktu asam amino yang bersangkutan sudah dibebaskan dari protein. Tingkat degradasinya di sini dapat diukur dan kecepatannya dinyatakan dalam % per jangka waktu hidrolisis tertentu (misalnya per 24 jam). Angka-angka ini kadang-kadang disebut faktor destruksi atau faktor degradasi, yang besarnya tergantung kepada jenis asam amino, jenis contoh dan kondisi hidrolisis (24).

Untuk menentukan faktor degradasi itu dapat digunakan dua cara, yaitu: (i) Dengan menganalisis campuran asam amino sintetik yang diketahui komposisinya menurut prosedur yang identik dengan pada waktu menganalisis contoh. Kemudian perolehan (%-recovery) dari setiap asam amino dihitung dari hasil analisis yang didapatkan. Faktor degradasi yang diperoleh hanyalah merupakan estimator yang sifatnya mendekati, karena campuran sintetik itu tidak sama dengan contoh yang sesungguhnya, artinya tidak mengandung matriks contoh yang sesungguhnya. Padahal faktor degradasi tergantung kepada jenis contoh. (ii) Dengan cara ekstrapolasi ke titik awal hidrolisis. Caranya ialah dengan mengikuti hasil analisis asam-asam amino yang diperoleh melalui hidrolisis yang waktunya divariasi, misalnya 24 jam, 48 jam, 72 jam, dan sebagainya. Dengan mengekstrapolasi hasil analisis ke kondisi tanpa degradasi atau waktu hidrolisis 0 jam, kita dapat memperoleh komposisi asam amino yang sesungguhnya dalam contoh yang di analisis.

Cara ekstrapolasi ke titik awal hidrolisis di atas adalah berdasarkan anggapan bahwa reaksi degradasi asam amino berlangsung seperti reaksi kimia orde pertama, yaitu reaksi yang kecepatannya hanya ditentukan oleh konsentrasi salah satu zat yang ikut serta dalam reaksi tersebut, dalam hal ini

adalah asam amino yang bersangkutan. Misalnya reaksi degradasi tersebut dinyatakan sebagai berikut:



Kecepatan reaksinya:

$$\frac{dC_A}{dt} = -k_A \cdot C_A$$

dimana C_A = konsentrasi A; k_A = konstanta kecepatan reaksi.

$$\frac{dC_A}{C_A} = -k_A dt$$

dengan integrasi akan menjadi:

$$\ln C_A = -k_A t + O_A$$

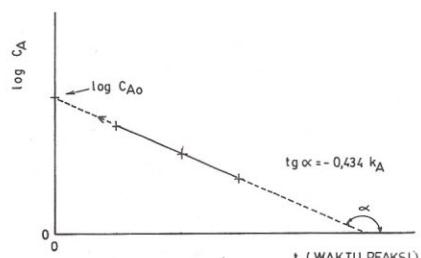
dimana O_A adalah tetapan spesifik untuk kondisi reaksi yang tertentu. Misalnya konsentrasi A pada waktu reaksi $t = 0$ adalah C_{AO} , maka:

$$\ln C_A - \ln C_{AO} = -k_A t$$

$$\log C_A - \log C_{AO} = -0,434 k_A t$$

$$\log C_A = \log C_{AO} - 0,434 k_A t$$

Dari persamaan yang terakhir maka grafik antara $\log C_A$ terhadap t akan berupa garis lurus dengan sudut arah α seperti terlihat dalam Gambar 1 (34). Maka ekstrapolasi garis tersebut ke waktu reaksi $t = 0$ akan mendapatkan C_{AO} yaitu kadar asam amino yang belum mengalami degradasi dalam larutan hidrolisis. C_{AO} dianggap sesuai dengan kadar asam amino yang bersangkutan dalam contoh yang dianalisis.



Gambar 1. Cara ekstrapolasi ke titik awal hidrolisis.

Usaha-usaha yang dilakukan untuk mencegah gangguan dan mengurangi kerusakan asam amino dalam proses hidrolisis dengan HCl 6N diuraikan sebagai berikut.

Gangguan lemak perlu dicegah melalui ekstraksi contoh dengan pelarut organik untuk mengambil lemak yang terkandung di dalamnya. Pelarut organik yang dipakai misalnya ialah petroleum eter, eter, kloroform, dan sebagainya.

Guna mengurangi gangguan karbohidrat, volume larutan HCl 6N yang digunakan hendaknya berlebihan untuk menekan konsentrasi komponen karbohidrat dalam media hidrolisis. Penggunaan HCl 6N yang disarankan ialah "500 volumes", artinya 500 mg (= 0,50 mL) HCl 6N per mg contoh. Namun perlu dicatat bahwa meskipun untuk asam-

asam amino yang lain cara ini berhasil menekan kerusakan oleh karbohidrat, bagi sistin dan metionin cara ini kurang berhasil (5).

