

Agritech Vol 1 No. 3 1980
Desember 1980 or-Desember 1980
Halaman : 15 - 24

PRINSIP DAN PENGGUNAAN AMINO ACID ANALYZER

Oleh : Slamet Sudarmadji *)

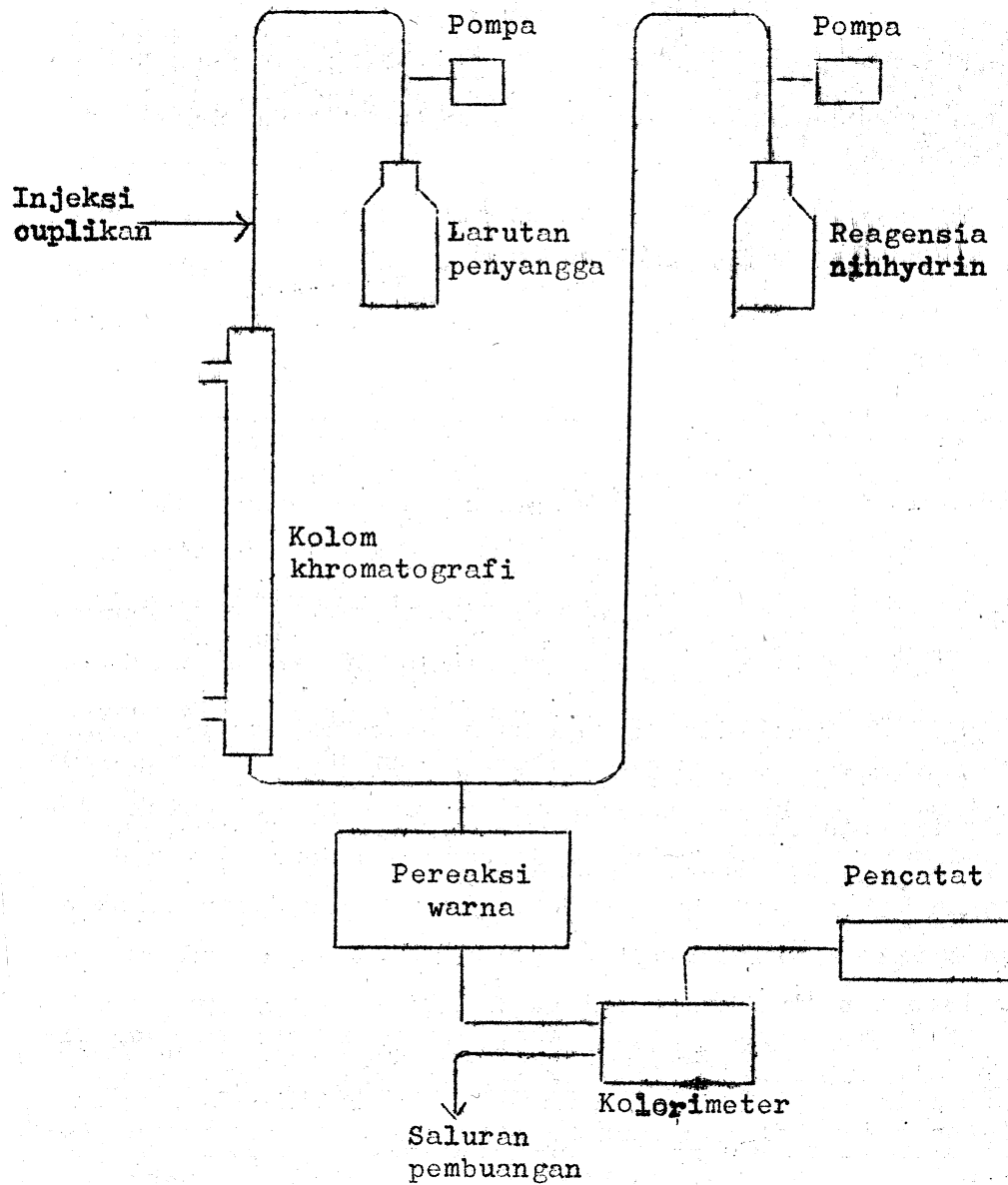
Pendahuluan

Pada prinsipnya alat amino acid analyzer adalah hasil penggabungan dua teknik analisa bahan kimia yaitu khromatografi kolom untuk memisahkan komponen-komponen asam amino yang tercampur dalam suatu bahan cuplikan (sample) dan spektrofotometri untuk pengukuran konsentrasi masing-masing komponen yang telah dipisahkan. Untuk dapat diukur kadarnya, asam-asam amino direaksikan dengan ninhydrin sehingga menghasilkan warna ungu tua yang khas yang dapat terukur pada serapan spektrum sinar tampak.

