



KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)

KARAKTERISASI BIJI DAN FRAKSINASI PROTEIN
DARI KORO KRATOK (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet)
VARIETAS KRATOK PUTIH

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk
Menyelesaikan Pendidikan Strata Satu
Pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Oleh :

Asal :	Hadiah	Klass
Terima di :	Penerimaan 10 MAR 2005	633.3
No. induk :		RAH
Pengkatalog :	<i>RAH</i>	4

ANISAH RAHMY

NIM. 011710101067

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER

2004

Diterima oleh:

Fakultas Teknologi Pertanian

Universitas Jember

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis

Dipertahankan pada:

Hari : Sabtu

Tanggal : 12 Februari 2005

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

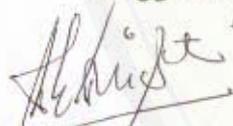
Tim Penguji

Ketua



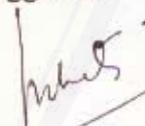
Dr. Ir. Achmad Subagio, M.Agr. Phd.
NIP. 131 975 306

Anggota I



Ir. Wiwik Siti Windarti, MP.
NIP. 130 787 732

Anggota II

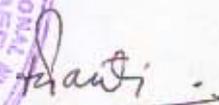


Ir. Sukatiningsih, MS.
NIP. 130 890 066

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Universitas Jember



Ir. Siti Hartanti, MS.
NIP. 130 350 763

DOSEN PEMBIMBING:

Dr. Ir. Achmad Subagio, M.Agr. Phd. (DPU)

Ir. Wiwik Siti Windrati, MP. (DPA I)

Ir. Sukatiningsih, MS. (DPA II)

MOTTO

"Bring Supply When U Go

Bring Charity When U Die

Bawalah Bekal Jika Kau Pergi

Bawalah Amal Jika Kau Mati"

PERSEMBAHAN

Dengan Mengucap Syukur Kepada Allah SWT,

Karya ini Ku Persembahkan Kepada:

Ayah dan Ibu

Terima Kasih, Semoga Kebahagiaan Selalu Menyertaimu

Almamaterku

Banyak hal yang belum aku kerjakan buat mu.

Tak Lupa Juga Untuk:

- Pak Bagio, Jasamu begitu besar padaku. Terima kasih.
- Tim Koro (Bagus, Doni, Sari, Bayu, Sinta, Fitri), Cepetan lulus yo!
- Tim Kuniran (Vivi), Ingatlah selalu masa-masa terindah kita dan (Ade), Laris manis toko rotinya!
- Tim Biduri (Mas Ibnul dan Mas Heri) ayo golek kerjo bareng!, (Sofi) yang rukun sama timnya!
- Mbak Sari, Mbak Ketut dan Mas Nafi, Jangan lupakan senyumku!
- Mbak Dewi (Kakak Terbaikku), Raniah dan Kusnul, Kompakan Selalu!
- Kosim, Bambang, Adi, Ningrum, Apakah kau masih sahabatku yang dulu?
- Keluarga Besar FTP UNEJ (Bu Wato dan Pak Cuk, Bu Leli, Temen Ang 2001, dan Semuanya).
- Keluarga Besar Kalimantan IV / 53, Terima kasih telah menjadikan aku dewasa

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas karuniaNya telah penelitian dan penulisan Karya Ilmiah Tertulis (SKRIPSI) dengan judul Karakterisasi Sifat Fisik, Kimia dan Fraksinasi Protein Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) Varictas Kratok Putih dapat selesai dengan baik.

Penulisan skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya penelitian dan penulisan skripsi ini, antara lain:

1. Ir. Hj. Siti Hartanti, MS., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Giyarto, MS., selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan dalam perkuliahan.
3. Dr. Ir. Achmad Subagio, M.Agr. Phd., selaku dosen pembimbing utama penelitian atas waktu dan pikiran yang telah dicurahkan dalam penelitian ini.
4. Ir. Wiwik Siti Windrati, MP., selaku dosen pembimbing anggotayang juga turut membantu keberhasilan penelitian ini.
5. Ir. Sukatiningsih, MS., yang telah membantu perbaikan tulisan ini.
6. Para teknisi laboratorium terutama mbak sari dan mbak ketut.
7. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Pengendalian Mutu.
8. Dan semua teman seangkatan 2001 yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Kritik dan saran sangat penulis harapkan demi perbaikan skripsi ini. Penulis berarap semoga skripsi ini bermanfaat bagi para pembaca yang memerlukannya.

Jember, Januari 2004

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN.....	ii
DOSEN PEMBIMBING.....	iii
MOTTO.....	iv
PERSEMBAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPRAN.....	xi
ABSTRAKSI.....	xii
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tanaman Koro Kratok (<i>Phaseolus lunatus</i> (L.) Sweet).....	4
2.2. Sifat Fisik dan Kimia.....	7
2.3. Protein.....	10
2.4. Penggolongan Protein Berdasarkan Daya Larut.....	14
2.5. Fraksinasi Globulin 7S dan 11S.....	15
2.6. Dialisis.....	17
2.7. Elektroforesis.....	19
III. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1. Bahan dan Alat.....	22
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
3.3. Persiapan Bahan.....	22

3.4. Rancangan Percobaan.....	23
3.5. Pengukuran Sifat Fisik.....	23
3.6. Pengukuran Sifat Kimia.....	25
3.7. Fraksinasi Protein Berdasarkan Daya Kelarutan.....	29
3.8. Fraksinasi Globulin 7S dan 11S.....	32
3.9. Kadar Protein Terlarut (Lowry).....	34
3.10. Elektroforesis.....	35
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Sifat Fisik dan Kimia Koro Kratok (<i>Phaseolus lunatus</i> (L.) Sweet) Putih.....	37
4.2. Fraksinasi Protein Berdasarkan Kelarutan.....	40
4.3. Fraksinasi Globulin 7S dan 11S.....	41
4.4. Penentuan Berat Molekul dengan Elektroforesis SDS-PAGE....	43
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	47
5.1 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA.....	xiii
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Daftar Komposisi Koro Kratok Per 100g Bahan.....	7
Tabel 2.	Koefisien Sedimentasi Protein.....	15
Tabel 3.	Sifat Fisikokimia Globulin 7S Dan 11S Protein Kedelai.....	17
Tabel 4.	Banyaknya Acrylamide yang Digunakan Untuk Penentuan Berat Molekul Protein Dengan SDS-PAGE.....	20
Tabel 5.	Sifat Fisik Biji Koro Kratok (<i>Phaseolus Lunatus</i> (L.) Sweet) Putih.....	37
Tabel 6.	Kandungan Kimia Koro Kratok (<i>Phaseolus Lunatus</i> (L.) <i>Sweet</i>) Putih.....	39
Tabel 7.	Kandungan Kimia Koro Lainnya Dan Kedelai.....	39
Tabel 8.	Fraksinasi Protein Koro Kratok (<i>Phaseolus Lunatus</i> (L.) <i>Sweet</i>) Putih.....	40
Tabel 9.	Hasil Fraksinasi Globulin 7S Dan 11S Koro Kratok (<i>Phaseolus Lunatus</i> (L.) <i>Sweet</i>) Putih.....	41
Tabel 10.	Nilai Berat Molekul dan Rf dari Kit Penciri Protein BM Rendah.....	44
Tabel 11.	Mobilitas Relatif dan Perkiraan Berat Molekulnya.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Tanaman Koro Kratok Merambat.....	5
Gambar 2.	Gambar Bunga Koro Kratok.....	6
Gambar 3.	Gambar Koro Kratok Putih dari Atas dan Samping.....	6
Gambar 4.	Struktur Protein.....	11
Gambar 5.	Mekanisme Proses Dialisis.....	18
Gambar 6.	Elektroforesa.....	19
Gambar 7.	Fraksinasi Protein Koro Kratok.....	31
Gambar 8.	Fraksinasi Protein Globulin 7S dan 11S.....	33
Gambar 9.	Metode Lowry.....	34
Gambar 10.	Hasil Elektroforesis.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1.** Sifat Fisik Dan Kimia Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet)
Varietas Kratok Putih
- Lampiran 2.** Analisa Protein Terlarut Dengan Metode Lowry
- Lampiran 3.** Elektroforesa



ANISAH RAHMY (011710101067), **Karakterisasi sifat Fisik, Kimia dan Fraksinasi Protein Koro Kratok (*Phaseolus lunaus* (L.) Sweet) Varietas Kratok Putih**, dibimbing oleh Dr. Ir. Achmad Subagio, M.Agr. Phd. (DPU) dan Ir. Wiwik Siti Windrati, MP. (DPA).

ABSTRAKSI

Koro kratok (*Phaseolus lunaus* (L.) Sweet) varietas kratok putih merupakan satu dari beberapa jenis tanaman kacang-kacangan potensial yang belum dimanfaatkan dengan baik. Selain proses budidaya yang mudah dan produktifitas biji kering yang dihasilkan cukup tinggi, koro kratok putih juga memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Karakterisasi sifat fisik, kimia dan fraksinasi protein dari biji koro kratok putih merupakan salah satu tahapan untuk pemanfaatan koro kratok putih lebih lanjut sebagai bahan pangan.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengkarakterisasi sifat fisik, kimia, dan fraksinasi protein dari biji koro kratok (*Phaseolus lunaus* (L.) Sweet) varietas kratok putih. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang lengkap mengenai alternatif sumber protein nabati baru disamping kedelai sekaligus informasi mengenai aplikasi proteinnya sebagai bahan tambahan makanan.

Biji koro kratok putih dikarakterisasi sifat fisik dan kimianya. Sifat fisik yang diukur meliputi tebal, panjang, lebar, berat biji, luas permukaan, volume biji, BDD (Berat yang Dapat Dimakan), ketebalan kulit, dan warna biji. Sifat kimia meliputi kandungan karbohidrat, protein, lemak, kadar air, kadar abu, kadar serat, kadar pati dan total gula. Fraksinasi protein dilakukan berdasarkan kelarutannya (albumin, globulin, prolamin dan glutelin) dan sifat sedimentasinya (globulin 7S dan 11S). Hasil fraksinasi dianalisa elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) untuk menghitung nilai BM (Berat Molekul). Pengolahan data dilakukan secara diskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa biji koro kratok (*Phaseolus lunaus* (L.) Sweet) varietas kratok putih mempunyai bentuk biji yang bulat memanjang dan agak sintal dengan warna berkisar antara putih hingga kuning. Nilai BDD dari koro kratok putih berkisar 92,35± 0,90 %. Dilihat dari komposisi kimia koro kratok putih, karbohidrat mempunyai kandungan yang paling tinggi yaitu 67,12 %, dengan komponen penyusun terbesar pati sebesar 61,27%. Disusul dengan protein 16,15 %, kadar air 11,23 %, kadar abu 4,36 dan kadar lemak yang rendah yaitu 1,14 %. Kandungan protein terbanyak adalah albumin. Dan fraksi globulin yang terbesar adalah globulin 7S.

Nilai BDD yang cukup besar dari koro kratok (*Phaseolus lunaus* (L.) Sweet) varietas kratok putih dan juga komposisi karbohidrat dan protein yang cukup tinggi serta kadar lemak yang rendah membuat koro ini potensi sekali untuk dikembangkan sebagai sumber pangan dan alternatif protein nabati baru. Selain itu komposisi globulin 7S yang mendominasi memungkinkan protein biji ini dijadikan sebagai bahan tambahan makanan yang baik.

Kata kunci: koro kratok putih, seed protein, sifat fisikokimia, fraksinasi protein.



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jenis tanaman kacang-kacangan yang ada di Indonesia sangat beragam dan merupakan bahan pangan yang penuh gizi, tetapi yang sering dikonsumsi dan dikenal masyarakat adalah jenis kacang-kacangan tertentu seperti: kedelai, kacang tanah dan kacang hijau. Padahal masih banyak jenis tanaman kacang-kacangan lain yang potensial untuk dikembangkan di Indonesia.

Tanaman koro-koroan, seperti komak, kratok, koro wedus, koro benguk, dan koro pedang, merupakan anggota dari tanaman polong-polongan yang kandungan minyaknya relatif rendah. Tanaman ini mempunyai keunggulan dibanding jenis kacang-kacangan lain, yaitu mudah di budidayakan dan produktivitas biji keringnya cukup tinggi sekitar 800-900 kg/ha pada lahan kering dan kurang lebih 1700 kg/ha apabila lahan diberi pengairan (Robert, 1985). Di beberapa daerah di Jawa Timur, seperti di Bondowoso, Situbondo dan Probolinggo, koro-koroan, terutama kratok sering digunakan sebagai campuran dari nasi beras. Sayang sekali, tidak ada data yang pasti tentang produksi koro-koroan di Indonesia. Hal ini disebabkan oleh nilai ekonomis yang rendah, dan belum termanfaatkannya biji koro-koroan (Subagio, 2004).

Protein merupakan salah satu komponen gizi terpenting yang harus dipenuhi, terutama pertumbuhan balita dan anak-anak. Pemenuhan kebutuhan protein diperoleh dari dua sumber yaitu protein hewani dan protein nabati. Indonesia kaya akan jenis kacang-kacangan yang merupakan sumber protein nabati. Disamping kedelai yang sudah terkenal di masyarakat, golongan koro-koroan (*non-oil seed legumes*) merupakan salah satu sumber protein yang cukup bagus yang belum dimanfaatkan dengan baik (Somaatmadja dan Maesan, 1993).

Koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) mempunyai kandungan protein sebesar 14,4 – 26,4 gram, lemak 1,5 gram (Maesen dan Somaatmadja, 1993). Koro kratok di daerah Jember mempunyai bermacam-macam varietas antara lain manik, putih, coklat / merah, ungu, loreng dan hitam.

Kacang koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih selama ini sudah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai bahan sayur-sayuran saja tanpa adanya penggalan untuk manfaat lain yang juga berarti. Selain itu juga berpotensi sebagai pengganti protein hewani bagi para vegetarian. Usaha pendayagunaan koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih sebagai salah satu sumber protein baru dipandang sebagai salah satu usaha yang cukup bagus.

Karakterisasi dari biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih yang meliputi karakterisasi sifat fisik seperti panjang, lebar, tebal, volume dan sifat fisik lainnya serta komposisi senyawa organik yang ada dalam biji koro harus diketahui secara pasti terutama komponen penting seperti kadar protein, lemak dan karbohidrat. Sehingga bisa dijadikan sebagai sumber acuan dalam pemanfaatannya.

Selain karakterisasi sifat fisik dan khemis dari biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih, fraksinasi protein pada biji berdasarkan kelarutan dan sifat sedimentasinya juga diperlukan. Berdasarkan kelarutannya, protein digolongkan dalam 4 (empat) fraksi yaitu albumin, globulin, glutelin dan prolamin yang diklasifikasikan menggunakan metode Osborne (Nielsen, 1985). Sedangkan berdasarkan sifat sedimentasinya digolongkan dalam 4 (empat) fraksi yaitu 2S, 7S, 11S dan 15S. Dalam penelitian ini dibatasi pada penggolongan fraksi 7S dan 11S. Pemisahan fraksi 7S dan 11S berdasarkan titik isoelektriknya. Fraksi 7S mempunyai pH isoelektrik 4,8 sedangkan fraksi 11S mempunyai pH isoelektrik pada pH 6,4 (Tanh dan Shibasaki, 1976).