Dalam analisis triptofan, contoh tidak dihidrolisis dengan larutan HCl 6N, melainkan dengan larutan basa seperti NaOH atau Ba(OH)₂ atau dengan enzim. Hal ini untuk mencegah kerusakan triptofan. Degradasi metionin dalam media HCl 6N dapat dicegah dengan menambahkan zat-zat seperti misalnya fenol (13,6), asam tioglikolat (18); atau meniadakan okigen yang dapat mengoksidasi metionin. Cara yang kini banyak dipakai ialah melakukan oksidasi metionin yang terikat dalam protein contoh dengan asam performat menjadi metionin-sulfon, sebelum contoh dihidrolisis dengan HCl 6N. Cara ini sudah terbukti efektif bisa mencegah degradasi metionin, sistin dan sistein dalam proses hidrolisis itu. Oleh asam performat, sistin dan sistein dioksidasi menjadi asam sisteat (*cysteic acid*), yang terdegradasi dalam media hidrolisis di atas. Metionin sulfon juga stabil dalam media hidrolisis tersebut.

Karena oksigen dari udara dapat mengoksidasi asam-asam amino, maka ini perlu dihilangkan dari contoh dan larutan HCl 6N yang akan dipakai. Selanjutnya hidrolisis dilakukan di bawah atmosfer gas nitrogen atau di bawah hampa. Cara ini telah dipakai hingga sekarang.

Dalam analisis isoleuin dan valin, agar kedua asam amino itu dapat dibebaskan dengan sempurna dari ikatan peptida dan proteinnya, hidrolisis perlu dilakukan selama mungkin (72 jam atau lebih) (6). Tetapi hal ini akan memberikan efek yang lebih merusak kepada asam-asam amino lain yang kurang stabil.

CARA-CARA PREPARASI CONTOH (HIDROLISIS PROTEIN) UNTUK ANALISIS KOMPOSISI ASAM AMINO DALAM BERBAGAI BAHAN BERPROTEIN.

Mengingat ketabilan asam amino dalam proses preparasi (hidrolisis) contoh bergantung kepada jenis asam amino, kondisi hidrolisis (suhu, lama hidrolisis, keasaman) dan jenis matriks contoh, maka tidak ada satupun cara hidrolisis contoh atau penguraian protein yang dapat dipakai dalam analisis seluruh jenis asam amino secara sekaligus dalam suatu contoh. Jadi analisis seluruh asam amino dalam suatu contoh memerlukan sekaligus beberapa cara penguraian protein yang berlainan.

Cara-cara penguraian protein yang dikenal selain cara enzimatis, dan yang paling banyak dipakai dewasa ini adalah sebagai berikut: (i) Cara hidrolisis dengan larutan HCl 6N pada suhu 100°C selama 24 jam; (ii) Cara hidrolisis dengan larutan HCl 6N pada suhu 145°C selama 4 jam; (iii) Cara hidrolisis dengan larutan HCl 6N sesudah protein dalam contoh dioksidasi dengan asam performat, yaitu khusus untuk analisis metionin, sistin dan sistein; (iv) Cara hidrolisis dengan larutan barium hidroksida atau natrium hidroksida, yaitu khusus untuk analisis triptofan.

Keempat cara di atas akan ditinjau secara terinci di bawah ini. Cara (i) dan (ii) dipergunakan dalam analisis asam-asam amino selain sistin, sistein, metionin dan triptofan.

1. Cara Hidrolisis dengan Larutan HCl 6N pada Suhu 110°C

Proses hidrolisis dengan larutan HCl 6N ternyata telah dipergunakan secara luas dalam analisis semua asam amino kecuali sistin, sistein, metionin dan triptofan dalam berbagai contoh bahan biologis.

Ciri-ciri dari cara hidrolisis dengan larutan HCl 6N ini adalah: (i) Bebas dari pengaruh oksigen dari udara. Sebelum hidrolisis dimulai, oksigen dihilangkan dahulu dari contoh dan dari larutan HCl 6N; kemudian hidrolisis dilakukan di bawah hampa atau atmosfir gas nitrogen. (ii) Larutan HCl 6N harus murni dan bebas unsur besi (Fe). (iii) Menggunakan volum HCl 6N yang berlebihan dibanding dengan banyaknya contoh. (iv) Menggunakan suhu dan waktu hidrolisis yang sedemikian rupa sehingga kerusakan asam-asam amino ditekan seminimal mungkin sedangkan asam-asam amino dapat dibebaskan dengan sempurna (atau mendekati sempurna) dari struktur protein induknya. Hidrolisis dilakukan pada suhu 110°C dan waktu selama 24 jam. (v) Hasil analisisnya dapat diandalkan, artinya dengan teknik analisis yang andal dapat menghasilkan data analisis yang berpresisi tinggi atau mempunyai ke-dapat-ulangan (*reproducibility*) yang baik. (vi) Contoh yang dihidrolisis berupa serbuk halus (< 1 mm) yang bebas dari lemak. (vii) Prosedurnya relatif praktis dan sederhana. Kelemahan cara ini adalah masih adanya sedikit kerusakan dari beberapa jenis asam amino tertentu yaitu asam asparat, asam glutamat, glisin, alanin, leusin, tirosin, fenilalanin dan arginin yang perolehannya masih dapat lebih dari 95%. Untuk treonin dan serin, kerusakannya bisa lebih besar sehingga perolehannya dapat kurang dari 95%. Kelemahan ini dapat dikoreksi dengan cara ekstrapolasi ke titik awal hidrolisis (6,33).