Untuk bahan asam amino yang telah bebas, dapat segera langsung dilewatkan pada kolom khromatografi setelah dijernihkan dari bahan lain dan diatur pH-nya dengan larutan penyangga. Untuk bahan protein, maka cuplikan harus dihidrolisa terlebih dahulu sehingga asam-asam amino komponen-nya akan terlepas untuk selanjutnya dipisahkan melalui kolom khromatografi dan kemudian ditentukan kadarnya masing-masing melalui spektrofotometer.

*) Dosen pada Fakultas Teknologi Pertanian UGM

Secara skematis, alat amino acid analyzer terdiri dari unsur-unsur peralatan seperti yang tertera pada gambar 1.



Gambar 1. Unsur-unsur peralatan Amino Acid Analyzer.

Teknik pelaksanaan

Cuplikan yang telah dipersiapkan diinjeksikan ke dalam alat amino

acid analyzer di atas kolom pemisahan khromatografi. Dengan dorongan tekanan larutan penyangga lewat pompa, maka bahan cuplikan cair terbawa melalui kolom pemisah yang berisi butiran-butiran resin penukar ion atau ion exchange resin. Campuran asam-asam amino akan terpisah berdasarkan muatan ionnya setelah melewati kolom ini. Cairan cuplikan dan penyangga yang keluar akan mengandung asam-asam amino secara berurutan yang kemudian direaksikan dengan reagen ninhydrin pada suhu 100°C sehingga terbentuk warna ungu yang khas dan dapat diukur dengan sebuah kolorimeter. Suatu alat pencatat (recorder) akan mencatat secara elektronis hasil pengukuran kolorimeter ini pada secarik kertas pencatat, sehingga dapat dipelajari lebih lanjut.

Larutan penyangga (buffers)

Larutan penyangga diperlukan agar asam-asam amino berada dalam keadaan stabil dan dapat dipisahkan oleh kolom pemisah dengan baik. Kekuatan ion dan pH larutan penyangga harus ditentukan dengan tepat melalui pH-meter yang peka.

Karena amino acid analyzer dirancang untuk menentukan adanya asam-asam amino dalam jumlah yang kecil, alat ini sangat peka. Kontaminasi larutan penyangga oleh senyawa-senyawa yang dapat mengganggu akan sangat mempengaruhi akurasi pengukurannya.

Amonia yang terdapat dalam larutan penyangga akan terakumulasi dalam resin pemisah dan akan terdorong oleh larutan penyangga berikutnya dan membentuk puncak-puncak yang mengganggu pembacaan hasil analisa. Sumber kontaminasi amonia adalah air destilat (aquadest) yang kurang baik. Untuk mengurangi masalah ini, maka aquadest perlu dilewatkan melalui alat de-ionisasi dan segera dipakai. Untuk menghindari penyerapan amonia dari udara, botol penyimpan larutan penyangga perlu dilengkapi dengan bahan penangkap amonia pada tutupnya misalnya asam sitrat kristal.

Untuk kelancaran pemisahan asam-asam amino dalam kolom, diperlukan larutan penyangga dengan pH yang semakin naik, misalnya dari 3,49 kemudian 4,12 dan 6,40, yang tergantung dari jenis asam amino ba

han cuplikan dan juga jenis resin pada kolomnya.

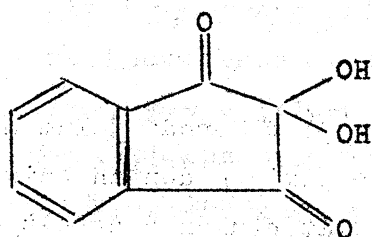
Di samping itu, diperlukan juga "Regenerating Reagent" untuk membersihkan kolom, sehingga terjaga aktivitasnya untuk penggunaan berikutnya.