Protein biji koro kratok putih yang telah difraksinasi dapat diketahui sifat fungsionalnya berdasarkan komponen penyusun protein tersebut. Perbedaan struktur dari globulin 7S dan 11S berperan dalam variasi sifat fungsional makanan antara lain kelarutan, *Water Holding Capacity* (WHC), *Oil Holding Capacity* (OHC), daya emulsi, daya buih dan sifat gelasi. Dengan demikian, protein koro kratok putih dapat diketahui potensinya apakah sebagai bahan tinambah, *emulsifier*, *texturizer* dan *stabilizer*.

1.2 Rumusan Masalah

Karakterisasi sifat fisik dan kimia biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih serta fraksinasi protein berdasarkan kelarutan dan sifat sedimentasinya perlu dilakukan sebagai dasar pemanfaatan koro kratok putih lebih lanjut.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui karakter fisik dan kimia dari biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih.
2. Mengetahui hasil fraksinasi dari protein biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih berdasarkan kelarutannya.
3. Mengetahui hasil fraksinasi globulin 7S / 11S dari protein biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk:

1. Memberikan informasi dasar mengenai karakterisasi sifat fisik dan kimia serta fraksinasi protein dari biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih sebagai sumber acuan pemanfaatannya.
2. Memberikan informasi alternatif sumber protein nabati baru disamping kedelai.
3. Meningkatkan nilai ekonomis dan daya guna dari koro kratok putih.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet)

Koro kratok merupakan tanaman semusim atau kadang-kadang tahunan, tipe yang merumpun tingginya mencapai 0,6 m, sedangkan tipe yang memanjat 2–4 m. Perakarannya langsing atau menggembung, panjangnya 1,5–2 m. Daun majemuk beranak daun tiga, anak daun bundar telur dan lancip, (5–9) cm x (3–11) cm. Polongnya lonjong (5–12) cm x 2,5 cm, umumnya melengkung, kadang-kadang ujungnya berbentuk kail, berbiji 2–4 butir. Biji bervariasi dalam ukuran, bentuk dan warnanya. Bentuk ginjal, bundar dan belah ketupat. Warna seragam atau bercak atau berbintik, putih, hijau, kuning, coklat, merah, hitam atau lembayung; seringkali dari hilimnya memencar garis-garis yang menyilang. Kecambahnya epigeal, dua daun pertamanya tunggal dan beradapen (Somaatmadja dan Maesan, 1993).

Koro kratok berasal dari daerah Neotropik, dengan sekurang-kurangnya dua pusat domestikasinya: Amerika Tengah (Meksiko dan Guatemala) untuk yang berbiji kecil-kecil, dan Amerika Selatan (terutama Peru) untuk yang berbiji besar-besar. Kini koro kratok dibudidayakan di seluruh daerah panas di dunia. Tanaman kratok dikenal juga di beberapa negara dengan nama daerah antar lain *Lima Bean*, *Butter Bean*, *Madagaskar Bean* (Inggris), *Kacang Cina*, *Kacang Jawa*, *Kekara Kratok* (Malaysia), *Burma Bean* (Myanmar) (Somaatmadja dan Maesen, 1993).

Nama umum yang mengidentifikasi jenis berbiji kecil adalah kara kratok, sieva, dan kacang laut. Nama kacang keju dan kacang *Madagaskar* digunakan untuk kara kratok berbiji besar. 'Fordhook' adalah nama yang dikenal dengan baik untuk kara berbiji besar, grup 'kara kentang' (Rubatzky dan Yamauguchi, 1998).

Kultivar-kultivar yang dibudidayakan di Asia umumnya diklasifikasikan ke dalam 4 kelompok :

1. Kacang Jawa: bijinya berukuran sedang, merah lembayung, mengandung banyak HCN.

2. Kacang rangon merah atau kacang burma merah: bijinya kecil kemerah-merahan, biasanya sintal dan kadang-kadang berbecak putih. Kandungan HCN-nya hampir tidak ada.
3. Kacang rangon putih atau kacang burma putih: bijinya putih kecil, biasanya sintal dan mirip "haricot" kecil. Kandungan HCN-nya hampir tak ada.
4. Kacang lima (kratok): bijinya besar putih, sintal. Diberitakan tidak mengandung HCN.

Di Indonesia jenis tanaman ini sejak lama sudah dikenal sebagai tanaman budidaya, tumbuh baik didaerah pegunungan antara 300-1300 m diatas permukaan air laut. Umumnya ditanam didaerah kering dan ditanam di pekarangan atau di ladang terutama di Jawa Tengah, Jawa Timur dan Nusa Tenggara (Sastrapradja, dkk, 1981).

Pembungaan tidak terbatas (*indeterminate*), dan bunga dapat membuah sendiri, walaupun persilangan sendiri kadang-kadang juga terjadi. Biji yang agak berbentuk bulan, yang merupakan ciri spesies ini. Panjang polong oblong yang agak melengkung berkisar antara 5 sampai 15 cm dan lebar 2-3 cm . Biji besar, pipih dan oblong pada tipe tanaman tertentu memiliki panjang hingga 3 cm. Tipe biji yang lain juga pipih, tetapi agak bundar dan panjangnya sekitar 1 cm: permukaan biji kedua tipe ini rata (Rubatzki dan Yamaguchi, 1998).

Berikut ini adalah gambar dari tanaman koro kratok, bunga serta gambar dari biji koro kratok putih kering:



Gambar 1. Tanaman koro kratok merambat
(Internet)



Gambar 2. Bunga koro kratok
(Internet)



Gambar 3. Koro kratok putih dari samping dan atas
(internet)

Syarat-syarat untuk tumbuhnya tanaman kratok yang penting adalah tanahnya gembur, air tidak menggenang dan iklimnya kering, derajat keasaman tanah 5,5 sampai 6,5. Tanaman yang sehat biasanya menghasilkan buah secara terus-menerus selama beberapa minggu, biji kering yang dihasilkan 100-2000 kg/ha (Somaatmadja dan Maesen, 1993).

Kandungan setiap 100 g bagian biji kering koro kratok yang dapat dimakan dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Daftar komposisi biji koro kratok per 100 g bahan

No.	Komposisi	Kandungan
1.	Air (g)	13,2
2.	Protein (g)	14,4 - 26,4
3.	Lemak (g)	1,5
4.	Karbohidrat (g)	58,0
5.	Serat (g)	3,7
6.	Abu (g)	3,4
7.	Energi (KJ)	1450,0

(Soemaatmadja dan Maesan, 1993)

Asam amino pembatas utamanya berupa metionina dan sistina (setara dengan N total 1,1 - 1,2 g per 16 g). Kandungan proteinnya untuk setiap 100 g bagian yang dapat dimakan adalah : polong muda 1,3 g, biji muda 8,4 g dan daun segar 0,6 g. Faktor-faktor anti metaboliknya mencakup penghambat protease, lektin, dan glikosida sianogenik (linamarin). Berat biji bervariasi antara 30 dan 200 g per 100 butir (Rubatzky, dan Yamaguchi, 1998).

Kratok dibudidayakan terutama untuk dipanen biji muda dan biji keringnya. Di Filipina, biji keringnya di gunakan sebagai penghasil tepung kacang yang kaya protein, untuk meningkatkan mutu roti dan mie. Khususnya di Asia kecambah muda, daun dan polongnya juga di makan. Biji dan daun dinilai mengandung khasiat mengencangkan jaringan tubuh. Kratok memberikan suatu prospek yang cerah, baik di daerah subtropik maupun daerah setengah kering sampai tropik basah (Somaatmadja dan Maesan, 1993).

2.2 Sifat Fisik dan Kimia

2.2.1 Sifat fisik

Sifat fisik koro kratok yang diamati disini adalah ukuran dan warna. Dalam menilai mutu fisik biji-bijian dan hasil olahannya, warna dan penampakan sering digunakan sebagai parameter. Kelainan dari warna-warna tersebut menjadi indeks untuk tak disukai (Syarief, dan Anies, 1988). Menurut Desrosier (1988),

warna merupakan kenampakan terluar dari suatu produk yang dipengaruhi oleh cahaya, pigmen dan kemampuan mata untuk mendeteksi warna tersebut.

2.2.2 Sifat Kimia

Karakteristik kimia yang biasanya dijabarkan pada daftar analisa bahan makanan dan kandungan gizi serta kandungan senyawa khusus yang terdapat pada bahan makanan tersebut. Dalam hal ini perlu diketahui bahwa angka analisa kimiawi yang tercantum pada suatu daftar bahan makanan tidak dapat dianggap sebagai angka yang mutlak. Angka tersebut merupakan angka antar batas sesuai dengan jenis bahan (Syarief dan Anies, 1988). Sifat kimia tersebut meliputi :

1. Kadar Air

Kadar air suatu bahan biasanya dinyatakan dalam persentase berat terhadap bahan basah (Syarief dan Anies 1988). Pada umumnya penentuan kadar air dilakukan dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105 – 110°C selama tiga jam atau sampai didapat berat yang konstan (Winarno, 1991).

Prinsip penentuan kadar air dengan cara pengeringan (Thermogravimetri) ini yaitu menguapkan air yang ada dalam bahan dengan jalan pemanasan. Kemudian menimbang bahan sampai berat konstan yang berarti semua air sudah diuapkan (Sudarmadji, dkk., 1997).

2. Kadar Abu

Abu merupakan hasil pembakaran dari suatu bahan organik yang merupakan zat-zat anorganik. Pengabuan akan mengakibatkan hilangnya bahan-bahan organik dan anorganik, sehingga terjadi perubahan radikal organik dan segera terbentuk elemen logam dalam bentuk oksida atau bersenyawa dengan ion-ion negatif.

Didalam proses pengabuan ada dua cara yang dapat dilakukan, yaitu dengan cara langsung atau cara kering dan cara tidak langsung atau cara basah. Cara langsung dengan mengoksidasikan semua zat-zat organik pada suhu tinggi, yaitu sekitar 500 -600°C dan kemudian mengadakan penimbangan setelah proses tersebut selesai. Sedangkan cara tidak langsung dengan menambahkan senyawa tertentu pada bahan yang diabukan, seperti gliserol alkohol, asam sulfat atau asam nitrat (Anonim, 2002).

3. Kadar Gula Total

Karbohidrat banyak terdapat dalam bahan nabati, baik berupa gula sederhana, heksosa, pentosa maupun karbohidrat dengan berat molekul yang tinggi seperti pektin, pati, selulosa dan lignin.

Penetapan kadar gula total diketahui dari selisih antara kadar gula sebelum inversi dengan kadar gula setelah inversi. Proses inversi merupakan proses penguraian oligosakarida dalam hal ini sukrosa menjadi monosakarida dalam hal ini glukosa dan fruktosa yang disebut sebagai gula invert. Inversi sukrosa terjadi pada suasana asam (Winarno, 2004).

4. Kadar Pati

Jumlah karbohidrat sering dinyatakan dalam jumlah monomer penyusunnya. Bahkan untuk senyawa polimer yang homogen seperti pati yang terdiri dari monomer glukosa saja, masih memerlukan kurva standar yang menunjukkan hubungan antara jumlah pati murni dengan indikatornya (misalnya gula reduksi) (Sudarmadji, dkk, 2003). Penetapan pati dapat dilakukan dengan menghidrolisa pati dengan asam ataupun enzim. Perhitungan jumlah pati didapat dari perkalian antara gula reduksi dengan faktor konversi kadar pati yaitu 0,9.

5. Kadar Serat

Serat kasar mengandung senyawa selulosa, lignin dan zat lain yang belum dapat diidentifikasi dengan pasti. Yang disebut serat kasar disini adalah senyawaan yang tidak dapat dicerna dalam organ pencernaan manusia ataupun binatang. Di dalam analisa penentuan serat kasar diperhitungkan banyaknya zat-zat yang tak larut dalam asam encer ataupun basa encer dengan kondisi tertentu. Langkah-langkah yang dilakukan dalam analisa adalah:

1. Defatting, yaitu menghilangkan lemak yang terkandung dalam sampel menggunakan pelarut lemak.
2. Digesting, terdiri dari dua tahapan yaitu pelarutan dengan asam dan basa. Kedua macam proses digesti ini dilakukan dalam keadaan tertutup pada suhu terkontrol (mendidih) dan sedapat mungkin dihilangkan dari pengaruh luar.

Serat kasar sangat penting dalam penilaian kualitas bahan makanan karena angka ini merupakan indeks dan menentukan nilai gizi bahan makanan

tersebut. Selain itu kandungan serat kasar dapat digunakan untuk mengevaluasi suatu proses pengolahan, misalnya proses penggilingan atau proses pemisahan antara kulit dan kotiledon, dengan demikian presentase serat kasar dapat dipakai untuk menentukan kemurnian bahan atau efisiensi suatu proses (Sudarmadji, dkk., 2003).

6. Kadar Lemak

Pada penetapan kadar lipida (lemak atau minyak) dengan pelarut, selain lemak juga terikut fosfolipida, sterol, asam lemak bebas, karotenoid dari pigmen lainnya. Karena itu hasil analisisnya disebut lemak kasar. Lemak atau minyak dari bahan kering dapat dikerjakan secara terputus-putus. Ekstraksi ini dijalankan dengan alat soxhlet (metode soxhlet).

Pada metode soxhlet sejumlah sampel kering dimasukkan dalam timbel yang terbuat dari kertas saring, sampel tersebut diekstraksi dengan pelarut tertentu (petroleum eter, petroleum benzen dan lain-lain), Ekstraksi dilakukan selama 4 - 6 jam. Kemudian ekstrak dituang ke dalam botol timbang untuk diuapkan pelarutnya sampai diperoleh berat konstan di dalam oven yang bersuhu 100°C, residunya merupakan berat lemak (Anonim, 2002).

7. Kadar Protein

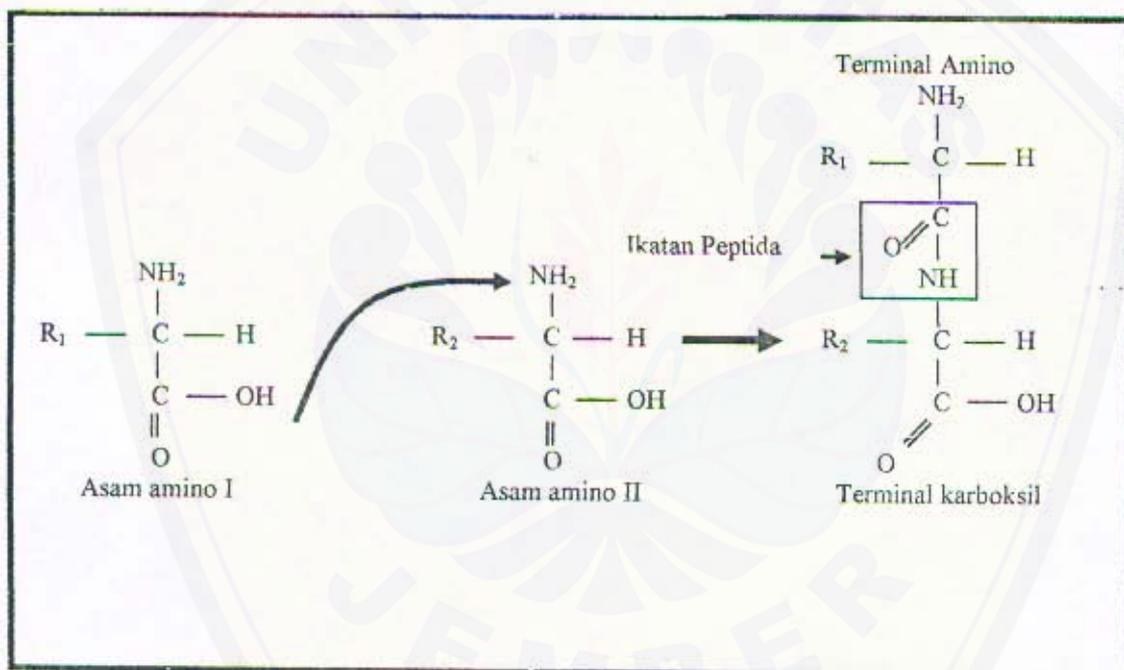
Peneraan jumlah protein dalam bahan makanan umumnya dilakukan berdasarkan peneraan empiris (tidak langsung), yaitu melalui penentuan kandungan nitrogen (N) yang ada dalam bahan. Cara penentuan ini dikembangkan oleh Kjeldahl. Kadar protein yang ditentukan berdasarkan cara Kjeldahl ini sering disebut sebagai kadar protein kasar (crude protein). Analisa protein cara kjeldahl pada dasarnya dapat dibagi menjadi tiga tahapan yaitu proses destruksi, proses destilasi dan tahap titrasi (Sudarmadji, dkk., 2003).