Kelemahan berikutnya adalah bahwa hasil analisis isoleusin dan valin biasanya lebih rendah dari pada yang seharusnya. Hal ini disebabkan karena belum semua asam amino tersebut dibebaskan dari ikatan peptida atau proteinnya. Koreksi dapat dilakukan dengan cara ekstrapolasi hasil analisis ke waktu hidrolisa yang tak terhingga (*infinite hydrolysis time*) (6). Namun ada pula yang menyarankan agar hasil analisis dikoreksi dengan menambahkan faktor koreksi sebesar 6% untuk isoleusin dan valin dalam beberapa jenis contoh bahan pakan (6).

Cara hidrolisis ini telah banyak dipelajari dalam berbagai studi kolaborasi antar laboratorium (6), dalam analisis berbagai jenis bahan pakan. Variasi hasil analisis antar laboratorium untuk kebanyakan asam amino berkisar 5,09-10,56%. Kemudian, untuk mengetahui hasil analisis dari cara mana yang lebih baik di antara cara hidrolisis di bawah hampa atau di bawah atmosfir gas N₂, kedua cara ini

telah digunakan untuk memeriks/menganalisis sejumlah contoh bahan nabati, hewani dan protein murni. Hidrolisis di bawah hampa dilakukan dalam ampul gelas yang ditutup dengan meleahkan ujungnya (*sealed glass ampoule*) yang berukuran 16 x 110 mm, sedangkan hidrolisis di bawah N₂ dilakukan dalam tabung dengan tutup berulir dan berlapis teflon (*teflon lined screw cap tube*) berukuran 25 x 80 mm. Hasil yang diperoleh dengan teknik kromatografi penukar ion adalah: (i) Cara hidrolisis di bawah hampa (110°C, 24 jam) memberikan data perolehan rata-rata dari 15 asam amino yang 1,3% lebih tinggi, untuk 9 jenis contoh yang dipelajari; (ii) Cara hidrolisis di bawah N₂ mempunyai presisi yang lebih baik (deviasi standar relatif = 1,40%) dari pada di bawah hampa (2,17%) untuk 15 asam amino dalam 9 jenis contoh. Meskipun cara hidrolisis di bawah hampa (110°C, 24 jam) dalam ampul gelas telah dianggap sebagai cara acuan dalam analisis asam-asam amino, namun dari hasil studi di atas tampaknya cara hidrolisis di bawah N₂ dalam tabung dengan tutup berulir merupakan alternatif yang justru lebih praktis dan dengan hasil-hasil analisis yang dapat diterima seperti dari cara acuan tersebut.

2. Cara Hidrolisis dengan Larutan HCl 6N pada Suhu 145°C.

Cara hidrolisis dengan larutan HCl 6N pada suhu 145°C selama 4 jam telah dipelajari oleh Gehrke *et al.* (6). Cara yang lebih cepat ini telah dibandingkan dengan cara biasa (110°C, 24 jam) dalam analisis 9 contoh bahan nabati, hewani dan protein murni. Variasi hasil analisis antar 2 (dua) laboratorium juga dipelajarinya. Dari hasil analisis dengan teknik kromatografi penukar ion ditemukan bahwa: (i) Cara hidrolisis di bawah hampa pada suhu 145°C selama 4 jam dalam ampul gelas tertutup memberikan data perolehan rata-rata dari 15 asam amino yang amat mendekati (sedikit di bawah) data dari cara yang sama pada 110°C selama 24 jam. (ii) Untuk 15 asam amino dalam 9 jenis contoh tersebut, hasil analisis rata-rata untuk setiap asam amino yang dilakukan oleh dua laboratorium yang berbeda (tetapi dengan prosedur yang sama) paling tinggi perbedaannya ialah 5,1% (kecuali 10% untuk serin). Perbedaan untuk 15 asam amino, bila dirata-ratakan adalah 3,3%. (iii) Pada 145°C perolehan yang lebih rendah dialami oleh treonin (lebih rendah rata-rata 7%) dan serin (13%) dibandingkan dengan pada 110°C. (iv) Cara pada 145°C lebih cepat untuk analisis isoleusin dan valin karena perolehan untuk dua asam amino itu 8-9% lebih tinggi dari perolehan pada 110°C, dan ini masih dapat ditingkatkan 3-13% lagi dengan perpanjangan waktu hidrolisis menjadi 16 jam. Dari hasil studi di atas dapat disimpulkan bahwa dari segi-segi presisi hasil analisis, variasi antar laboratorium dan perolehan asam-asam amino, umumnya hasil-hasil cara hidrolisis pada 145°C cukup mendekati cara hidrolisis pada 110°C. Apabila diperlukan analisis yang cepat dari banyak contoh, cara hidrolisis pada 145°C dapat dipertimbangkan untuk dipakai.