Reagensia ninhydrin

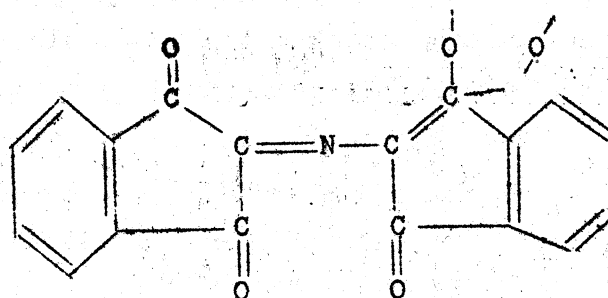
Reagensia ninhydrin merupakan larutan yang mengandung ninhydrin dan timah khlorida (stannous chloride) dalam bahan pelarut methyl-cellosolve 75 % dan 25 % larutan penyangga natrium asetat 4N. Pelarut methyl-cellosolve sangat berbahaya bagi kesehatan, oleh sebab itu harus dikerjakan dalam almari asam apabila mempersiapkan reagensia ninhydrin ini.

Peroksida sangat merusak aktivitas ninhydrin, oleh sebab itu bahan pelarut harus bebas dari peroksida. Dengan mencampurkan methyl-cellosolve 3 ml dengan larutan KI 4 % sebanyak 3 ml dapat ditentukan ada tidaknya peroksida dalam pelarut ini. Apabila tak berwarna maka peroksida negatif. Apabila warna kuning timbul dengan segera berarti ada peroksida dalam pelarut, dengan demikian tidak cocok untuk dipakai sebagai pelarut ninhydrin ini.

Ninhydrin dengan asam-asam amino akan membentuk warna ungu kebiruan yang intensif apabila dipanaskan. Gugus amino dari asam amino akan membentuk pengikatan dua molekul ninhydrin yang berwarna.



Ninhydrin bebas



Pigmen ungu biru

Karena prolin tidak mempunyai gugus amino bebas, maka asam amino ini tidak membentuk pigmen biru tetapi warna kuning.

Bahan berwarna yang ditimbulkan oleh ninhydrin karena adanya gugus amino dari asam amino kemudian dapat ditentukan kadarnya oleh alat kolorimeter sederhana yang dapat membaca serapan pada panjang gelombang 490 nm, untuk warna kuning yang ditimbulkan oleh prolein dan hidroksiprolin, sedangkan panjang gelombang 570 nm untuk mengukur serapan warna ungu kebiruan yang ditimbulkan oleh asam-asam amino yang lain. Sedangkan panjang gelombang 690 nm dipakai untuk menentukan garis dasar (base line). Dua buah pena masing-masing dengan tinta merah dan biru akan menunjukkan puncak-puncak serapan sinar pada panjang gelombang 490 nm dan 570 nm. Dengan menelusuri (scanning) setiap cairan yang lewat pada kolorimeter maka gambaran asam amino keseluruhan dari suatu bahan cuplikan dapat dihasilkan.

Penyiapan cuplikan

Kontaminasi amonia dalam mempersiapkan cuplikan merupakan masalah yang cukup besar. Asam amino bebas yang berasal dari ujung jari juga sering menjadi sumber kontaminasi. Oleh sebab itu penanganan cuplikan harus dikerjakan dengan cermat dan hati-hati. Untuk suatu analisa dengan kepekaan satu nanomolar seperti pada amino acid analyzer ini, kontaminasi yang sedikit pun akan cukup mengganggu hasil pengamatan.

Hidrolisa dengan asam kuat merupakan salah satu cara paling umum dipakai untuk melepaskan asam-asam amino yang terikat dalam molekul protein atau peptida. Untuk penelitian tertentu ada kalanya hidrolisa dengan asam tak dapat dipakai karena dapat menyebabkan kerusakan beberapa asam amino misalnya tryptophan. Untuk keperluan ini hidrolisa dapat dilakukan secara alkalis atau secara ensimatis.

Hidrolisa protein dengan asam

Bahan cuplikan yang mengandung protein sedapat mungkin harus dibebaskan dahulu dari karbohidrat dan lemak. Bahan cuplikan dicernakan dalam asam HCl pekat yang mengandung merkaptostanol. Kalau

bahan berupa cairan, keringkan dulu dengan menghembuskan gas nitrogen untuk menghindari oksidasi.