2.3 Protein

Sebutan protein pertama-tama dipakai pada tahun 1938, berasal dari kata Yunani, *proteios*, yang berarti "pertama". Dalam kehidupan protein mempunyai fungsi yang sangat penting. Semua enzim tumbuhan dan binatang adalah protein. Protein bersama-sama dengan lipida dan tulang membentuk kerangka tubuh

binatang. Ia juga membentuk otot, antibodi dan berbagai hormone. Unsur-unsur yang terdapat pada protein antara lain C,H,O,N, dan banyak mengandung S,P. Kadar unsur-unsur ini terletak dalam jarak-jarak tertentu; C: 51-55%; N: 15-18% rata-rata 16%; H: 6,3-7,3%; S: 0,0-2,5% (Fressenden dan Fressenden, 1997).

Protein merupakan polimer tak bercabang. Selama polimerisasi, gugus α amino bereaksi dengan gugus α karboksil dari asam amino lainnya membentuk ikatan amida yang dikenal sebagai ikatan peptida. Karena alasan ini protein dinamakan polipeptida (Colby, 1996).



Gambar 4. Struktur protein
(Sudarmadji, dkk, 2003)

Protein mempunyai 4 tingkat struktur : primer, sekunder, tersier dan kuartener :

1. Struktur Primer

Struktur primer dari suatu protein ialah urutan-urutan asam amino yang membentuknya (Schumm, 1993). Protein adalah urutan linier asam amino

dari terminal N sampai terminal C (Colby, 1996). Asam-asam amino dalam protein terikat satu sama lain dengan ikatan peptida

Ikatan peptida mempunyai sifat yang sebagian mirip dengan ikatan rangkap antara C dan N (Schumm, 1993).

2. Struktur Sekunder

Struktur sekunder terdiri atas gambaran lipatan lokal dalam suatu bagian rantai polipeptid. Struktur sekunder terutama distabilkan oleh ikatan H yang terdapat antara gugus NH dan CO dari rantai peptida (Colby, 1996).

Struktur sekunder ditentukan oleh struktur primer. Struktur sekunder mempunyai tingkat energi yang terendah untuk suatu urutan tertentu dari asam-asam amino dalam lingkungan tertentu. Ada banyak kemungkinan untuk struktur sekunder, akan tetapi dua diantaranya sangat sering dijumpai yaitu heliks α dan lembaran β atau lembaran bergelombang.

3. Struktur Tersier

Struktur tersier adalah konfigurasi yang ditampilkan protein dalam ruang. Seperti struktur sekunder, struktur tersier pertama-tama juga ditentukan oleh urutan asam amino. Interaksi ion antara gugus-gugus R yang bermuatan, interaksi hidrofobik dan ikatan disulfida semuanya penting untuk memantapkan struktur tersier (Schumm, 1993)

Struktur tersier adalah pelipatan secara keseluruhan suatu rantai polipeptida. Bila protein melipat dalam konformasi alaminya, residu asam amino yang satu sama lain letaknya jauh pada struktur primer adalah juktaposisi. Dalam struktur tersier daerah-daerah struktur α dan β dihubungkan oleh bagian lipatan ireguler dari rantai polipeptida (Colby, 1996).

4. Struktur Kuartener

Struktur kuartener adalah penataan suatu rantai protein dengan rantai protein yang lain dan dengan koenzim yang tidak terikat secara kovalen. Rantai protein secara individu dapat berikatan dengan rantai protein yang lain (identik atau berbeda) sebagai subunit dari struktur yang lebih besar (Schumm, 1993).

Menurut Colby (1996), struktur kuartener adalah susunan polipeptida bersama-sama dalam kompleks rantai multipel (multichain). Kompleks polipeptida ini saling diikat oleh ikatan yang sama yang menentukan lipatan masing-masing polipeptida. Permukaan dimana dua polipeptida saling mengadakan interaksi satu sama lain adalah sesuai, menunjukkan bentuk, muatan dan polaritas komplementer.

Protein berdasarkan fungsinya dapat digolongkan menjadi 2 macam, yaitu protein fungsional, yaitu yang bersifat sebagai enzim dan golongan protein yang hanya disimpan yaitu protein cadangan (Dwidjoseputro, 1985).

Protein dapat bersifat amfoter, yaitu dapat bereaksi dengan asam dan basa. Protein bersifat amfoter karena asam-asam amino penyusunnya mengandung gugus $-COOH$ yang bersifat asam dan gugus $-NH_2$ yang bersifat basa. Jika protein diletakkan dalam larutan yang bersifat asam, maka protein akan mendapatkan ion positif dari asam, sehingga protein akan bermuatan positif (+). Jika protein diletakkan pada larutan yang bersifat basa, maka protein akan bermuatan negatif (-). Karena adanya ion OH^- dari basa dan ion H^+ dari asam, maka protein pada pH tertentu akan bersifat netral yang artinya selisih muatan positif dan muatan negatif adalah nol. Posisi dimana protein tidak mempunyai muatan dikenal dengan istilah Titik Isoelektrik. Protein pada pH isoelektrik akan mempunyai sifat antara lain kelarutan minimum, viscositas minimum dan juga tekanan osmotiknya (Sackheim and Schultz, 1997).

Protein mengalami salting-out pada saat protein dalam air ditambahkan alkohol, maka molekul air yang terserap oleh molekul protein terlepas dan tertarik oleh pelarut polar serta partikel protein keluar dari jerapan molekul air yang akhirnya akan menampakkan protein yang tidak larut. Protein akan larut kembali bila pelarut polar ditambahkan terus, atau protein mengalami salting-in (Winarno, 1991).

Denaturasi protein adalah proses kehilangan sifat biologis suatu protein, sedangkan koagulasi atau penggumpalan yang merupakan efek selanjutnya dari denaturasi. Hal-hal yang dapat mengakibatkan denaturasi adalah suhu, pH, dan larutan elektrolit (Winarno, 1991).

Protein disusun oleh asam amino yang dihubungkan satu dengan lainnya oleh ikatan peptida. Disamping ikatan peptida ada beberapa macam ikatan lainnya yang memperkuat struktur protein yaitu ikatan disulfida, ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan ikatan elektrostatis (Winarno, 1991).

Protein dapat mengalami kerusakan oleh pengaruh-pengaruh panas, reaksi kimia dengan asam dan basa, guncangan dan sebab-sebab lainnya. Perubahan-perubahan tersebut dikenal dengan terjadinya penggumpalan atau pengerutan. Larutan protein dapat membentuk selaput yang kemudian membuih jika dikocok, tetapi jika pengocokan berlebihan maka hal ini dapat menyebabkan protein terdenaturasi sehingga selaput pecah dan buih mengempis. Disamping denaturasi, protein dapat mengalami degradasi yaitu pemecahan molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana oleh pengaruh asam, basa atau enzim (Winarno, 1991).

2.4 Penggolongan Protein Berdasarkan Daya larut

Tiga kelompok dari protein biji adalah albumin, globulin, dan prolamin yang merupakan komponen terpenting pada sistem protein cadangan biji-bijian. (Dieckert, et al, 1985). Menurut Harrow, et al (1962) berdasarkan kelarutan protein digolongkan dalam 6 golongan yaitu :

1. Albumin, mempunyai karakter yang mudah larut dalam air dan mudah terkoagulasi oleh panas.
2. Globulin, tidak dapat larut dalam air, mudah terkoagulasi oleh panas, mudah larut dalam larutan garam dan membentuk endapan dengan konsentrasi garam yang tinggi. Larutan garam yang sering digunakan adalah NaCl, MgSO₄ dan (NH₄)₂SO₄.
3. Glutelin, tidak dapat larut dalam pelarut netral tetapi mudah larut dalam larutan asam dan basa.
4. Protein yang larut dalam alkohol (prolamine), mudah larut dalam alkohol 70-80% dan tidak dapat larut dalam air.

5. Histones, mudah larut dalam air dan tidak dapat larut dalam amonia. Selain itu, larutan tersebut dapat digunakan untuk mengendapkan histones. Bentuk koagulan akibat pemanasan dapat dilarutkan dalam larutan alkali.
6. Protamine, mudah larut dalam air dan tidak mudah terkoagulasi oleh pemanasan.

Prolamin dan globulin diyakini berfungsi terutama sebagai sumber karbon dan nitrogen saat biji berkecambah, tapi mengenai fungsi dari albumin belum diketahui secara pasti. Globulin penyusun protein legume yang disusun oleh dua komponen yaitu legumin dan vicilin. Legumin merupakan komponen penyusun utama dari globulin sedangkan vicilin adalah komponen utama dari globulin biji-bijian. Legumin dideskripsikan mengandung dua rantai polipeptida yang dihubungkan dengan jembatan disulfida (Dieckert, et al, 1985).

2.5 Fraksinasi Globulin 7S dan 11S

Jenis protein berdasarkan koefisien sedimentasinya, dapat dipisahkan dengan menggunakan ultrasentrifugasi. Dengan teknik ultrasentrifugasi ditemukan empat fraksi utama yaitu 2S, 7S, 11S dan 15S, dimana S merupakan Svedberg unit. Berikut adalah tabel mengenai koefisien sedimentasi protein:

Tabel 2. Koefisien sedimentasi protein

Koefisien sedimentasi	Komponen penyusun
2S	Trypsin inhibitors, cytochrome c, α -conglycinin
7S	β - and γ -conglycinin, lipoksigenases, α -amylases, hemagglutinins
11S	glycinin
15S	Polymers of glycinin

(Vereijken, 2000).

Fraksi 2S merupakan fraksi terkecil dari total protein dan memberikan kontribusi yang tidak banyak terhadap sifat fungsional protein. Dua fraksi mayor globulin yang sangat berperan antara lain β -con-glycinin (7S) dan glycinin (11S)

(Aaron M., dkk, 1985). Sedangkan fraksi 15S belum dapat diidentifikasi penyusunnya (Suhardi, 1989).

Fraksi 7S yang mencapai 35 % dari total protein (Hettiarachchy and Ziegler, 1994) mengandung empat jenis protein yang berbeda yaitu hemagglutinin, lipoksigenase, β -amilase dan globulin 7S (Windrati, 1999). Struktur kwartener globulin 7S tersusun dari enam kombinasi yang berbeda dari tiga sub unit yaitu α mempunyai berat molekul 57000, α' mempunyai berat molekul 56000 dan β mempunyai berat molekul 42000 dan berikatan melalui interaksi hidrofobik (Utsumi dan Kinsella, 1985). Globulin 7S tidak mengandung grup sulfhidril dan kandungan asam amino sulfurnya sangat rendah (Yu dan Damodaran, 1991).

Globulin 11S merupakan struktur kwartener yang terdiri dari dua belas unit dan merupakan dimer dari dua heksamer yang identik. Tiga sub unit dalam setiap heksamer tersebut bersifat asam dan lainnya bersifat basa. Setiap pasangan dari sub unit asam dan basa dihubungkan oleh ikatan disulfida (Yu dan Damodaran, 1991).

Globulin 11S yang mencapai 52 % dari total protein (Hettiarachchy and Ziebegler, 1994) mengandung delapan glisin, dua fenil alanin, dan dua leusin residu terminal amino per mol, sedikit mengandung karbohidrat dan mempunyai sub unit-sub unit yang berbeda dalam muatan maupun berat molekul (Iwabuchi dan Yamauchi, 1987).

Antara fraksi 7S dan 11S dapat saling ikat mengikat melalui ikatan disulfida yang menyebabkan pengendapan. Ikatan ini dapat dipisahkan dengan zat merkaptoetanol sistein dan Natrium disulfida. Ikatan disulfida akan menghambat pelipatan dan menurunkan interaksi air dengan minyak. Ikatan disulfida yang sedikit pada globulin 7S akan menyebabkan daya buih yang dihasilkan tinggi. Sebaliknya, rendahnya jumlah ikatan disulfida dalam globulin 7S akan menurunkan kemampuan dari protein untuk membentuk gel (Zayas, 1997). Pemisahan globulin 7S dan 11S dilakukan berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Tanh dan Shibasaki (1976). Metode ini dilakukan dengan cara mengekstrak globulin dalam Tris-HCl buffer 0,3 M yang mengandung 0,01M 2-merkaptoethanol pH 8. Dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan protein terlarut

dan protein tak terlarut dengan kecepatan 9000 rpm selama 20 menit. Fraksi 7S didapatkan dari pengaturan pH isoelektrik sebesar 4,8 sedangkan fraksi 11S didapatkan dari pH isoelektrik 6,4. Sifat fisikokimia Globulin 7S dan 11S protein kedelai seperti terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sifat Fisikokimia Globulin 7S dan 11S Protein Kedelai

Sifat	Globulin 11S	Globulin 7S
Berat molekul	350000	175000
Sub Unit	12	3
Berat Molekul Sub Unit	37000 (asam) 20000 (basa)	57000 (asam) 42000 (basa)
Struktur Sekunder	6 % α helix 40 % β struktur 55 % random coil	6 % α helix (49) 39 % β struktur 60 % random coil
Kandungan karbohidrat	0	4,94 % (4)
Half-cystine	48 mol/mole	0
Konstanta Sedimentasi (S^{20}_W)	12,3 S	7,20S
Volume Spesifik Parsial ($V, 20^\circ\text{C}$)	0,730 ml/g	0,725 ml/g
Konstanta Difusi ($D^\circ 20, W \times 10^7$)	3,44 cm^2/detik	4,52 cm^2/detik
Stokes Radius	58,5 A°	59 A°
Intrinsic Viscosity	0,0485 dl/g	0,0638 dl/g
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (280 nm)	8,04	4,16
pH isoelektrik	6,4	4,9
Suhu Denaturasi	80 $^\circ\text{C}$ (48)	67 $^\circ\text{C}$ (48)

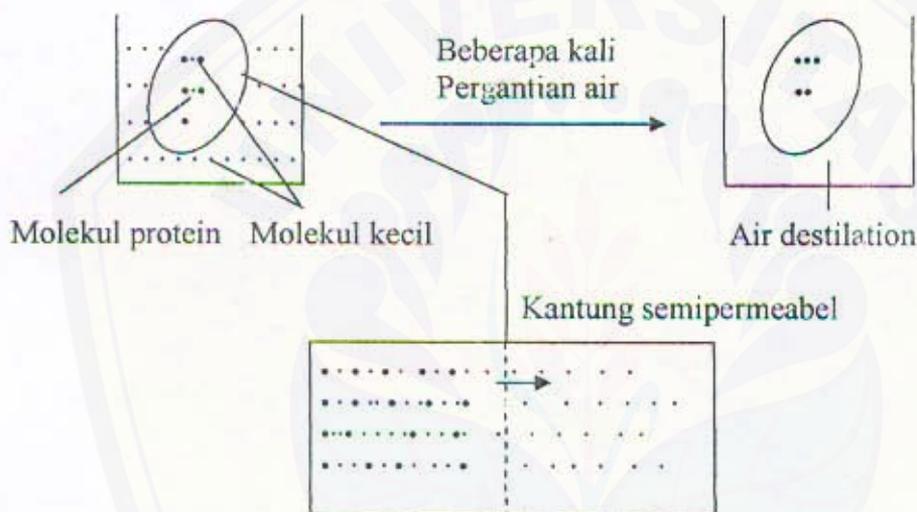
Sumber : Waggle et al dalam Matthews, 1989

2.6 Dialisis

Protein dapat dipisahkan dari molekul kecil dengan dialisis melalui membran semi permeabel seperti membran selulosa yang berpori. Molekul dengan ukuran yang lebih besar dari diameter pori akan tertahan dalam kantong dialisis, sedangkan molekul kecil dan ion dapat melewati pori membran keluar dari kantong dialisis (Stryer, 1996).