3. Cara Hidrolisis dengan Larutan HCl 6N Setelah Oksidasi dengan Asam Performat.

Dengan rusaknya metionin, sistin dan sistein dalam suasana HCl 6N, diperlukan perbaikan cara hidrolisis. Telah diketemukan bahwa apabila protein dioksidasi dengan asam performat, asam amino yang mengandung belerang (S) akan teroksidasi. Metionin dioksidasi menjadi metionin-sulfon, sistin dan sistein menjadi asam sisteat. Hasil-hasil oksidasi tersebut ternyata stabil dalam suasana hidrolisis dengan HCl 6N. Karena itu apabila contoh (protein) yang telah dioksidasi ini dihidrolisis dengan larutan HCl 6N, akan terbentuk metionin sulfon dan asam sisteat. Jadi metionin dan sistin (serta sistein) dalam contoh semula akan dianalisis sebagai kedua senyawa hasil oksidasi tersebut (11,22). Cara preparasi contoh di atas telah pula dipelajari oleh Spindler *et al.* (29), yang membuktikan bahwa apabila tahap oksidasi oleh asam performat diadakan, maka akan diperoleh data analisis yang lebih rendah, artinya telah terjadi kehilangan asam amino (metionin dan sistin). Besarnya kehilangan itu dapat dilihat dalam Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Kehilangan metionin dan sistin dalam analisis yang dilakukan tanpa melalui oksidasi contoh dengan asam performat.

No.	Nama Contoh	Kadar (%) Protein	Kehilangan metionin Rata-rata	Kehilangan sistin Rata-rata (*)
1.	Jagung	8,8	15 % (40)	64,1 % (14)
2.	Gandum	12,2	22 % (12)	39,6 % (12)
3.	Bungkil kedelai	47,9	13,4 % (26)	46,6 % (10)
4.	Tepung tulang dan daging	49,5	2 % (18)	55,6 % (18)
5.	Tepung bulu unggas	82,1	12 % (22)	20,3 % (22)

(*) Angka dalam kurung menyatakan jumlah contoh yang dianalisis; yang dimaksud dengan kehilangan ini adalah perbedaan dengan hasil analisis yang didapat apabila contoh dioksidasi dengan asam performat sebelum hidrolisis dengan HCl 6N.

Data-data di atas membuktikan perlunya dilakukan oksidasi dengan asam performat. Oksidasi dapat kurang sempurna apabila contoh mengandung banyak klorida, karena klorida bereaksi dengan asam performat membentuk klor (lihat data tepung tulang dan daging). Lantionin dapat mengganggu dalam analisis ini karena juga dioksidasi oleh asam performat menjadi asam sisteat; jadi lantionin harus dianalisis dulu secara terpisah, untuk kemudian dilakukan suatu koreksi terhadap hasil analisis. Adapun kondisi proses oksidasi dengan asam performat adalah seperti berikut: (i) Banyaknya asam performat yang digunakan harus menjamin kesempurnaan reaksi oksidasi asam amino yang bersangkutan. Di sini 5 mL asam performat cukup untuk mengoksidasi contoh yang mengandung 10 mg-N (29). (ii) Asam performat yang berlebihan harus dihilangkan sebelum hidrolisis dengan HCl 6N, karena akan mengganggu dalam analisis. HBr dapat dipakai tetapi akan terjadi brom yang reaktif dan menyebabkan brominasi tirosin dan histidin. Natrium pirosulfit juga dapat dipakai

tetapi larutan hidrolisat yang didapat tidak boleh dipekatkan dengan cara evaporasi, melainkan dinetralkan untuk mencegah terbentuknya senyawa oksisulfat dari serin dan treonin.

Mengenai ketepatan dan presisi hasil analisis dengan cara di atas dapat diberikan informasi sebagai berikut: (i) Ketepatan hasil analisis telah diuji (29), dengan melakukan analisis dua asam amino tersebut dalam contoh jagung, bungkil kedelai, gandum, tepung ikan, campuran jagung – bungkil kedelai (50 + 50), dan campuran gandum – tepung ikan (50 + 50). Ternyata bahwa hasil analisis contoh campuran hanya berbeda sedikit (1,4 – 2,2 %) dengan hasil perhitungan kadar berdasarkan hasil analisis contoh individual. (ii) Fihak Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) telah menyelenggarakan suatu studi kolaborasi untuk analisis metionin dan sistein dalam 6 contoh bahan makanan dan pakan serta satu protein murni (β -laktoglobulin) yang diikuti oleh 7 laboratorium. Analisis asam amino dilakukan dengan teknik kromatografi penukar ion. Data presisi yang dicari (dinyatakan dalam angka koefisien variasi) meliputi kedapat-ulangan hasil analisis dalam masing-masing laboratorium (*within laboratory repeatability*), dan variasi hasil analisis antar laboratorium (*between laboratory reproducibility*).

Tabel 2 mencantumkan data presisi hasil analisis metionin dan sistein dalam 7 jenis contoh yang dipelajari itu (17).

Tabel 2. Presisi hasil analisis metionin dan sistein dalam contoh makanan dan pakan, menggunakan cara oksidasi dengan asam performat sebelum hidrolisis.