Hidrolisa ini perlu dilakukan dalam ruang hampa untuk menghindari terbentuknya senyawa-senyawa karena adanya udara. Oleh karena itu hidrolisa perlu dilakukan dalam tabung hidrolisa gelas yang dapat dihampakan dan ditutup dengan api pemanas. Kemudian dilakukan hidrolisa pada suhu 110°C selama 22 jam. Setelah itu cuplikan didinginkan dan tabungnya dibuka dalam almari gas (fume hood) karena dekomposisi merhapto-etanol dapat berbahaya.

Kalau endapan humin pada hidrolisat perlu dipisahkan dengan penyaringan. Kemudian bahan cuplikan cairan diencerkan dengan larutan penyangga dan dipindahkan lewat alat penyuntik (syringe) ke dalam wadah yang lebih sesuai dan ditutup dengan parafilm. Kemudian cairan perlu dikeringkan dalam eksikator yang dipanaskan 60°C dengan bantuan pompa hampa selama 15 menit atau sampai hidrolisat kering. Larutkan bahan cuplikan kering dalam larutan penyangga natrium-sitrat 0,2 N pada pH 2,2. Penyangga ini dapat diisi dengan asam amino standar sebagai standar bawaan (internal standard).

Hidrolisa alkalis dan enzimatis

Untuk menghindari kerusakan tryptophan maka NaOH dapat dipakai untuk mengganti HCl. Dapat juga $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau KOH. Apabila kerusakan glutamine, asparagine, tryptophan, threonine, serine dan asam amino lain yang tak stabil, masih terjadi maka hidrolisa secara enzimatis perlu dilakukan.

Cairan fisiologis

Asam amino bebas dalam urine, plasma dan serum dapat ditentukan langsung tanpa hidrolisa. Garam-garam amonia yang terdapat dalam urine cukup tinggi untuk menjadi penghambat pemakaiannya lewat kolom pemisah. Oleh sebab itu amonia perlu dikurangi kalau tidak dihilangkan sama sekali.

Untuk mewakili urine yang diekresikan dalam sehari, maka urine

perlu dikumpulkan selama 24 jam. Dalam botol pengumpul perlu ditambahkan 1 ml toluene. Untuk mencegah terjadinya perubahan, botol tersebut ditutup dan disimpan dalam ruang yang dingin. Apabila urine akan disimpan beberapa hari, maka harus dipindahkan dalam botol plastik dan disimpan dalam freezer.

Untuk menghilangkan kandungan amonia dalam urine, prosedur berikut ini dapat dipakai. Tambahkan beberapa tetes NaOH 2N atau 4 N pada 5 ml urinesampai pH 11,5 - 12,0. Letakkan bahan dalam eksikator yang dilengkapi dengan H_2SO_4 pekat pada cawan terbuka dan dipompa hampakan selama 6 jam. Kemudian bahan urine diambil dan diatur pH-nya menjadi 2,0 - 2,2 dengan menambahkan larutan HCl 6 N. Pindahkan urine ke dalam gelas volume 5 ml dan encerkan sampai tanda dengan larutan penyangga pH 2,2. Ambil 100 μ l bahan cuplikan untuk dianalisa.

Untuk penentuan asam amino bebas dalam serum dan plasma, maka protein dan peptida yang terkandung di dalamnya harus dihilangkan terlebih dahulu sebelum ditrapkan pada resin penukar ion. Apabila terdapat protein utuh yang terbawa akan melemahkan penukar ion. Untuk mengaktifkan penukar ion kembali, perlu dikeluarkan dari kolomnya dan dibersihkan. Penghilangan protein dapat dilakukan dengan menambahkan asam pikrat, asam sulfosalisilat, dengan sentrifugasi ultra atau filtrasi ultra. Contoh penggunaan : tambahkan pada 1 ml plasma darah 50 mg asam sulfosalisilat (SSA). Aduk dan pusingkan 3500 rpm selama 5 menit. Ambil cairannya dan encerkan dengan larutan penyangga 1 : 1.