Mekanisme proses dialisis ini adalah, pertama-tama protein dapat dipisahkan dari senyawa dengan BM rendah yang ada di dalam ekstrak sel atau

jaringan dengan proses dialisis. Molekul besar seperti protein ditahan di dalam kantung terbuat dari senyawa berpori amat halus seperti selopan. Jadi jika kantung yang mengandung ekstrak sel atau jaringan dimasukkan ke dalam air, molekul kecil di dalam ekstrak jaringan, seperti garam akan melalui pori-pori tetapi protein dengan berat molekul tinggi akan tertahan di dalam kantung. Setelah campuran protein dibebaskan dari molekul kecil oleh dialisis, protein dapat dipisahkan berdasarkan ukuran melalui elektroforesis (Lehninger, 1997). Mekanisme dialisis bias dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 5. Mekanisme Proses Dialisis

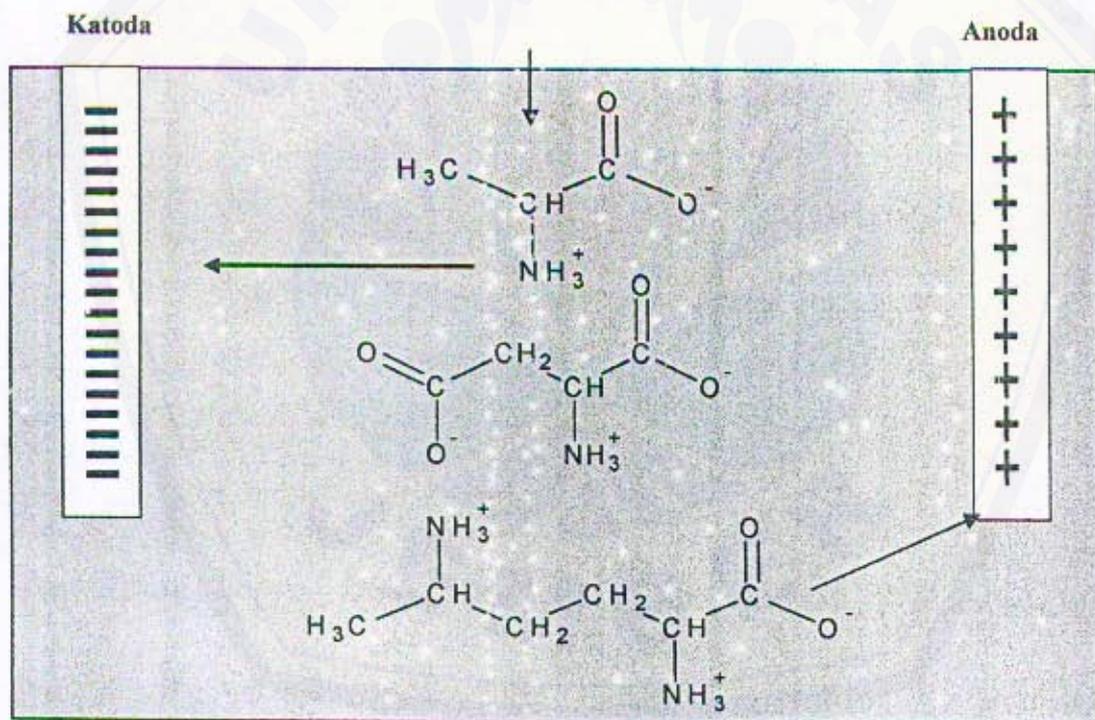
Membran dialisis ini dikomersialkan dalam bentuk roll (gulungan) dengan diameter dan penyaring berat molekul yang berbeda. Semakin besar ukuran saringan berat molekul pada membran maka akan semakin cepat larutan molekul kecil keluar dari membran. Sebelum penggunaan kantung dialisis terlebih dulu dilakukan hidrasi dengan tujuan untuk memberikan fleksibilitas. Sampel protein dimasukkan dalam kantung dialisis yang sebelumnya salah satu ujung kantung dialisis telah diikat (disegel) dan diikuti dengan ujung yang lainnya. Selanjutnya kantung dialisis ditempatkan dalam larutan buffer pada suhu 4°C selama 12-24 jam. Seiring dengan waktu, molekul kecil dapat melewati pori-pori kantung dialisis hingga tercapai kesetimbangan antara pelarut diluar dan didalam (Copeland, 1994).

2.7 Elektroforesis

Elektroforesis adalah proses pemisahan ion dan partikel netral berdasarkan ada atau tidaknya daya tarik dari partikel-partikel ini ke arah elektroda pada pH larutan tertentu. Bila sepasang elektroda ditempatkan dalam larutan asam amino, Kation (muatan positif) dari asam amino tersebut akan bergerak ke arah katoda yang bermuatan negative dan anion (negative) dari asam amino akan bergerak ke arah anoda yang bermuatan positif. Sedangkan ion dipolar pada titik isoelektriknya netral sehingga tak bergerak ke arah katoda maupun anoda.

Gambar 6. melukiskan bagaimana elektroforesis memisahkan asam-asam amino.

Ion dipolar yang netral tidak bergerak



Gambar 6. Elektroforesis adalah proses pemisahan partikel bermuatan dan yang netral dengan cara menarik partikel-partikel tersebut oleh elektroda dalam larutan. (Fressenden dan Fressenden, 1997).

Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk mendapatkan kemurnian protein dari sampel, berat molekul dan kadang kala titik iso elektrik. Metode yang sering digunakan dalam elektroforesis ini adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).

Dasar dari metode ini adalah perpindahan molekul yang bergerak pada arus listrik dengan kecepatan yang dibatasi oleh ukuran dan suplai listrik. Polimer akrilamida yang berbentuk lembaran bertindak sebagai pembawa pergerakan molekul (Copeland, 1994). Penggunaan gel sebagai elektroforesis disebabkan dua alasan, pertama gel mengurangi arus listrik yang timbul akibat perbedaan suhu yang kecil, yang diperlukan agar pemisahan menjadi efektif. Kedua, gel bertindak sebagai saringan molekul yang meningkatkan pemisahan. Molekul yang lebih kecil lebih mudah bergerak di dalam gel sedangkan molekul yang lebih besar hampir tidak bergerak (Stryer, 1996).

Polyacrilamide merupakan polimer yang umum digunakan untuk gel elektroforesis protein. Gel tersusun dari polimer acrylamide yang bebas arus listrik. Berat molekul didapat dari SDS-PAGE yang tertahan pada pori-pori polimer gel. Banyaknya acrylamide yang digunakan akan memberikan kisaran berat molekul terhadap fraksi sampel (Copeland, 1994)

Tabel 4. Banyaknya acrylamide yang digunakan untuk penentuan berat molekul protein dengan SDS-PAGE

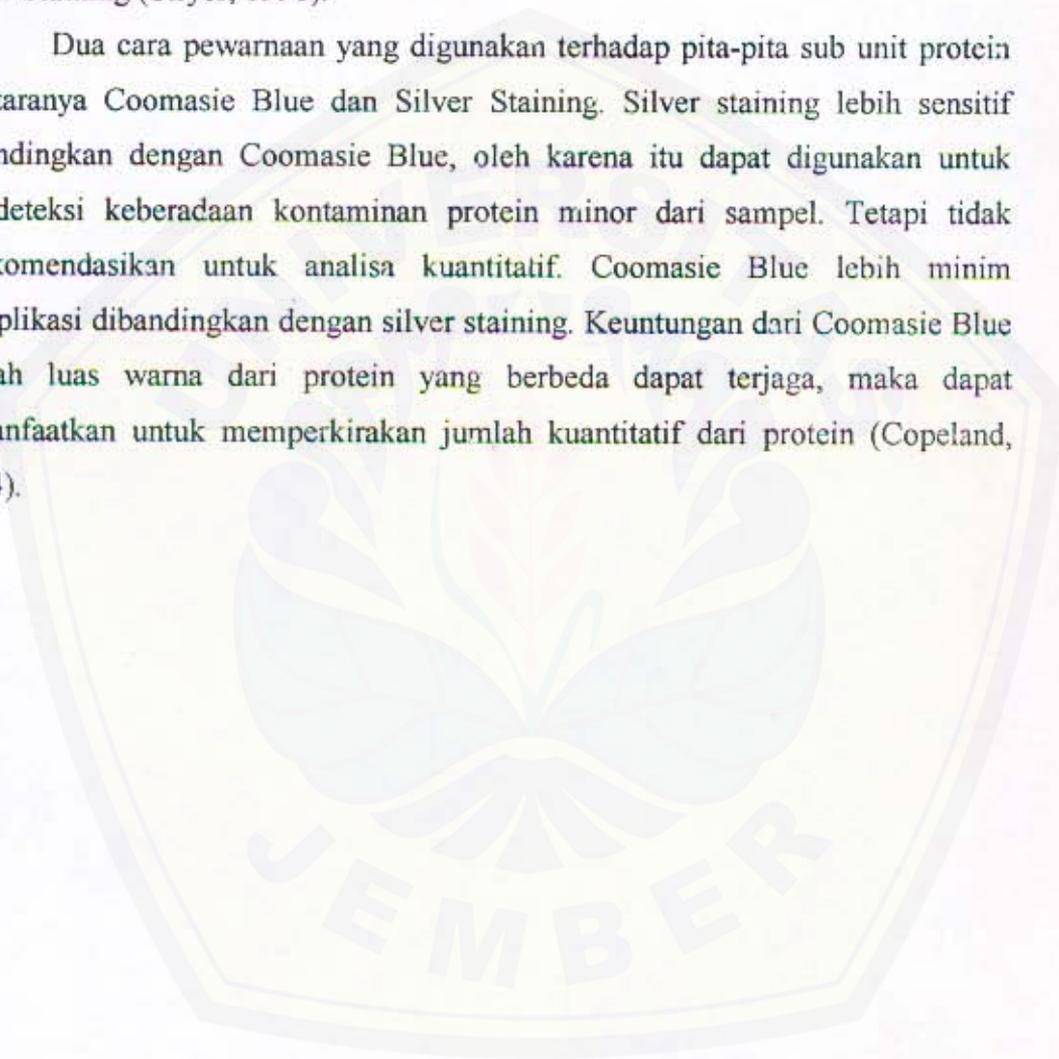
Kisaran Berat Molekul Protein	Penggunaan Acrylamide
200000 – 60000	5,0 %
120000 – 30000	7.5 %
75000 – 18000	10,0 %
60000 – 15000	12,5 %
45000 – 12000	15.0 %

Sumber : Copeland, 1994

Sebelum arus listrik dijalankan, protein didenaturasi (*unfolding*) dengan pemanasan sehingga dapat terpisah massanya dengan elektroforesis gel poliakrilamida. Campuran protein mula-mula dilarutkan dalam SDS, suatu detergen anionik yang akan memutus hampir semua interaksi kovalen dalam protein alami. Anion SDS akan berikatan pada rantai utama dengan perbandingan 1 SDS untuk setiap residu asam amino, sehingga terbentuk kompleks antara SDS dan protein yang terdenaturasi bermuatan negatif yang secara kasar sebanding

dengan massa protein. Muatan negatif akibat pengikatan SDS ini umumnya lebih besar daripada muatan protein alami, sehingga muatan protein alami menjadi tidak penting lagi. Arah elektroforesis dari atas ke bawah. Setelah terjadi pemisahan, protein dalam gel dapat diperlihatkan dengan pewarnaan Coomasie Blue atau Silver Staining (Stryer, 1996).

Dua cara pewarnaan yang digunakan terhadap pita-pita sub unit protein diantaranya Coomasie Blue dan Silver Staining. Silver staining lebih sensitif dibandingkan dengan Coomasie Blue, oleh karena itu dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan kontaminan protein minor dari sampel. Tetapi tidak direkomendasikan untuk analisa kuantitatif. Coomasie Blue lebih minim komplikasi dibandingkan dengan silver staining. Keuntungan dari Coomasie Blue adalah luas warna dari protein yang berbeda dapat terjaga, maka dapat dimanfaatkan untuk memperkirakan jumlah kuantitatif dari protein (Copeland, 1994).





III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah koro kratok (*Phaseolus lunatus L*) putih yang diperoleh dari desa Cerme, Kecamatan Cerme, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian berasal dari Jerman dengan merk *Merck* ini adalah BaSO₄, Tris HCl buffer 0,3 M pH 8, HCl 0,1 N, NaCl 5%, , etanol 70%, NaOH 0,5 N, NaOH 2N, folin 1 N, mix Lowry, 2-merkaptotanol, buffer elektroforesis, stacking gel, coomasie blue staining dan destaining, resolving gel.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: peralatan gelas yang menggunakan merk Pyrex, magnetic stirer (SM 24 Stuart Scientific), batang stirer, freeze dryer (Snijders Scientific), vortex (type 16700 mixer, maxi-mix 1), refrigerated sentrifuge (Selecta), membran dialisis dan penjepitnya, penangas air (Cimerec 2), timbangan analitis (Ohaus), pompa vacum, sentrifuge kecil (Kurabo), pH meter (Jenway), peralatan elektroforesis (Bio-Rad), colour reader dan mikrometer.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pengendalian Mutu Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus 2004.

3.3 Persiapan Bahan

Biji koro kratok putih dilakukan sortasi terlebih dulu antara biji yang masih baik dan jelek dan juga dipisahkan berdasarkan warna putih dan merah. Biji yang sudah disortasi kemudian diblender hingga halus. Setelah diblender kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan 70 mesh. Tepung koro kratok

putih yang dihasilkan kemudian dimasukkan dalam plastik dan disimpan dalam eksikator.

3.4 Rancangan Percobaan

Data yang diperoleh dari pengukuran sifat fisik yang meliputi berat, tebal, lebar, panjang, luas permukaan, volume, BDD (Bagian yang Dapat Dimakan), ketebalan kulit biji, dan warna, serta pengukuran sifat khemis yang meliputi kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein kasar, kadar pati, kadar serat dan total gula diuji menggunakan uji deskriptif kemudian data ditabulasikan dengan standar deviasi.

Data yang diperoleh dari fraksinasi protein berupa albumin, globulin, globulin 7S dan 11S yang dielektroforesis ditampilkan dalam bentuk gambar.

3.5 Pengukuran Sifat Fisik

Karakteristik yang diamati pada biji koro kratok putih meliputi berat biji, tebal biji, panjang biji, lebar biji, luas penampang biji, volume biji, Bagian yang Dapat Dimakan (BDD), ketebalan kulit biji dan warna.