No.	Asam amino	Kedapat-ulangan dalam laboratorium (*)		Kedapat-ulangan antar laboratorium (*)		Jenis contoh
		Rata-rata %	Kisaran %	Rata-rata %	Kisaran %	
1. Dalam 6 jenis contoh makanan dan pakan						
a.	Sistein	3,84	1,76-7,51	8,76	7,13-10,8	Isolat protein kedelai, bungkil
b.	Metionin	3,86	0,79-9,74	8,00	1,18-12,8	jagung, tepung gandum, bungkil
2. Dalam contoh β -laktoglobulin						
a.	Sistein	2,54		2,72		tepung susu
b.	Metionin	1,94		2,30		bebaskan lemak, tepung kulit gandum

(*) Dinyatakan dalam angka koefisien variasi.

Dari segi ketepatan hasil analisis, data perolehan rata-rata metionin dan sistein dalam β -laktoglobulin masing-masing adalah 101% (berkisar dari 98 sampai 106%) dan 95% (91-101%). Untuk metoda yang sama, studi kolaborasi ini diadakan lagi kemudian (2) dengan 4 contoh bahan pangan, isolat protein kedelai satu bahan pakan dan β -laktoglobulin, dimana terlibat 9 laboratorium. Koefisien variasi hasil analisis antar laboratorium untuk metionin dan sistein masing-masing berkisar 5,5-11,8% dan 8,59-17,3%, untuk 6 contoh di atas.

Berdasarkan hasil-hasil studi tersebut di atas, akhirnya metoda tersebut telah diadopsi oleh A.O.A.C. sebagai metoda nomor 985.28, *sulfur amino acids in food and feed ingredients* (1).

4. Cara Hidrolisis Contoh dengan Basa untuk Penentuan Triptofan

Seperti asam-asam amino yang lain, triptofan dapat dianalisis setelah protein yang bersangkutan diuraikan dengan hidrolisis terlebih dahulu. Cara hidrolisis dengan asam tidak dapat dipakai dan yang biasa dipergunakan adalah cara hidrolisis menggunakan: (i) Basa, dengan larutan NaOH (8,1), atau dengan larutan Ba(OH)₂ (19,4,31). (ii) Enzim, yaitu dengan papain, pronase (28,31). Masing-masing cara hidrolisis mempunyai kelebihan dan kekurangan, yang akan dibahas di bawah ini.

Zat-zat pengganggu dalam hidrolisis contoh dengan basa

Dalam media hidrolisis, beberapa zat dapat bereaksi dengan triptofan dan merusaknya, misalnya karbohidrat, asam amino lain, logam berat, oksigen, zat pengoksidasi lain, termasuk pula sinar (30). (i) *Karbohidrat*. Banyak karbohidrat mengganggu karena terbentuknya humin yang dapat mengadsorpsi triptofan. (ii) *Asam-asam amino lain*. Dalam suasana basa, triptofan bereaksi dengan serin, sistin, lantionin, treonin sehingga menjadi rusak. Untuk mencegah reaksi tersebut telah disarankan penggunaan histidin dan timbal asetat basa dalam media hidrolisis. (iii) *Ion logam berat, zat pengoksidasi dan sinar*. Oksigen (dari udara) mengoksidasi triptofan dalam suasana basa dan terutama dalam suasana asam. Oksidasi tersebut dipercepat bila terdapat ion logam berat dan sinar. Zat pengoksidasi lain mempunyai peranan yang sama dengan oksigen. Adapun besarnya kerusakan triptofan bergantung kepada jenis contoh dan kadar karbohidratnya.

Perbandingan cara hidrolisis yang menggunakan basa dengan yang menggunakan enzim

Suatu studi telah dilakukan untuk membandingkan cara hidrolisis dengan larutan NaOH, Ba(OH)₂ dan enzim papain untuk menganalisis kadar triptofan dalam berbagai bahan nabati dan dalam kasein (30,31). Ternyata hasil yang diperoleh dengan larutan Ba(OH)₂ umumnya lebih tinggi, kecuali untuk contoh yang tinggi kadar karbohidratnya seperti beras dan jagung.

Dalam perkembangan terakhir, telah pula dilakukan studi perbandingan antara 3 metoda penentuan triptofan dalam contoh bahan tanaman dan protein murni. Dalam metoda yang pertama, hidrolisis dilakukan dengan larutan Ba(OH)₂ dan triptofan dianalisis dengan teknik gel-filtrasi diikuti pengukuran kolorimetris dengan ninhidrin. Dalam metoda yang ke dua, hidrolisis dilakukan dengan larutan NaOH dan analisis dilakukan dengan teknik kromatografi penukar ion dengan pengukuran kolorimetris dengan ninhidrin. Metoda ketiga menggunakan enzim pronase untuk hidrolisis, sedangkan pengukurannya menggunakan teknik kolorimetri p-dimetil-amino-sinamaldehida. Hasil yang diperoleh menyatakan bahwa (4): (i) Untuk contoh protein murni (lisozim, ovalbumin, BSA), hasil analisis