Untuk persiapan bahan jaringan, tambahkan 10 ml SSA 3,5 % pada 1 gram jaringan dan hancurkan dengan homogenisasi dan pusingkan 3000 rpm selama 5 menit. Pisahkan cairannya dan encerkan dengan larutan penyangga pengencer.

Bahan makanan

Komposisi asam-asam amino dalam protein dan asam-asam amino bebas dalam bahan makanan dapat ditentukan dengan cara-cara seperti tersebut di atas. Karbohidrat dan lemak dapat mengganggu penentuan asam amino ini, oleh sebab itu sebaiknya dihilangkan terlebih dahulu

lu. Untuk penentuan asam amino total, maka prosedur hidrolisa dengan asam dapat dipakai. Apabila sukar larut maka bahan makanan perlu dihaluskan lebih dahulu. Untuk penentuan asam amino bebas dapat dipakai prosedur jaringan seperti tersebut di atas.

Pembacaan hasil

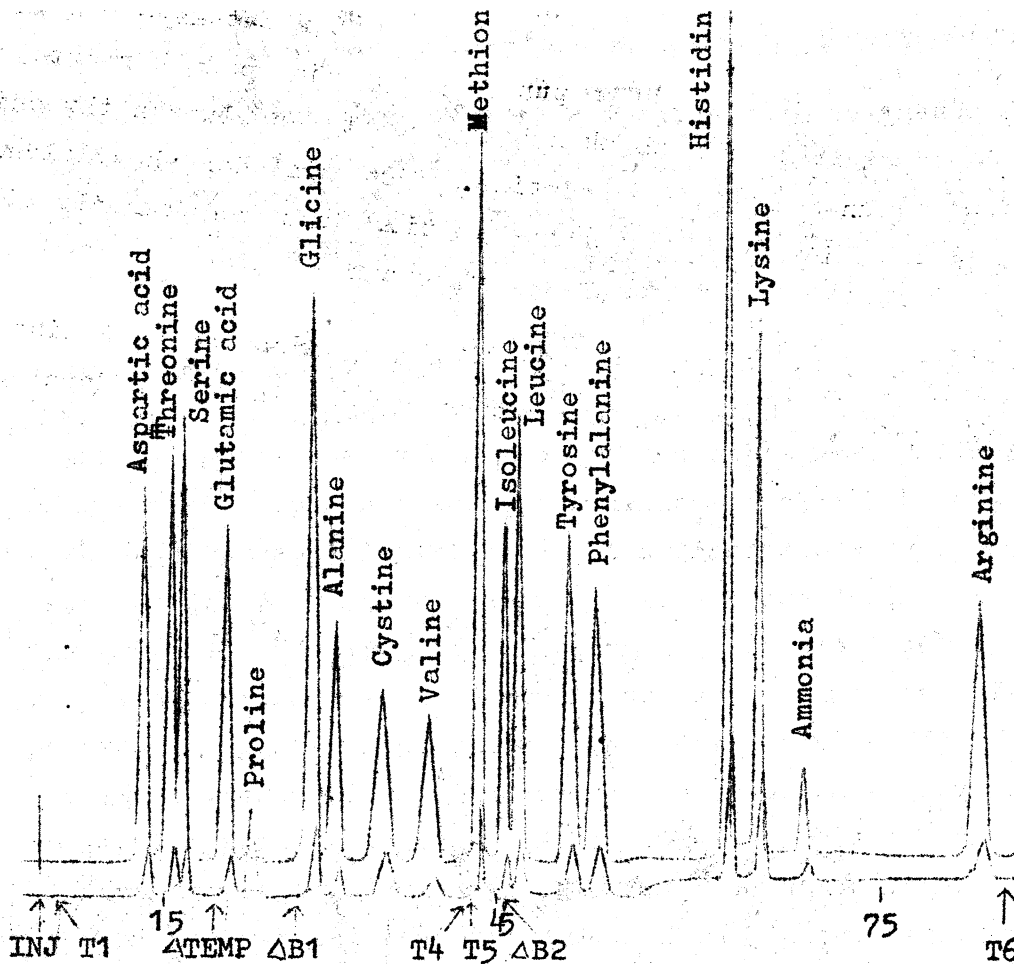
Karena penentuan asam amino adalah dengan cara khromatografi dan kolorimetri yang sifatnya membandingkan pembacaan hasil penentuan komponen bahan secara kuantitatif mau pun kualitatif dengan bahan standar yang telah diketahui identitas dan kadarnya, maka kondisi penentuannya harus tetap dan dengan pengawasan yang cermat. Misalnya, apabila asam amino tertentu dipompakan lewat lapisan resin pemisah menghasilkan puncak setelah 30 menit dari permulaan, maka untuk senyawa yang sama akan juga tampak setelah 30 menit, meski pun dilakukan pada waktu yang lain, asalkan keadaan penentuan tetap sama. Selanjutnya, secara kuantitatif, luas puncak khromatogram akan proporsional dengan jumlah atau kadar asam amino yang dilewatkan melalui alat ini.