3.5.1 Sifat Berat, Tebal, Lebar dan Panjang Biji

Pengukuran sifat berat, tebal, lebar dan panjang biji dari biji kratok putih dilakukan dengan menggunakan jangka sorong untuk karakter tebal, panjang dan lebar biji. Sedangkan untuk pengukuran berat biji dilakukan dengan menggunakan neraca analitis. Pengambilan sample satu biji koro kratok putih dilakukan secara acak

3.5.2 Luas Penampang Biji (Andrew, 2004)

Pengukuran luas penampang biji koro kratok putih dilakukan dengan menggunakan standar pembanding berupa kertas. Kertas HVS dipotong dengan variasi luasan tertentu yaitu 1 cm^2 , 4 cm^2 , 9 cm^2 , 16 cm^2 , dan 25 cm^2 . Potongan kertas HVS dengan luasan tertentu tersebut dilakukan sebanyak 5 kali ulangan untuk diketahui beratnya. Kurva standar dibuat dengan memplotkan luas penampang sebagai sumbu Y dan berat kertas sebagai sumbu X. Pengukuran luas penampang biji dilakukan dengan menggambar ke-10 biji koro yang diambil

secara acak diatas kertas HVS yang sama dengan standar yang telah dibuat. Hasil gambaran kemudian ditimbang untuk diketahui beratnya. Luas penampang biji koro kratok putih dapat diperoleh dengan memasukkan hasil rata-rata dari ke-10 biji kratok yang dipilih secara acak ke dalam kurva standar yang telah dibuat.

3.5.3 Volume (Andrew, 2004)

Pengukuran volume biji koro kratok putih dilakukan dengan memasukkan 10 biji koro satu persatu kedalam pipa erlenmeyer berpipa yang telah diisi air. Tetesan air yang keluar dari pipa erlenmeyer ditampung dalam wadah kosong yang sudah ditimbang beratnya. Wadah penampung dan air tetesan kemudian ditimbang untuk diketahui beratnya sehingga dapat digunakan untuk mencari berat air dari 10 biji koro. Volume biji koro sama dengan volume luberan air dari 10 biji koro yang diambil secara acak. Berat jenis air diketahui 0,9971 g/ml, sehingga volume air dapat dicari dengan rumus :

$$V = \frac{m}{BJ}$$

dimana

V = volume air

M = berat

BJ = berat jenis air (0,9971 g/ml)

3.5.4 BDD (Bagian yang Dapat Dimakan) (Andrew, 2004)

Pengukuran BDD dari biji kratok putih dilakukan secara acak dari 10 biji. Biji yang telah dikupas kulitnya kemudian ditimbang kulitnya (a gram) dan biji tanpa kulit (b gram). BDD dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$BDD = \frac{b}{a+b} \times 100\%$$

3.5.5 Ketebalan Kulit (Andrew, 2004)

Ketebalan kulit diukur dengan menggunakan mikrometer dari 10 biji koro secara acak. Kacang koro yang diambil secara acak tersebut dikupas kuitnya dengan menggunakan pisau, diusahakan kulit terkelupas secara utuh, kulit yang terkelupas diukur ketebalannya dengan menggunakan mikrometer.

3.5.6 Warna (Subagio dkk, 2002)

Pengukuran warna dilakukan dengan bantuan alat colour reader. Sebelum digunakan colour reader terlebih dulu distandarisasi dengan porselin yang mempunyai nilai $L^* = 94,35$, $a^* = -5,75$ dan $b^* = 6,51$. Pengukuran warna dilakukan dengan menempelkan colour reader pada biji koro yang ditumpuk di atas kertas putih. Pengambilan titik yang berbeda sebanyak 10 kali ulangan dan di rata-rata, sehingga didapatkan dL , da dan db . Pengolahan data dilakukan dengan rumus :

$$c^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$H = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

Parameter warna yang diamati

- Nilai dari L^* menunjukkan kecerahan dan jarak dari gelap = 0 sampai terang =100.
- Nilai $a^* = 0$ dan $b^* = 0$ menunjukkan warna abu-abu/achromatic. Pada sumbu horizontal (+) a^* menunjukkan warna merah keunguan dan (-) a^* menunjukkan warna hijau kebiruan. Pada sumbu vertical (+) b^* menunjukkan warna kuning dan (-) b^* menunjukkan warna biru.
- Nilai dari sudut warna $H = \tan^{-1} (b^*/a^*)$ menunjukkan warna sample dimana sudut warna 0° tepat untuk warna merah, 90° warna kuning, 180° warna hijau dan 270° warna biru.
- Nilai c^* adalah untuk metric dimana $c^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$ dan menunjukkan nilai intensitas warna.

3.6 Pengukuran Sifat Kimia

Sifat kimia yang diamati dari biji koro kratok manik meliputi kadar karbohidrat, kadar protein, kadar lemak, kadar air dan kadar abu.

3.6.1 Kadar Karbohidrat

Kadar karbohidrat diukur berdasarkan metode *By Difference*. Metode ini dilakukan dengan menghitung semua kadar senyawa organik yang ada, selain

karbohidrat dalam koro kratok putih. Kadar karbohidrat dihitung dengan melihat selisih antara jumlah kadar senyawa organik dengan kadar total (100%).

Kadar karbohidrat (%) = 100% - (jumlah kadar protein, lemak, abu dan air)

3.6.2 Kadar Protein (Sudarmadji, dkk, 1997)

Pengukuran kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode mikro-kjeldahl. Tepung koro ditimbang sebanyak 0,5 gram, dimasukkan ke dalam labu kjeldahl dan ditambahkan $1,9 \pm 0,1$ gram K_2SO_4 ; 40 mg HgO ; $2 \pm 0,1$ ml H_2SO_4 . Sample dididihkan selama 1,5 jam sampai warna cairan jernih (diberi batu didih). Labu didinginkan, ditambah dengan aquadest perlahan-lahan (labu menjadi panas) dan didinginkan kembali. Sample dipindahkan ke dalam alat destilasi, dicuci dan dibilas 5-6 kali dengan aquades. Erlenmeyer yang berisi 5 ml asam borat jenuh dan indikator diletakkan dibawah kondensor. Ujung kondensor harus tercelup dalam asam borat jenuh. 8-10 ml larutan $NaOH-Na_2S_2O_3$ ditambahkan dan dilakukan destilasi hingga tertampung kira-kira 15 ml destilat. Bilas tabung kondensor dengan aquades dan tampung air bilasan dalam erlenmeyer. Hasil destilasi dititrasi dengan HCl 0,02 N yang distandarisasi sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu. Penetapan blanko dilakukan dengan mengganti sample dengan aquades.

Protein (%) = %N x faktor konversi

%N = [(titer sample-blanko) x N HCl x 14,08]/berat sample]

3.6.3 Kadar Lemak (Woodman, 1941 dan Sudarmadji, dkk, 1997)

Pengukuran kadar lemak dilakukan dengan menggunakan metode soxlet yang dimodifikasi. Tepung koro ditimbang sebanyak a gram dalam kertas saring sesuai kebutuhan, kemudian dibungkus dan dilipat cukup kuat dengan benang. Tepung koro yang terbungkus, dioven pada suhu $60^{\circ}C$ beberapa lama dan dimasukkan dalam eksikator selama 30 menit. Sample ditimbang (b gram) dan selanjutnya dimasukkan dalam tabung ekstraksi soxlet 500 ml yang sudah terpasang di penangas listrik dengan pendinginnya. Labu diisi larutan pengestrak berupa petroleum benzena. Setelah semua siap, penangas dan pendingin air dihidupkan. Jumlah sirkulasi pelarut yang digunakan sesuai dengan perlakuan (3-4 jam). Setelah ekstraksi selesai, sample dikeluarkan dari tabung ekstraksi dan

dikeringkan dalam oven 60°C hingga pelarut menguap. Sample yang telah kering dimasukkan dalam eksikator selama 30 menit dan ditimbang. Penimbangan dan pengovenan dilakukan beberapa kali hingga berat konstan (c gram).

$$\text{Kadar lemak} = \frac{b - c}{a} \times 100\%$$

3.6.4 Kadar Air (AOAC 1970, Ranganana, 1979 dalam Sudarmadji, dkk, 1997)

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara termogravimetri. Botol timbang yang bersih dan kering ditimbang beratnya (a gram). Tepung koro dimasukkan dalam botol timbang dan ditimbang berat (b gram). Tepung koro dioven minimal selama 6 jam dengan suhu oven 100°C. Sample dimasukkan dalam eksikator untuk mendinginkan dan ditimbang beratnya (c gram), pengovenan dan penimbangan dilakukan hingga berat konstan.

$$\text{Kadar air} = \frac{b - c}{b - a} \times 100\%$$

3.6.5 Kadar Abu (Sudarmadji, dkk, 1997)

Krus porselin dikeringkan dalam oven selama 15 menit, didinginkan dalam eksikator selama 15 menit dan ditimbang beratnya (a gram). Tepung koro dimasukkan dalam krus porselin dan ditimbang beratnya (b gram). Pijarkan dalam tanur pengabuan pada suhu 400°C sampai mengeluarkan asap. Setelah asap habis, naikkan suhu menjadi 550°C dan pijarkan selama 3 jam. Dinginkan krus dalam tanur semalaman dan masukkan dalam eksikator selama 15 menit. Timbang krus porselin (c gram), ulangi hingga berat konstan.

$$\text{Kadar abu} = \frac{c - a}{b - a} \times 100\%$$

3.6.6 Kadar Pati (Direct Acid Hydrolysis Method; AOAC, 1970 dalam Sudarmadji, dkk, 1997)

Timbang 2 g tepung koro kratok putih, tambahkan 50 ml aquades dan aduk selama 1 jam. Suspensi di saring dengan kertas saring dan di cuci dengan aquades sampai volume filtrat 250 ml. Filtrat ini mengandung karbohidrat yang terlarut dan dibuang. Cuci residu yang tertinggal di kertas saring dengan 10 ml

dietil ether dan 150 ml alcohol 10% (gunakan pompa vacum untuk lebih mudah penyaringannya).

Residu dipindahkan secara kuantitatif dari kertas saring ke dalam erlenmeyer dengan pencucian 200 ml aquades dan tambahkan 20 ml HCl ± 25% (berat jenis 1,125), tutup dengan pendingin balik dan panaskan di atas penangas air mendidih selama 2,5 jam.

Setelah dingin netralkan dengan larutan NaOH 45% dan tera sampai volume 500 ml, kemudian disaring. Tentukan kadar gula yang dinyatakan sebagai glukosa dari filtrat yang diperoleh. Penentuan glukosa seperti pada penentuan gula reduksi. Berat glukosa dikalikan 0,9 merupakan berat pati.

3.6.7 Kadar Serat (Sudarmadji, dkk, 1997)

Timbang 2 g tepung koro dan ekstraksi lemaknya dengan soxhlet. Pindahkan bahan ke dalam erlenmeyer 600 ml. Tambahkan 200 ml H₂SO₄ mendidih (1,25 g H₂SO₄ pekat/100 ml = 0,25 N H₂SO₄) dan tutuplah dengan pendingin balik, dididihkan selama 30 menit. Saring suspensi dengan kertas saring dan residu yang tertinggal dalam erlenmeyer dicuci dengan aquades mendidih. Cucilah residu dalam kertas saring sampai air cucian tidak bersifat asam lagi (uji dengan kertas lakmus).

Pindahkan secara kuantitatif residu dari kertas saring ke dalam erlenmeyer kembali dengan spatula, dan sisanya dicuci dengan larutan NaOH mendidih (1,25 g NaOH/100 ml = 0,313 N NaOH) sebanyak 200 ml sampai semua residu masuk ke dalam erlenmeyer. Dididihkan dengan pendingin balik selama 30 menit.

Saringlah melalui kertas saring yang diketahui beratnya, sambil dicuci dengan 10 ml larutan K₂SO₄ 10%. Cuci lagi residu dengan aquades mendidih dan kemudian dengan lebih kurang 15 ml alcohol 95%. Keringkan kertas saring pada 110°C sampai berat konstan (1-2 jam), dinginkan dalam eksikator dan timbang.

Berat residu = berat serat kasar

3.6.8 Total Gula (Sudarmadji, dkk, 1997)

Ambil 50 ml filtrat bebas Pb dan tuang ke dalam labu takar 100 ml, tambahkan 20 ml aquades dan 10 ml larutan HCl 6,67%, gojog. Inversi dikerjakan

dengan inkubasi dalam penangas air suhu 60°C sambil di goyang selama 3 menit dan selanjutnya tetap biarkan dalam penangas selama 7 menit. Dinginkan cepat-cepat sampai suhu 20°C .

Tambahkan beberapa tetes indikator PP 1%, netralkan dengan larutan NaOH 20% sampai timbul warna merah. Tambahkan tetes demi tetes larutan 0,5N HCl sampai warna merah tepat hilang, akhirnya encerkan sampai volume tertentu. Hitung kadar gula sesudah inversi dengan cara sama pada penentuan gula reduksi.

Total gula = Selisih antara kadar gula sebelum inversi dengan sesudah inversi

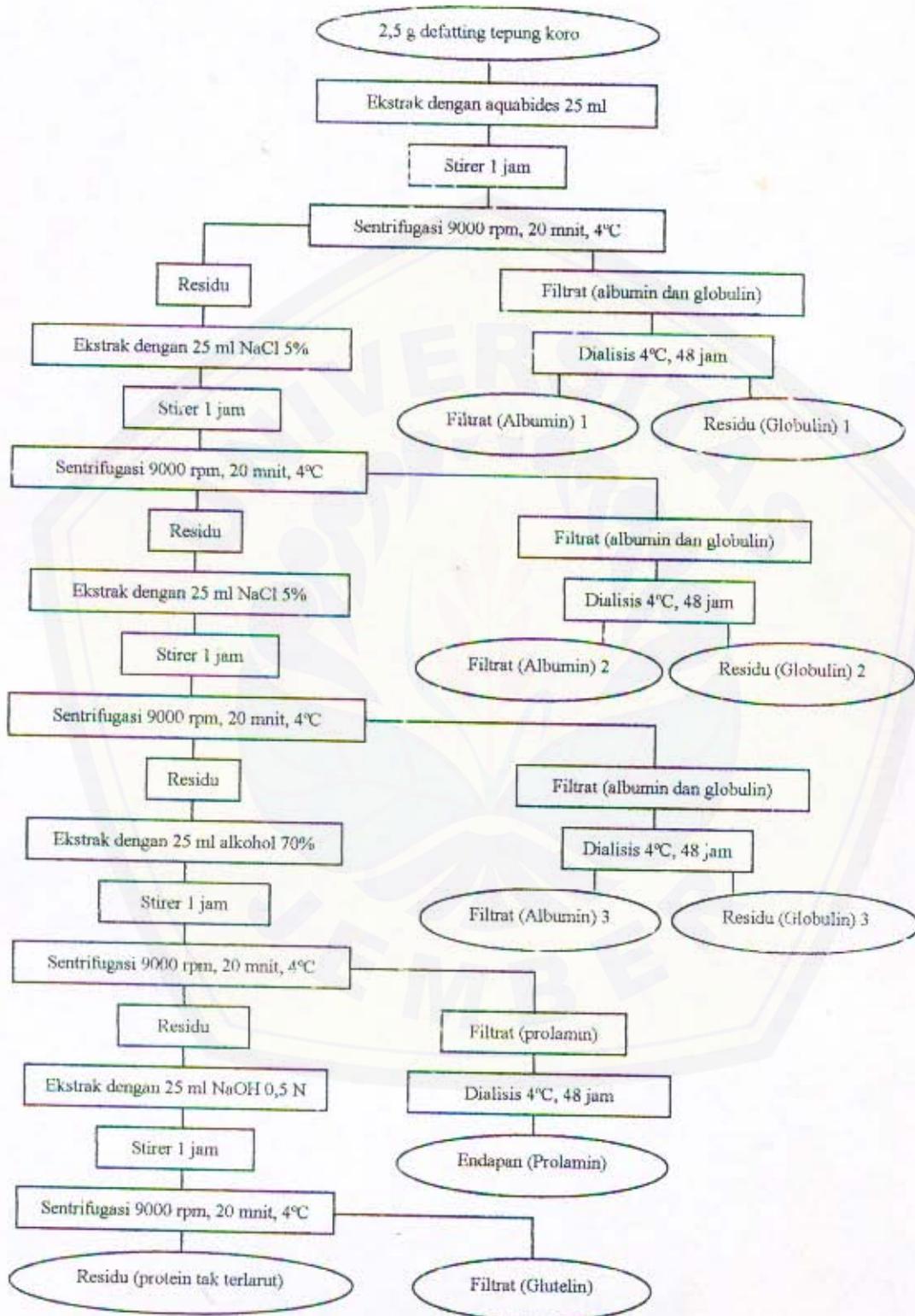
3.7 Fraksinasi Protein Berdasarkan Daya Kelarutan

Protein koro kratok putih dapat digolongkan menjadi empat golongan protein sederhana yaitu albumin, globulin, prolamin, dan glutelin. Empat protein sederhana ini dapat dipisahkan berdasarkan sifat kelarutannya terhadap pelarut. Fraksinasi protein ini dilakukan berdasarkan metode Osborne yang dimodifikasi (Bonvehi, 1999).