yang tertinggi didapatkan melalui hidrolisis dengan larutan Ba(OH)₂, dengan harga perolehan rata-rata untuk triptofan sebesar 99%. Harga perolehan pada hidrolisis dengan pronase dan larutan NaOH masing-masing ialah 98,1% dan 94,3%. (ii) Untuk contoh bahan tanaman (*oat, millet, horsebean*, biji lobak, tepung gandum, bungkil kedelai dan daun tembakau): apabila perolehan triptofan melalui cara hidrolisis dengan larutan Ba(OH)₂ dianggap 100%, perolehan yang didapatkan melalui hidrolisis dengan larutan NaOH dan dengan pronase masing-masing ialah 95,8% dan 79,7% (perolehan rata-rata dari analisis contoh-contoh di atas). Harga perolehan yang rendah ini lebih banyak disebabkan oleh rendahnya hasil analisis triptofan dalam biji lobak, *horsebean* dan daun tembakau.

Dari hasil di atas disimpulkan bahwa cara hidrolisis dengan larutan Ba(OH)₂ memberikan hasil yang paling kuantitatif, baik untuk contoh protein murni maupun bahan tanaman. Disinyalir bahwa kondisi media hidrolisis yang bebas oksigen merupakan kunci utama untuk mencapai hasil tersebut. Di sini penghilangan oksigen dari media hidrolisis dilakukan dengan cara mengusir udara yang berada dalam otoklaf (yang digunakan untuk pemanasan campuran hidrolisis), oksigen yang berada dalam larutan hidrolisat dan oksigen yang terlarut atau teradsorpsi dalam contoh yang dianalisis. Pengusiran ini dilakukan dengan cara menaikkan suhu otoklaf hingga 100°C, membuka pintunya (tutupnya) selama 5 menit agar uap air yang terjadi karena mendidihnya larutan campuran hidrolisis dan air dari otoklaf mengalir ke luar bersama dengan udara dan oksigen yang ada, setelah itu otoklaf ditutup kembali dan suhunya dinaikkan menjadi 125°C untuk menghidrolisis contoh. Kondisi hidrolisis yang bebas oksigen ini rupanya tak tercapai pada hidrolisis yang menggunakan larutan NaOH. Mungkin keluarnya oksigen terhambat oleh viskositas larutan yang tinggi dan pengembangan (*swelling*) dari contoh yang bereaksi dengan NaOH. Residu oksigen yang tertinggal akan dapat merusak triptofan.

Meskipun penggunaan larutan Ba(OH)₂ membaik prospeknya, namun penggunaan larutan NaOH juga semakin dimantapkan. Telah dibuat suatu studi kolaborasi yang melibatkan 9 laboratorium untuk menganalisis metionin, sistein dan triptofan dalam 4 contoh bahan pangan, isolat protein kedelai, satu bahan pakan dan β -laktoglobulin. Metoda analisis triptofan menggunakan larutan NaOH 4,2N untuk hidrolisis contoh dan analisis asam amino dengan teknik kromatografi penukar ion atau dengan kromatografi cairan fasa terbalik (*reversed phase liquid chromatography*). Data presisi hasil analisis triptofan yang didapatkan ialah bahwa koefisien variasi data antar laboratorium berkisar 3,87%–16,1% untuk 6 jenis contoh di atas. Data perolehan rata-rata triptofan untuk β -laktoglobulin ialah 85% (berkisar 59–102%). Dari hasil studi tersebut maka kini A.O.A.C. telah mengadopsi metoda analisis triptofan itu menjadi metoda nomor 988.15, *tryptophan in foods* (1). Dalam metoda A.O.A.C. 988.15 larutan NaOH di-deaerasi dengan tiupan gas N₂ selama 10 menit sebelum dibubuhkan

kepada contoh yang akan dihidrolisis. Lalu campuran dibekukan dan oksigen (udara) dihilangkan dengan dihamparkan (0,01 mm Hg). Selanjutnya hidrolisis dilakukan di bawah hampa, pada suhu 110°C selama 20 jam.

KESIMPULAN

Analisis komposisi asam amino dari bahan-bahan biologis meliputi beberapa tahap, mulai dari pengambilan contoh, preparasi contoh untuk analisis sampai dengan pengukuran masing-masing asam amino dan pengolahan data analisis. Setiap tahap dapat menyebabkan terjadinya kesalahan dan variabilitas hasil analisis tersebut. Tahap preparasi contoh di sini berintikan proses hidrolisis, yang dapat memberikan kontribusi yang cukup besar kepada kesalahan dan variabilitas hasil analisis karena sebagian besar asam amino bersifat kurang stabil atau mudah terdegradasi dalam kondisi hidrolisis. Oleh sebab itu diperlukan suatu usaha yang cukup besar agar kesalahan dan variasi yang berasal dari tahap ini dapat ditekan hingga seminimal mungkin.