Karena sifat repeatability (reproducibility) alat, maka identitas suatu senyawa akan dapat diketahui dengan membandingkan kedudukan puncaknya dengan puncak senyawa (asam amino) yang telah diketahui.

Secara kuantitatif suatu komponen dapat ditentukan kadarnya dengan membandingkan luas puncak senyawa yang telah diketahui kadarnya. Luas puncak dapat ditentukan secara sederhana (seperti pada GLC) dengan perkalian tinggi puncak dengan lebar puncak pada $\frac{1}{2}$ tinggi. Dapat juga ditentukan dengan alat planimeter, integrator elektronik atau penimbangan kertas pencatat.

Kenaikan pH larutan penyangga atau kekuatan ionnya, juga kenaikan suhu kolom akan mempercepat waktu elusi asam-asam amino. Keadaan sebaliknya akan memperlambat waktu elusi asam-asam amino.

Asam amino cystine paling peka terhadap perubahan pH ini. Perubahan pH sebesar 0,01 akan menggeser puncak cystine 1 menit. Untuk pengaturan pH penyangga 0,01 dapat dilakukan dengan menambahkan 0,1 ml NaOH 50 % atau 0,2 ml HCl pekat setiap 4 liter larutan penyang-



Model 118/119 CL		Model 126 Data System	
Column	6x460 mm	Peak width	20
Resin type	W3	Slope sensitivity	10000
Resin bed height	220 mm	Fused peaks	10
Buffers	pH 3,25 0,20N Na ⁺	Baseline test	5
	pH 3,95 0,40N Na ⁺	T1	40
	pH 6,40 1,00N Na ⁺	T4	412
	NaOH 0,20N Na ⁺	T5	414
Buffer flow rate	44 ml/h	T6	880
Ninhydrin flow rate	22 ml/h	Minimum area	50000
Column temperature	50° C; 65° C	Plateau test	10
Recorder chart speed	6 in/h	Maximum baseline level	50000

* 1% 2-propanol is added to the first buffer. See text.

Gambar 2. Contoh parameter pelaksanaan analisa dan kromatogram yang dihasilkan.

Pengaturan suhu yang tepat akan menjamin terbentuknya puncak-puncak yang jelas terpisah dan puncak yang tajam pada khromatogram. Suhu yang terlalu rendah akan mempercepat pengeluaran threonine dan serine namun memperlambat cystine. Threonine dan phenylalanine akan mengalami gangguan yang tak pasti. Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan pengaruh yang berlawanan.

Contoh parameter yang dipakai di dalam melaksanakan analisa dengan amino acid analyzer dan khromatogram yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 2 .

SALAM TRANSISI

INALILLAHI WA INNA ILAIHI ROJI'UN

Telah dipanggil Tuhan Yang Maha Esa :

1. Bapak Djoko Soeharto, kakanda Prof I. Kamariyani , wafat pada tanggal 1 Desember 1980 dalam usia 74 tahun di Madiun.
2. Ibu Imam Tioso, neneknda Ir. R.B. Kasmidjo, wafat tanggal 1-Nopember 1980, dalam usia 100 tahun di Ceper.
3. Bapak Pontjoardjo, kakanda Ir. Soehardi, wafat tanggal 28 Oktober 1980 dalam usia 85 tahun di Sambisari, Kalasan.
4. Bapak Tamsir, mertua Ir. Soehardi wafat tanggal 22 Nopember 1980 dalam usia 68 tahun di Bojonegoro.