Tepung koro yang bebas lemak (2,5 gram) diekstrak dengan 25 ml aquadest dan distirer selama 1 jam. Suspensi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Filtrat yang dihasilkan kemudian dipisahkan dari residunya. Filtrat yang terdiri dari albumin dan globulin didialisis dengan membran dialisis selama 48 jam dengan suhu 4°C . Hasil dialisis kemudian dipisahkan antara albumin dan globulin dengan sentrifuge dengan kecepatan 9000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Endapan yang diperoleh merupakan fraksi albumin sedangkan supernatannya merupakan fraksi globulin. Residu dari filtrat albumin dan globulin diekstrak lagi dengan NaCl 5 % sebanyak 25 ml dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 9000 rpm, 20 menit, 4°C . supernatan yang diperoleh kemudian didialisis dengan suhu 4°C untuk mendapatkan fraksi albumin dan globulin. Kemudian konsentrasi albumin dan globulin didapatkan dari total albumin dan globulin. Endapan dari ekstraksi NaCl 5 % dilarutkan dalam alkohol 70% dan distirer selama 1 jam. Suspensi kemudian disentrifuge dengan kecepatan 9000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan prolamine yang dimurnikan dengan membran dialisis

selama 48 jam, suhu 4°C . Endapan yang dihasilkan dari dialisis merupakan prolamin murni. Residu dari filtrat prolamine diekstrak lagi dengan 25 ml NaOH 0,5 N dan distirer selama 1 jam. Suspensi kemudian disentrifuge dengan kecepatan 9000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan glutelin yang dimurnikan dengan membran dialisis sedangkan residunya merupakan protein tak larut. Masing-masing fraksi protein kemudian dikeringkan dengan *freeze drier* dan untuk mengetahui konsentrasinya dapat dilakukan dengan metode Lowry (Sudarmadji, dkk, 1997). Diagram alir fraksinasi protein berdasarkan kelarutan terlihat pada **Gambar 7**.



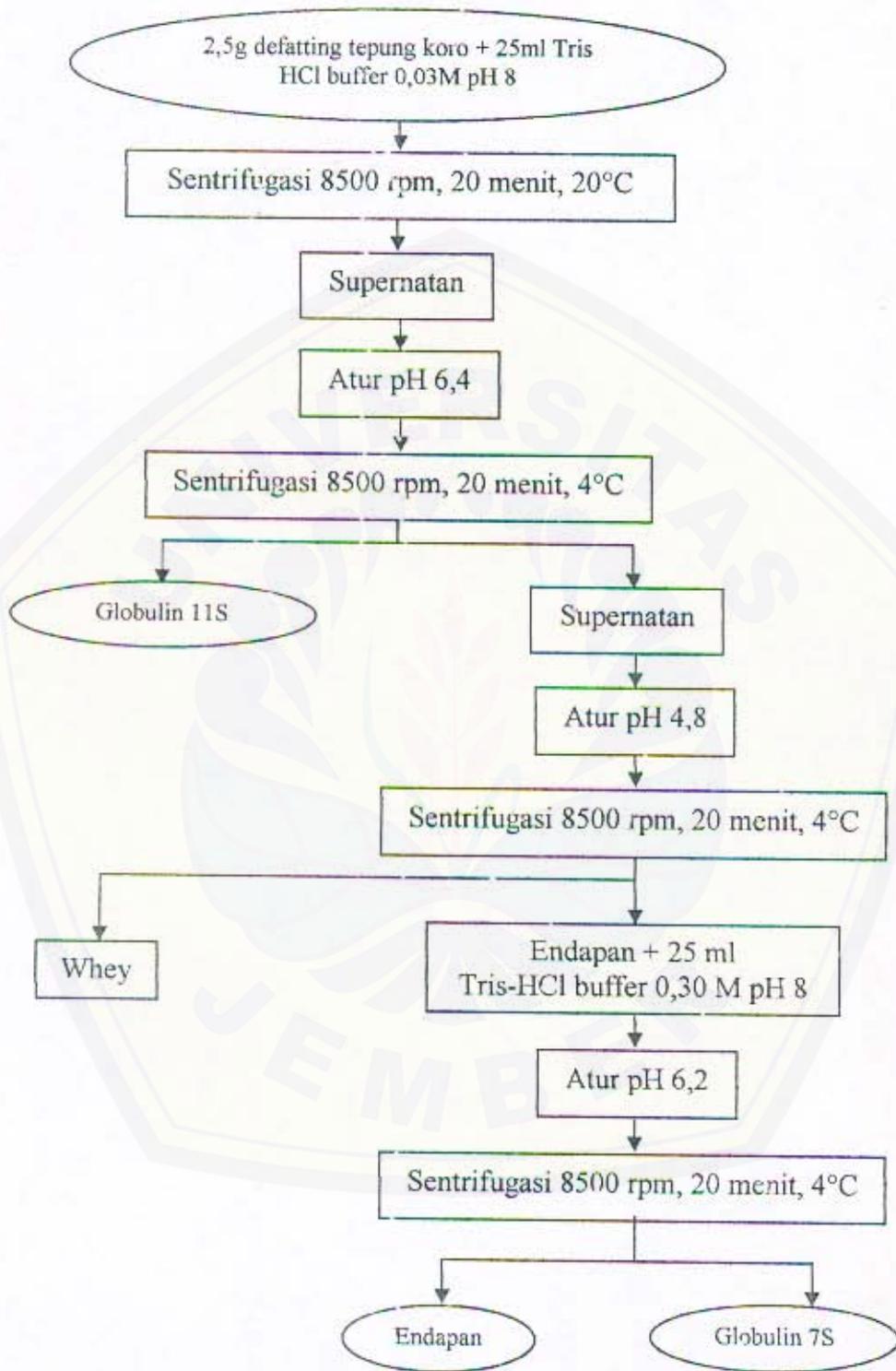


Gambar 7. Diagram Alir Fraksinasi Protein Koro Kratok (*Phaseolus lunatus L. Sweet*)

3.8 Fraksinasi Globulin 7S dan Globulin 11S

Fraksinasi globulin 7S dan globulin 11S dilakukan berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Tanh dan Shibasaki (1976). Metode ini didasarkan pada perbedaan kelarutan dari globulin yang dilarutkan pada Tris (Hydroxymethyl) aminomethane buffer pada pH 6,6. Globulin 11S mengendap pada pH 6,4 sedangkan globulin 7S mengendap pada pH 4,8.

Tepung koro bebas lemak sebanyak 2,5 gram diekstrak dengan 0,03 M buffer Tris HCl pH 8,0 yang mengandung 0,3 M merkaptoetanol pada suhu ruang selama 1 jam. Suspensi kemudian disentrifuge dengan kecepatan 9000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh kemudian diatur pH-nya sampai 6,4 dengan HCl 0,1 N dan distirer, diamkan semalam dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C. Suspensi kemudian disentrifuge dengan kecepatan 9000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Endapan yang diperoleh fraksi globulin 11S. Filtrat yang diperoleh kemudian diatur pH-nya sampai 4,8 dengan HCl 0,1 N dan disentrifuge lagi dengan kecepatan 9000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Endapan yang diperoleh diekstrak lagi dengan 25 ml Tris HCl pH 8,0 yang mengandung 0,3 M merkaptoetanol. Suspensi kemudian diatur pH-nya dengan HCl 0,1 N sampai pH 6,2 dan disentrifuge dengan kecepatan 9000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit. Filtrat yang dihasilkan merupakan fraksi globulin 7S. Masing-masing fraksi kemudian dikeringkan dengan *freeze drier* selama 48 jam. Pengukuran konsentrasi fraksi globulin 11S dan globulin 7S dilakukan dengan metode Lowry. Diagram alir fraksinasi berdasarkan sedimentasi terlihat pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Diagram Alir Fraksinasi Protein Globulin 7S dan 11S

3. 9 Kadar Protein Terlarut (Metode Lowry, Sudarmadji dkk, 1997)

Protein dengan asam fosfotungstat-fosfomolibdat pada suasana alkalis akan memberikan warna biru yang intensitasnya bergantung pada konsentrasi protein yang ditera. Konsentrasi protein diukur berdasarkan optik density pada panjang gelombang 750 nm. Untuk mengetahui banyaknya protein dalam larutan, lebih dahulu dibuat kurva standart yang melukiskan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi. Cara penentuannya adalah sebagai berikut: 250 μL sampel tambahkan dengan 250 μL NaOH 2N. Dilakukan pemanasan untuk mendenaturasi atau memecah ikatan protein dalam sampel selama 10 menit kemudian didinginkan. Tambahkan mix Lowry 2500 μL dan diamkan selama 10 menit. Tambahkan 250 μL folin 1N dan vortex kemudian diamkan selama 30 menit. Tambahkan aquadest sebanyak 1750 μL (volume keseluruhan harus 5000 μL) selanjutnya amati absorbansi pada panjang gelombang 750 nm. Secara lengkap urutannya sebagaimana terlihat pada **Gambar 9**.



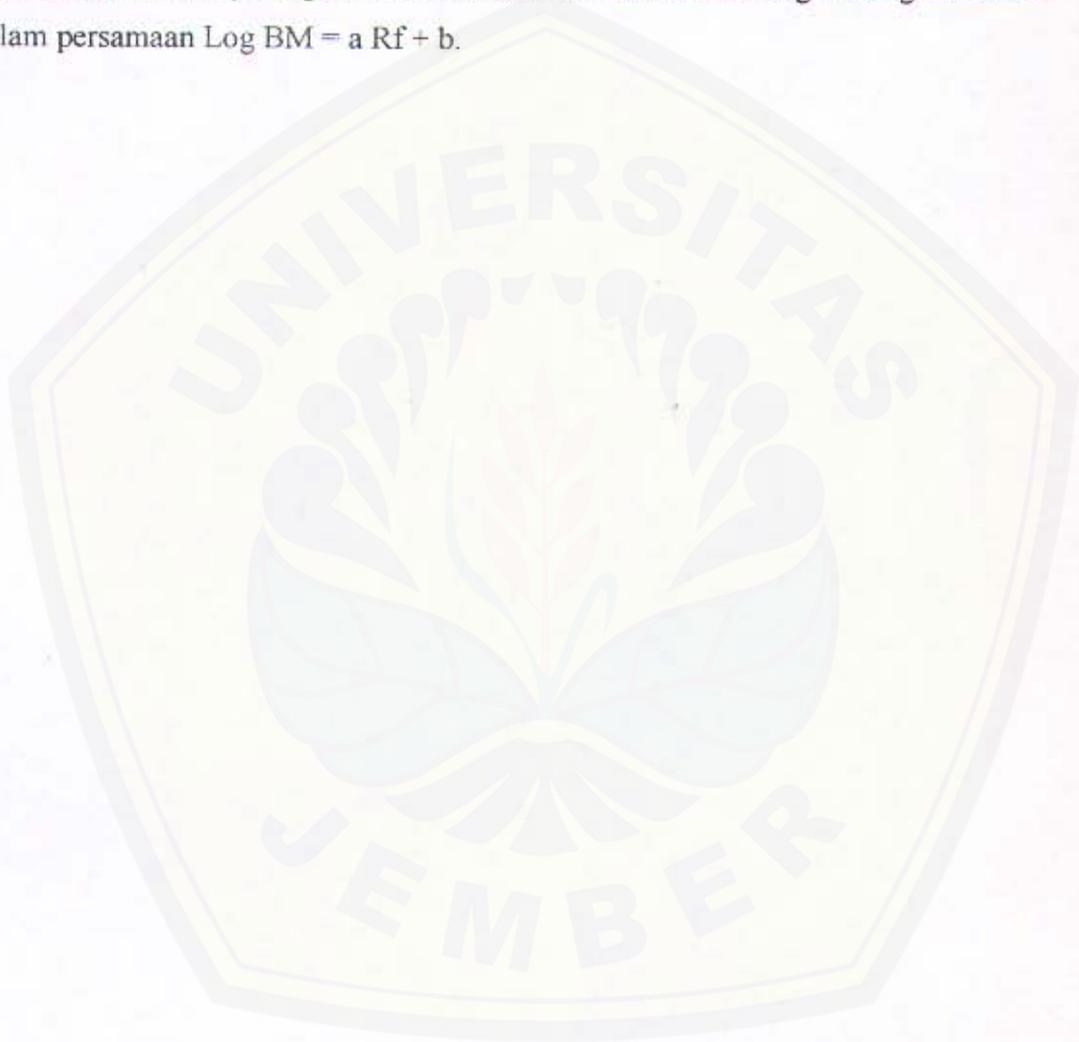
Gambar 9. Diagram Alir Penentuan Kadar Protein Terlarut dengan Metode Lowry

3.10 Elektroforesis (Andrew, 2004)

Analisa protein sederhana dan fraksi globulin 7S dan 11S dilakukan dengan elektroforesis SDS-PAGE pada gel poliakrilamida yang terdiri dari resolving gel dan stacking gel. Pembuatan resolving gel dilakukan dengan mencampur 1,67 ml aquades; 1,25 ml Tris-HCL 1,5 M pH 8,8; 0,05 ml SDS 10%; 2 ml acrylamide kemudian dilakukan aerasi untuk mengeluarkan udara. Setelah aerasi, larutan gel ditambah dengan 50 μ l TEMED. Larutan yang tercampur segera disuntikkan diantara dua lempengan kaca berukuran 10 x 10 cm, dan di atasnya diberi aquades untuk meratakan permukaan gel. Aquades diambil kembali setelah gel terbentuk. Stacking gel dibuat dengan mencampur 1,525 ml SDS 10% kemudian dilakukan aerasi untuk mengeluarkan udara. Larutan kemudian ditambah dengan 50 μ l ammonium persulfat 10% dan 5 μ l TEMED. Larutan gel dimasukkan dan sisir diletakkan diatas gel untuk membentuk sumur di bagian atas gel. Sisir dilepaskan jika gel telah terbentuk.