Sifat ketidak-stabilan atau mudah terdegradasinya asam amino dalam suatu proses hidrolisis bergantung kepada jenis asam amino. Oleh karena itu untuk menganalisis seluruh asam amino dalam suatu contoh diperlukan beberapa cara hidrolisis sekaligus; yang meliputi:

- Hidrolisis dengan larutan HCl 6N pada suhu 110°C selama 24 jam di bawah hampa (vakum). (i) Hidrolisis di bawah atmosfir gas N₂ dapat dijadikan pilihan lain yang lebih praktis; (ii) Hidrolisis pada suhu 145°C selama 4 jam di bawah hampa juga dapat dijadikan pilihan lain yang lebih cepat dan sesuai untuk analisis rutin banyak contoh. Cara ini berlaku untuk asam-asam aspartat, glutamat, asam amino glisin, alanin, leusin, tirosin, fenilalanin, lisin, histidin, arginin, dengan perolehan lebih dari 95%; serta serin, treonin, isoleusin dan valin dengan perolehan kurang dari 95% melalui analisis dengan teknik kromatografi penukar ion atau dengan kromatografi cairan fasa terbalik. Koreksi yang diperlukan agar didapatkan hasil analisis dengan ketepatan yang lebih tinggi ialah: (i) Ekstrapolasi data analisis ke titik awal hidrolisis, terutama untuk penentuan serin dan treonin; (ii) Ekstrapolasi data analisis ke waktu hidrolisis tak terhingga untuk penentuan isoleusin dan valin.
- Hidrolisis dengan larutan HCl 6N di bawah atmosfir gas nitrogen sesudah contoh dioksidasi dahulu dengan asam performat. Cara ini berlaku khusus untuk metionin, sistin (dan sistein).
- Hidrolisis dengan larutan basa, NaOH atau Ba(OH)₂, yang khusus berlaku untuk triptofan.

Sebelum proses hidrolisis tersebut di atas, contoh digerus halus dan diekstraksi dengan pelarut organik untuk menghilangkan sebagian besar kandungan lemaknya.

Untuk cara-cara atau metoda hidrolisis di atas, kecuali untuk hidrolisis dengan HCl 6N suhu 145°C dan hidrolisis dengan larutan Ba(OH)₂, keandalan (*reliability*) yang meliputi kedapat-ulangan data dalam laboratorium, variasi data antar laboratorium, dan ketepatan data analisis (biasanya diuji dengan contoh β -laktoglobulin) telah diuji melalui studi-studi kolaborasi antar laboratorium. Metoda yang diandalkan untuk analisis asam-asam amino bebas adalah kromatografi penukar ion dan kromatografi cairan fasa terbalik.

PUSTAKA

- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 15th Ed., A.O.A.C., Arlington, Vol. II, 1990:
 - Method 988.15, Tryptophan in Foods and Food and Feed Ingredients, p. 1101.
 - Method 985.28, Sulfur Amino Acids in Food and Feed Ingredients, p.1102.
- M.C. Allred, J.L. MacDonald, Determination of sulfur amino acids and tryptophan in foods and food and feed ingredients: collaborative study, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 71: 603-606 (1988).
- R. Anderson, D. Annette, N. Jackson, Ion exchange chromatographic study of amino acid degradation during hydrolysis of avian protein, *J. Chromatogr.* 135: 447-454 (1977).
- S. Delhaye, J. Landry, Determination of tryptophan in pure proteins and plant material by three methods. *Analyst*, 117: 1875-1877 (1992).
- J.P. Dustin, C. Czajkowska, S. Moore, E.J. Bigwood. A study of the chromatographic determination of amino acids in the presence of large amounts of carbohydrate, *Anal. Chim. Acta* 9: 256-262 (1953).
- C.W. Gehrke, L.L. Wall, J.S. Absheer, F.E. Kaiser, R.W. Zumwalt, Sample preparation for chromatography of amino acids: acids hydrolysis of proteins, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 68: 811-821 (1985).
- W.G. Gordon, J.J. Basch, Hydrolysis of proteins for amino acid analysis: acid hydrolysis in sealed tubes of mixtures of β -lactoglobulin and starch, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 47: 745-747 (1964).
- T.E. Hugli, S. Moore, Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolyzates, *J. Biol. Chem.* 247: 2828-2834 (1972).
- M. Halwer, G.C. Nutting, Cysteine losses resulting from acid hydrolysis of proteins, *J. Biol. Chem.* 166: 521-530 (1946); *Chem. Abstr.* 41, 1724 b (1947).
- E.J. Harfenist, The amino acid composition of insulins isolated from beef, pork and sheep glands, *J. Amer. Chem. Soc.* 75: 5528-5533 (1953).
- D.M. Jennings, O.A.M. Lewis, Methionine loss during protein hydrolysis of plant material, *J. Agric. Food Chem.* 17:668-669 (1969).

12. A. Light, E.L. Smith, Chymotryptic digest of papain. IV. Peptides from the oxidized, carboxymethylated and denatured protein, *J. Biol. Chem.* 237: 2537-2546 (1962).
13. S.H. Lipton, C.E. Bodwell, Oxidation of amino acids by dimethyl sulfoxide, *J. Agric. Food Chem.* 21: 235-237 (1973).
14. T.Y. Liu, Y.H. Chang, Hydrolysis of protein with p-toluenesulfonic acid, *J. Biol. Chem.* 246: 2842-2848 (1971).
15. J.W.H. Lugg, Some sources of error in the estimation of cysteine and cystine in complex materials when acid hydrolysis is employed, *Biochem. J.* 27: 1022-1029 (1933).
16. J.W.H. Lugg, Investigations of sources of error in the estimation of tyrosine and tryptophan in complex materials which associated with hydrolysis. *Biochem. J.* 32: 775-778 (1938).
17. J.L. MacDonald, M.W. Krueger, J.H. Keller, Oxidation and hydrolysis determination of sulfur amino acids in food and feed ingredients: collaborative study, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 68: 826-829 (1985).
18. H. Matsubara, R.M. Sasaki, High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of protein, *Biochem. Biophys. Res. Coomun.* 35: 175-181 (1969); *Chem. Abstr.* 71: 9622c (1969).
19. E.L. Miller, Determination of the tryptophan content of feeds with particular reference to cereals. *J. Sci. Food Agric.* 18: 381-387 (1967).
20. W.J. Ray, D.E. Koshland, Identification of amino acids involved in phosphoglucomutase action, *J. Biol. Chem.* 237: 2493-2505 (1962).
21. M.W. Rees, Estimation of threonine and serine in proteins, *Biochem. J.* 40: 632-640 (1946); *Chem. Abstr.* 41: 2767f (1947).
22. G. Sarwar, D.A. Christensen, A.J. Finlayson, M. Friedman, Inter – and intralaboratory variation in amino acid analysis of food proteins, *J. Food Science* 48: 526-531 (1983).
23. M. Schubert, Combination of cysteine with sugars, *J. Biol. Chem.* 130: 601-603 (1939).
24. E.L. Smith, A. Stockell, Amino acid composition of crystalline carboxypeptidase, *J. Biol. Chem.* 207: 501-514 (1954).
25. E.L. Smith, A. Stockell, J.R. Kimmel, Crystalline papain-amino acid composition, *J. Biol. Chem.* 207: 551-561 (1954).
26. E.E. Snell, dalam "Advances in protein chemistry", Vol. II (Eds.: M.L. Anson, J.T. Edsall), Academic Press, New York, 1953, p. 107.
27. J.R. Spies, D.C. Chambers, Chemical determination of tryptophan in proteins, *Anal. Chem.* 21: 1249-1266 (1949).
28. J.R. Spies, Determination of tryptophan in corn (Zea mays), *J. Agric. Food Chem.* 16: 514-516 (1968).
29. M. Spindler, R. Stadler, H. Tanner, Amino acid analysis of feedstuffs: determination of methionine and cystine after oxidation with performic acid and hydrolysis, *J. Agric. Food Chem.* 32: 1366-1371 (1984).
30. Sri Sumartini dan Sumardi, Determination of tryptophan in protein materials: a study of protein hydrolysis procedures, Proceedings of the ASEAN Workshop on Analytical Techniques, Singapore, 12-14 February 1981, pp. 79-93.
31. G. Sternkopf, Comparative studies on the determination of tryptophan in some legumes, *Nahrung* 12: 75-80 (1968); *Chem. Abstr.* 68: 103981d (1968).
32. G. R. Tristram, dalam "Techniques in Amino Acid Analysis" (D.I. Schmidt – Ed.), Technicon Instruments Co., Chertsey, Surrey, 1966, p. 61.
33. Sumardi, Sri Sumartini dan A. Hanafi, Analisa komposisi asam amino bahan pangan nabati lewat hidrolis dengan HCl 6N dan dengan Amino Acid Analyzer: penerapan cara ekstrapolasi ke titik awal hidrolisa, Proceedings Seminar Nasional Metoda Analisa Kimia, Lembaga Kimia Nasional LIPI – Himpunan Kimia Indonesia, Bandung, 19-21 Mei 1981, halaman 391-407.
34. S.W. Benson, The Foundations of Chemical Kinetics, McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, 1960, p.14.

Jadwal Training dan Seminar

BALAI JASA IPTEK
Puslitbang Kimia Terapan-LIPI
Jalan Cisitu, Bandung 40135 – Telp. 022-2507772, 2507769 ext. 225

No.	Topik	Tanggal	Biaya/orang*
1.	Teknik Analisa Cemaran Kimia dalam Air Limbah Industri	6 s/d 14 Juni 1995	Rp. 900.000,-
2.	Building and Industrial Fire Safety, Jointly Organized by LIPI and CSIRO (Australia)	11 s/d 12 Juli 1995	Rp. 500.000,-
3.	Teknik Analisa Kimia Instrumental dan Aplikasinya	22 s/d 31 Agustus 1995	Rp. 950.000,-
4.	International Training on Capillary Column Gas Chromatography	11 s/d 16 Oktober 1995	Rp. 1.500.000,-
5.	Simposium Nasional Kromatografi	17 s/d 19 Oktober 1995	Rp. 450.000,-
6.	Teknik Pengolahan Limbah Cair Industri secara Fisika, Kimia & Biologi	5 s/d 13 Desember 1995	Rp. 950.000,-

*) Catatan:

Biaya meliputi materi training/seminar, dan praktikum. *Tidak termasuk* transportasi dan akomodasi.