Protein yang akan dianalisa dengan elektroforesis SDS-PAGE perlu dilakukan pengukuran kadar protein dengan metode lowry dengan tujuan untuk mengetahui volume pengenceran dari protein keringnya. Protein kemudian diberi pelarut Tris-HCl buffer 0,030M yang mengandung 0,01M-2 merkaptotanol pH 8,00 sesuai dengan perhitungan sebelumnya. Protein yang sudah diencerkan perlu dilakukan pengukuran kembali dengan metode lowry untuk menentukan volume penyuntikan dalam sumur gel. Persiapan sampel untuk elektroforesis dilakukan dengan mencampur protein dengan buffer sampel dengan perhitungan 1:7 (atau sesuai dengan kebutuhan). Pemanasan sampel pada suhu 100°C perlu dilakukan selama 10 menit dengan tujuan untuk memecah struktur tiga dimensi dari protein. Elektroforesis dilakukan setelah sampel disuntikkan dengan menggunakan syringe ke dalam sumur dan dirunning pada 100 mA selama kurang lebih 1,5 jam. Pembacaan protein dilakukan dengan mewarnai protein memakai larutan coomassie bluestaining gel. Hasil pewarnaan kemudian dicuci dengan coomassie gel destain selama satu malam dengan tujuan mmebersihkan pewarnaan yang berlebihan.

Berat molekul dari protein dapat dihitung dengan menggunakan persamaan standart dari marker. Persamaan standart didapatkan berdasarkan hubungan antara log BM (Sumbu Y) dan Rf (Sumbu X). Nilai Rf didapatkan dengan membagi jarak tempuh sampel dibagi jarak tempuh pelarut. Berat molekul dari sampel dihitung dengan memasukkan nilai Rf dari masing-masing fraksi ke dalam persamaan $\text{Log BM} = a Rf + b$.





IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sifat Fisik dan Kimia Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) Putih

4.1.1 Sifat Fisik Koro Kratok Putih

Sifat fisik yang diamati disini meliputi tebal biji, lebar biji, panjang biji, berat biji, luas permukaan biji, volume 10 biji, BDD, ketebalan kulit dan warna dari koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih. Data yang diperoleh dari uji sifat fisik koro kratok putih ini diolah dengan menggunakan uji deskriptif yang kemudian ditabulasikan dengan standar deviasi. Hasil perhitungan dari sifat fisik, koro kratok putih disajikan dalam bentuk Tabel 5.

Tabel 5. Sifat Fisik Biji Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) Putih.

Sifat Fisik	Rerata ± Standart Deviasi
Tebal Biji (cm)	0,50 ± 0,16
Lebar Biji (cm)	0,88 ± 0,02
Panjang Biji (cm)	0,88 ± 0,06
Berat Biji (g)	0,43 ± 0,04
Luas Permukaan Biji Koro (cm ²)	1,25 ± 0,22
Volume 10 Biji (ml)	2,14 ± 0,11
BDD (%)	92,35 ± 0,90
Ketebalan Kulit (mm)	0,18 ± 0,03
Warna	L = 73,14 c* = 15,72 H = 97,02° a* = 1,92 b* = 15,6

Koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih mempunyai ciri penampakan fisik antara lain panjang biji rata-rata 0,88 cm, lebar biji rata-rata 0,88 cm. Sedangkan tebal biji rata-rata 0,50 cm dan berat biji rata-

rata 0,43 gram. Dari data tersebut dapat digambarkan bahwa koro kratok putih mempunyai bentuk biji yang bulat memanjang dan agak sintal.

Luas penampang biji rata-rata 1,25 cm dan volume 10 biji rata-rata 2,14 ml. Koro kratok putih mempunyai ketebalan kulit sebesar 0,18 mm sehingga dengan ketebalan kulit yang relatif kecil dengan nilai BDD sebesar 92,35 % menunjukkan bahwa kulit biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih hampir menyatu dengan biji. Nilai BDD yang cukup besar dapat memenuhi kebutuhan pangan untuk manusia terutama protein dan karbohidratnya.

Warna dapat mempengaruhi kenampakan pada komoditas dan berpengaruh pada tingkat penerimaan konsumen. Pada Gambar 4 biji koro kratok putih memiliki warna yang berkisar antara putih dan kuning. Hal ini diperkuat dengan nilai $H = 97,02^\circ$ yang terletak diantara netral dan kuning. Nilai L menunjukkan kecerahan dari obyek, koro kratok putih mempunyai nilai L sebesar 73,14 yang tergolong dalam obyek dengan tingkat kecerahan yang cukup tinggi. Tingkat kecerahan dan intensitas warna yang tinggi merupakan karakter dari koro kratok putih.

Berdasarkan kenampakan fisik dari koro kratok putih (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih tersebut, menunjukkan bahwa koro kratok putih dapat dijadikan sebagai sumber pangan alternatif yang cukup menjanjikan.

4.1.2 Sifat Kimia Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) Putih

Sifat kimia yang diamati meliputi karbohidrat, protein, lemak, kadar air, kadar abu, kadar pati, kadar serat dan total gula. Komposisi kimia koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Kandungan Kimia Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) Putih

Sifat Kimia	Komposisi (%)
Kadar Air	11,23 ± 0,28
Kadar Abu	4,36 ± 0,03
Lemak	1,14 ± 0,19
Protein	16,15 ± 0,24
Karbohidrat	67,12
Serat	1,59 ± 0,27
Pati	61,27 ± 5,45
Total Gula	2,80 ± 0,33

Dilihat dari komposisi kimia koro kratok putih, karbohidrat mempunyai kandungan yang paling tinggi yaitu 67,12 %, dengan komponen penyusun terbesar pati sebesar 61,27 %. Disusul dengan protein 16,15 %, Kadar air 11,23 %, Kadar abu 4,36 dan lemak 1,14%. Kandungan karbohidrat yang cukup tinggi, membuat koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet) varietas kratok putih cukup menjanjikan untuk digunakan sebagai sumber makanan pokok. Kandungan lemak yang cukup rendah memungkinkan orang-orang yang menghindari lemak dapat mengkonsumsinya, selain itu juga dapat digunakan sebagai sumber lemak tidak jenuh (Andrew, 2004). Kandungan protein yang cukup tinggi memungkinkan koro kratok dijadikan alternatif sumber protein nabati. Perbandingan dengan berbagai jenis legume lainnya (dalam persen) dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Kandungan Kimia Koro Lainnya dan Kedelai.

Legume	Karbohidrat	Protein	Lemak	Kadar Air	Kadar Abu
Komak ^{a)}	67,9 ± 4,2	17,1 ± 1,5	1,1 ± 0,4	9,3 ± 0,5	3,6 ± 0,1
Pedang ^{b)}	70,2 ± 4,2	21,7 ± 2,1	4,0 ± 0,3	8,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Kedelai ^{c)}	34,8	34,9	18,1	-	4,9

Sumber: ^{a)} Andrew (2004)

^{b)} Subagio (2003)

^{c)} Koswara (1995)

Dibandingkan dengan jenis koro lain, komposisi kimia dari koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih tidak jauh berbeda. Kandungan karbohidrat, protein dan lemak koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih lebih sedikit dibanding koro lainnya, akan tetapi kadar air dan kadar abunya lebih tinggi dibanding koro lain. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan mineral dari koro kratok putih lebih tinggi dibanding koro lainnya. Jika dibandingkan dengan kedelai, kandungan protein, lemak dan kadar abu koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih lebih sedikit jumlahnya, namun unggul pada kandungan karbohidratnya. Kandungan karbohidrat yang tinggi pada koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih berpotensi jika digunakan sebagai sumber makanan pokok alternatif pengganti beras. Kandungan protein yang cukup tinggi juga berpotensi sebagai sumber alternatif protein nabati baru.

4.2 Fraksinasi Protein Berdasarkan Kelarutan

Hasil fraksinasi protein berdasarkan kelarutannya pada koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih didapatkan 4 jenis protein. Adapun prosentase kadar protein terlarut dari tiap jenis protein tersaji dalam Tabel 8.

Tabel 8. Fraksinasi Protein Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) Putih.

Protein	Kadar (%) per gram sampel
Albumin	5,8206
Globulin	3,36177
NaOH soluble fraksi	5,8125
Prolamin	0,0367

Kadar protein albumin koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih lebih dominan daripada kadar protein globulin. Hal ini senada dengan Aaron dan Harold (1987) bahwa pada kacang-kacangan (*vicia faba*, *Pisum sativum* dan *Phaseolus lunatus* L.) kandungan albuminnya lebih dominan

dibanding globulin yaitu 10-20% dari total protein adalah globulin. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Inggrit (2004) tentang fraksinasi koro kratok manik menunjukkan hal yang sama yakni komponen protein terbesar adalah albumin. Globulin sebagai cadangan utama biji disusun atas dua globulin yaitu legumin dan vicilin. Legumin adalah komponen penyusun utama dari globulin sedangkan vicilin adalah komponen utama kedua dari globulin biji-bijian (Dieckret and dieckret, 1985).

Dengan mengetahui jenis-jenis protein berdasarkan kelarutannya ini akan membantu dalam hal isolasi protein dari koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih. Yang berarti cara isolasi proteinnya harus berdasarkan sifat fisikokimianya seperti kelarutan, titik isoelektriknya dan sifat lainnya yang dapat mempengaruhi cara ekstraksi protein.

4.3 Fraksinasi Globulin 7S dan 11S

Globulin 7S dan 11S diisolasi pada kedelai berdasarkan perbedaan titik isoelektriknya dengan menggunakan metode Tanh dan Shibasaki (1976). Protein memiliki kelarutan terkecil pada titik isoelektriknya, sehingga akan mudah mengendap pada pH tersebut. Fraksi 7S mempunyai titik isoelektrik sebesar 4,8 dan fraksi 11S sebesar 6,4. Tabel 9 menunjukkan kadar protein dari fraksi globulin 7S dan 11S.

Tabel 9. Hasil Fraksinasi Globulin 7S dan 11S Koro Kratok Putih

Jenis Fraksi	Kadar (%) per gram sampel
Globulin 7S	2,28
Globulin 11S	0,55

Kadar protein globulin 7S lebih besar dari globulin 11S. Jika di total, kedua jenis protein tersebut yakni globulin 7S sebesar 2,28% dan globulin 11S sebesar 0,55% hasilnya masih kurang dari total globulin hasil fraksinasi protein berdasarkan kelarutannya yaitu sebesar 3,36%. Hal ini kemungkinan pada saat fraksinasi belum ditemukan secara tepat titik isoelektrik dari globulin 7S dan 11S

koro kratok putih sehingga banyak fraksi globulin 11S maupun 7S yang belum tersedimentasi dengan sempurna. Selain itu pengaruh kecepatan sentrifugasi yang kurang tinggi dapat berpengaruh terhadap pemisahan yang kurang maksimal antara supernatan dan residunya. Kadar protein besarnya 2,84 terhadap total protein globulin sehingga sisanya diduga merupakan globulin 2S dan 15S.

Presentase globulin 7S yang lebih banyak dibandingkan globulin 11S menghasilkan rasio $7S/11S = 4,11$. Rasio dari globulin 7S dan 11S akan menghasilkan sifat fungsional protein seperti kelarutan, *Water Holding Capacity* (WHC), *Oil Holding Capacity* (OHC), daya emulsi, daya buih, sifat gel dan kemampuan mengikat minyak atau lemak. Kandungan protein fraksi 7S yang lebih banyak menyebabkan kelarutan protein koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih lebih tinggi dari kondisi basa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Zayas (1997) yaitu perbedaan sifat kelarutan dari keadaan yang sama dihasilkan dari protein 7S dan 11S, tetapi protein 7S lebih larut dalam kondisi basa dibanding protein 11S. Perbedaan struktur dari globulin 7S dan 11S berperan dalam bervariasinya sifat fungsional makanan yang dihasilkan seperti sifat pembentukan gel (Suhardi, 1989).

Globulin 7S lebih bersifat hidrofobik dibandingkan dengan globulin 11S karena dalam globulin 7S tidak mengandung grup sulfhidril dan kandungan asam amino sulfurnya sangat rendah (Yu dan Damodaran, 1991). Kondisi ini memprediksikan bahwa tingkat *Water Holding Capacity* (WHC) globulin 7S lebih kecil dari globulin 11S. Sebaliknya globulin 11S bersifat lebih hidrofilik daripada globulin 7S sehingga tingkat WHC-nya lebih tinggi. *Oil Holding Capacity* (OHC) globulin 7S dan 11S merupakan kebalikan dari tingkat WHC-nya. Zayas (1997) menyatakan bahwa kemampuan menyimpan air dari protein tanaman dapat digunakan sebagai bahan tambahan makanan dalam memperbaiki kualitas karakter makanan.

Fraksi protein globulin 7S lebih tinggi dari globulin 11S memungkinkan protein koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih mempunyai daya emulsi yang tinggi. Sifat daya emulsi yang lebih baik dari protein globulin 7S berkorelasi dengan tingginya rasio difusi interface dan

dimungkinkan karena ikatan disulfida pada fraksi globulin 11S yang menghambat *unfolding* (denaturasi) dan menurunkan interaksi pada air dan minyak (Zayas, 1997). Kestabilan dari globulin 7S menurun pada titik isoelektrik (pH 4,8) sedangkan pada globulin 11S mengalami penurunan pada pH netral. Tingginya daya emulsi dari protein koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih memungkinkan digunakan sebagai *emulsifier* yang baik. Hal ini berguna sekali apabila diaplikasikan sebagai bahan emulsifier dalam bahan pangan yang membutuhkan pengemulsi, seperti pada pembuatan roti.

Gelasi merupakan proses pembentukan gel antara gugus hidrofobik, interaksi ionik dan ikatan disulfida dari polipeptida yang tidak berlipat. Gel yang terbuat dari globulin 7S mempunyai tingkat kemuluran dan regangan yang lebih lemah dari fraksi globulin 11S. Gel yang terbuat dari globulin 11S didukung oleh ikatan disulfida sedangkan pada globulin 7S didukung oleh ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik (Utsumi dan Kinsella, 1985). Seperti yang tercantum dalam Zayas (1997) bahwa sedikitnya ikatan disulfida pada globulin 7S akan menurunkan kemampuan untuk membentuk gel. Ikatan disulfida baik inter maupun intra molekuler yang terdapat pada globulin 11S menyebabkan kekerasan gel yang dihasilkan dari globulin 11S lebih besar dari globulin 7S.

Fraksi protein 7S yang tinggi akan meningkatkan daya buih dari protein koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih. Hal ini dikarenakan globulin 7S yang tidak mengandung grup sulfhidril dan rendahnya ikatan disulfida. Ikatan disulfida yang banyak terdapat pada globulin 11S menghambat terbentuknya lapisan film yang menyelubungi rongga udara. Daya buih yang tinggi memungkinkan koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih dapat digunakan untuk pembuatan minuman bersoda, *ice cream*, atau pembuatan roti.

4.4 Penentuan Berat Molekul dengan Elektrofesis SDS-PAGE

Berat Molekul protein yang dapat ditentukan dengan berbagai metode fisikokimia berkisar antara 12000 D bagi protein kecil seperti sitokrom, yang hanya mempunyai 104 residu, sampai BM setinggi 1000000 D atau lebih, pada

protein dengan rantai polipeptida yang panjang, atau protein yang mempunyai beberapa rantai polipeptida (Lehninger, 1991).

Protein yang akan diketahui berat molekulnya, terlebih dulu ditentukan kadar protein terlarutnya dengan menggunakan metode Lowry untuk diketahui volume penyuntikan dan penambahan buffer sampelnya. Protein yang telah difraksinasi selanjutnya ditentukan berat molekulnya dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE. Elektroforesis SDS-PAGE terdiri dari dua gel yaitu *resolving gel* (gel pemisah) dan *stacking gel* (gel penumpuk). Adanya SDS dan 2-mercaptoetanol dalam buffer sampel akan memecah struktur tiga dimensi protein terutama ikatan disulfida menjadi sub unit polipeptida secara individual.

SDS dan protein akan membentuk senyawa kompleks menjadi SDS-protein. Senyawa kompleks tersebut terbentuk karena SDS yang melingkupi gugus protein sehingga mempunyai muatan negatif yang sama. Pergerakan senyawa kompleks SDS-protein tidak dipengaruhi oleh muatan senyawa melainkan berdasarkan ukuran molekul. Molekul SDS-protein dengan ukuran lebih besar mempunyai mobilitas yang lebih rendah dibandingkan dengan molekul kompleks yang lebih kecil.

Untuk mengetahui berat molekul dari inasing-masing protein dapat diketahui dengan menggunakan kit penciri protein (marker) dengan kisaran berat molekul rendah. Nilai Rf didapatkan dari hasil pembagian antara jarak perpindahan sampel dengan jarak perpindahan pelarut. Tabel 10 akan memberikan suatu korelasi antara nilai Rf dengan log BM untuk menghasilan kurva standar. Persamaan marker tersebut digunakan untuk mengetahui berat molekul protein berdasarkan nilai Rf-nya.

Tabel 10. Nilai Berat Molekul dan Rf dari Kit Penciri Protein BM Rendah

Protein	Berat Molekul (KD)	Rf
Albumin (Bovine serum)	66	0.380
Albumin (Chicken Egg)	45	0.476
Carbonic anhydrase	29	0.635
α -lactalbumin	14,2	0.937

Dari data tersebut diperoleh persamaan antara Rf dan log BM sebagai berikut :

$$\text{Log BM} = -1.1726 \text{ Rf} + 5.2341$$

$$R^2 = 0.9893$$

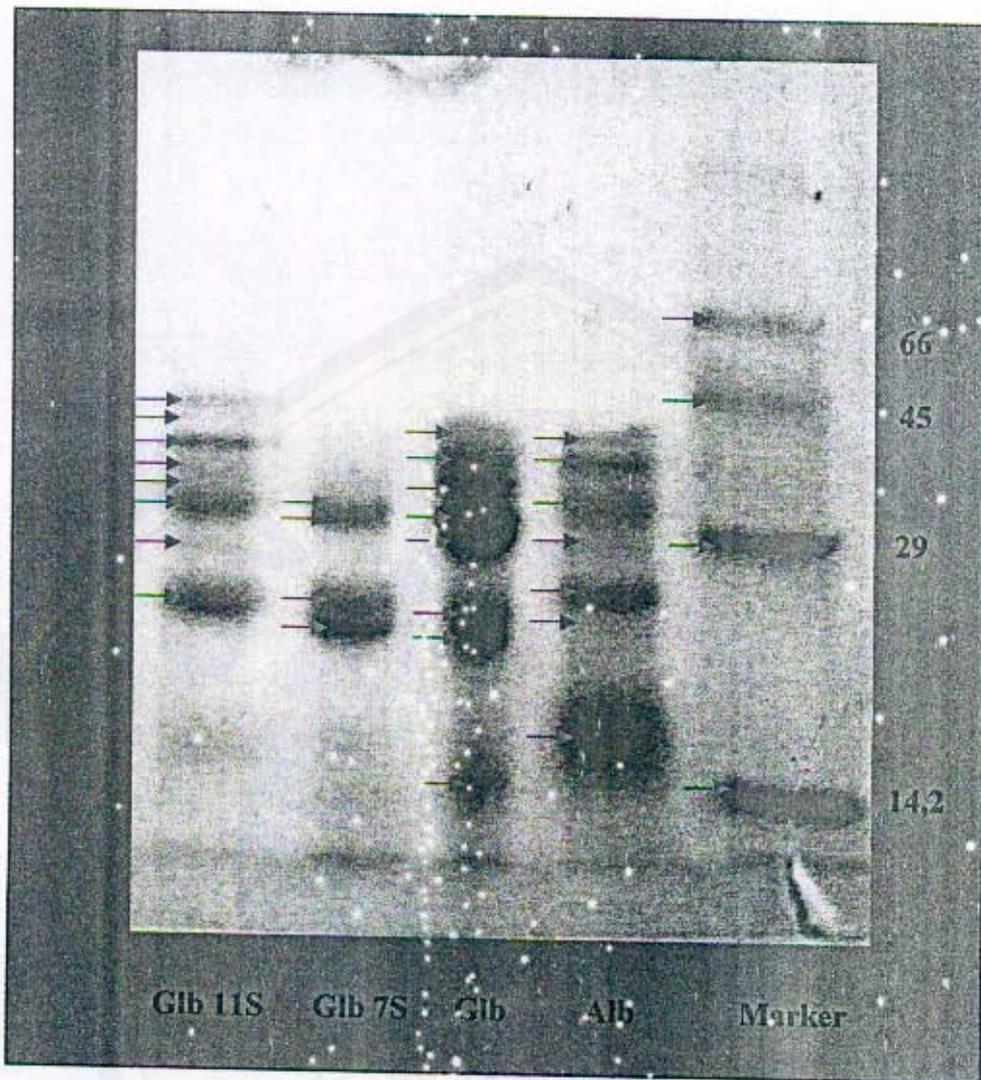
Persamaan $\text{Log BM} = -1.1726 \text{ Rf} + 5.2341$ digunakan untuk mengetahui perkiraan berat molekul dari albumin, globulin, globulin 7S dan 11S. Nilai Rf dari masing-masing sub unit protein dimasukkan dalam persamaan tersebut. Tabel 10 akan menyajikan fraksi dari masing-masing protein dan perkiraan berat molekulnya.

Tabel 10. Mobilitas Relatif (Rf) dan Perkiraan Berat Molekulnya

No. Fraksi	Albumin		Globulin		Glb 7S		Glb 11S	
	Rf	BM (KD)	Rf	BM (KD)	Rf	BM (KD)	Rf	BM (KD)
1	0.55	39	0.53	40.74	0.629	31.37	0.52	42.55
2	0.58	35.75	0.56	37.34	0.645	30.03	0.53	40.74
3	0.63	31.37	0.6	34.22	0.726	24.16	0.56	37.34
4	0.66	28.75	0.63	31.37	0.758	22.14	0.58	35.75
5	0.73	24.16	0.66	28.75			0.63	31.37
6	0.74	23.13	0.73	24.16			0.68	27.53
7	0.87	16.32	0.76	22.14			0.73	24.16
8			0.9	14.96				

Fraksi pada protein tersebut terdiri dari fraksi mayor dan fraksi minor dimana fraksi mayor menunjukkan intensitas dan ketebalan warna yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi minor. Fraksi mayor juga menunjukkan bahwa konsentrasi yang terkandung dalam protein tersebut tergolong tinggi (Widowati dan Wijaya, 1997).

Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan bahwa albumin terdiri dari tujuh fraksi dengan berat molekul antara 16,32 kD hingga 39 kD. Globulin yang terdiri dari delapan fraksi dengan berat molekul antara 14,96 kD hingga 40,74 kD. Globulin 7S memiliki empat fraksi dengan kisaran berat molekulnya sebesar 22,14 kD hingga 31,37 kD. Sedangkan untuk globulin 11S mempunyai tujuh fraksi dengan berat molekulnya sebesar 24,16 kD hingga 42,55 kD.



Gambar 10. Hasil elektroforesis SDS-PAGE



V. KESIMPULAN DAN SARAN

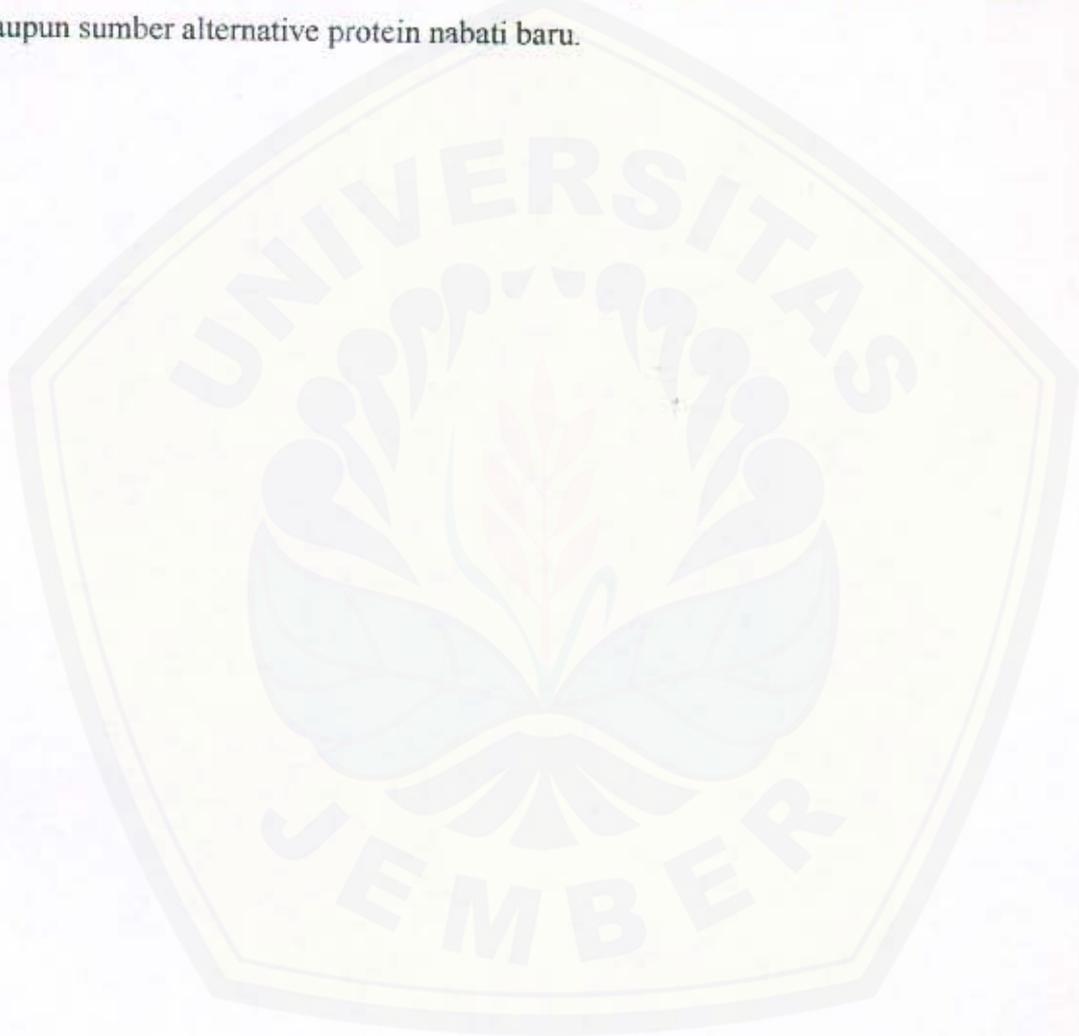
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat diambil suatu kesimpulan bahwa :

1. Karakteristik fisik Koro kratok (*Phaseolus lunatus* L) varietas kratok putih antara lain mempunyai panjang biji rata-rata 0,88 cm; lebar 0,88 cm; tebal 0,50 cm; luas penampang biji 1,25 cm²; volume 10 biji 2,14 ml; berat biji 0,42 gram dan ketebalan kulit 0.177 mm dan nilai BDD sebesar 92,345 %. Warna dari koro kratok manik ini didominasi oleh warna putih yang diperkuat dengan nilai Hue sebesar 97,02°.
2. Karakteristik kimia dari Koro kratok (*Phaseolus lunatus* L) varietas kratok putih antara lain mempunyai komposisi terbesar; karbohidrat sebesar 67,12 % (tersusun atas pati 61,27 %, serat 1,59 % dan total gula 2,80 %) dan protein sebesar 16,15 %. Kandungan lemak yang cukup rendah 1,14 % dengan kadar air sebesar 11,23 % dan kadar abunya 4,36 %.
3. Fraksinasi protein Koro kratok (*Phaseolus lunatus* L) varietas kratok putih berdasarkan kelarutannya dapat mengidentifikasi kandungan albumin sebesar 5,820 %, globulin 3,36 %, NaOH soluble fraction 5,81 %, dan prolamin 0,0367 %.
4. Fraksi globulin 7S lebih tinggi dibanding fraksi globulin 11S dengan prosentase globulin 7S sebesar 2,28 % dan globulin 11S sebesar 0,55 %.
5. Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan bahwa albumin terdiri dari tujuh fraksi dengan berat molekul antara 16,32 kD hingga 39 kD. Globulin yang terdiri dari delapan fraksi dengan berat molekul antara 14,96 kD hingga 40,74 kD. Globulin 7S memiliki empat fraksi dengan kisaran berat molekulnya sebesar 22,14 kD hingga 31,37 kD. Sedangkan untuk globulin 11S mempunyai tujuh fraksi dengan berat molekulnya sebesar 24.16 kD hingga 42,55 kD.

5.2 Saran

Perlu diadakannya penelitian lebih lanjut mengenai sifat fungsional dari protein koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih, sehingga dapat digunakan sebagai dasar aplikasi pengolahan koro kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) *Sweet*) varietas kratok putih sebagai bahan tambahan makanan ataupun sumber alternative protein nabati baru.



DAFTAR PUSTAKA

- Aaron M. Altschul dan Harold L. Wilcke. 1985. *New Protein Foods*. Volume 5. *Seed Storage Proteins*. Academic Press. Inc.
- Andrew, S.R. 2004. *Karakterisasi Biji dan Protein Koro Komak (Lablab purpureus (L.) Sweet) Sebagai Sumber Protein*. Jember: Karya Ilmiah Tertulis (SKRIPSI) Program Strata Satu Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Anonim. 2000. *Buku Ajar Biokimia I*. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- . 2002. *Petunjuk Praktikum Analisa Hasil Pertanian*. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Bonvehi, J.S dalam Bonvehi, J.S and F, Ventura Coll. 1999. *Protein Quality Assessment in Cocca Husk*. Canada: Food Research International.
- Colby, D.S. 1996. *Ringkasan Biokimia Harper (Biochemistry: A Synopsis)*. Jakarta: EGC.
- Copeland, R.A. 1994. *Methods for Protein Analysis*. New York: Chapman and Hall.
- Damodaran, S. 1997. *Food Proteins and Their Applications*. New York: Marcell Dekker. Inc.
- Damodaran, S.. 1997. *Food Proteins And Their Applications*. New York :Marcel Dekker, Inc
- Desrosier, N. W. 1988. *Teknologi Pengawetan Pangan*. . Jakarta : UI-Press.
- Dieckert, J.W. dan M.C. Dieckert, dalam Altschul, Aaron M and Harold L. Wilcke. 1985. *New Protein Foods*. Orlando: Academic Press.
- Dwijoseputro, D. 1985. *Pengantar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Friedman, M. 1996 dalam Subagio, A, Wiwik Siti Windrati, Yuli Witono. 2002. *Protein Albumin dan Globulin dari Beberapa Jenis Koro-koroan di Indonesia*. Prosiding Seminar Nasional PATPI, Malang 30-31 Juli 2002.
- Harrow, B and Abraham Mazur. 1962. *Text Book of Chemistry*. United States of America: W.B. Saunders Company.

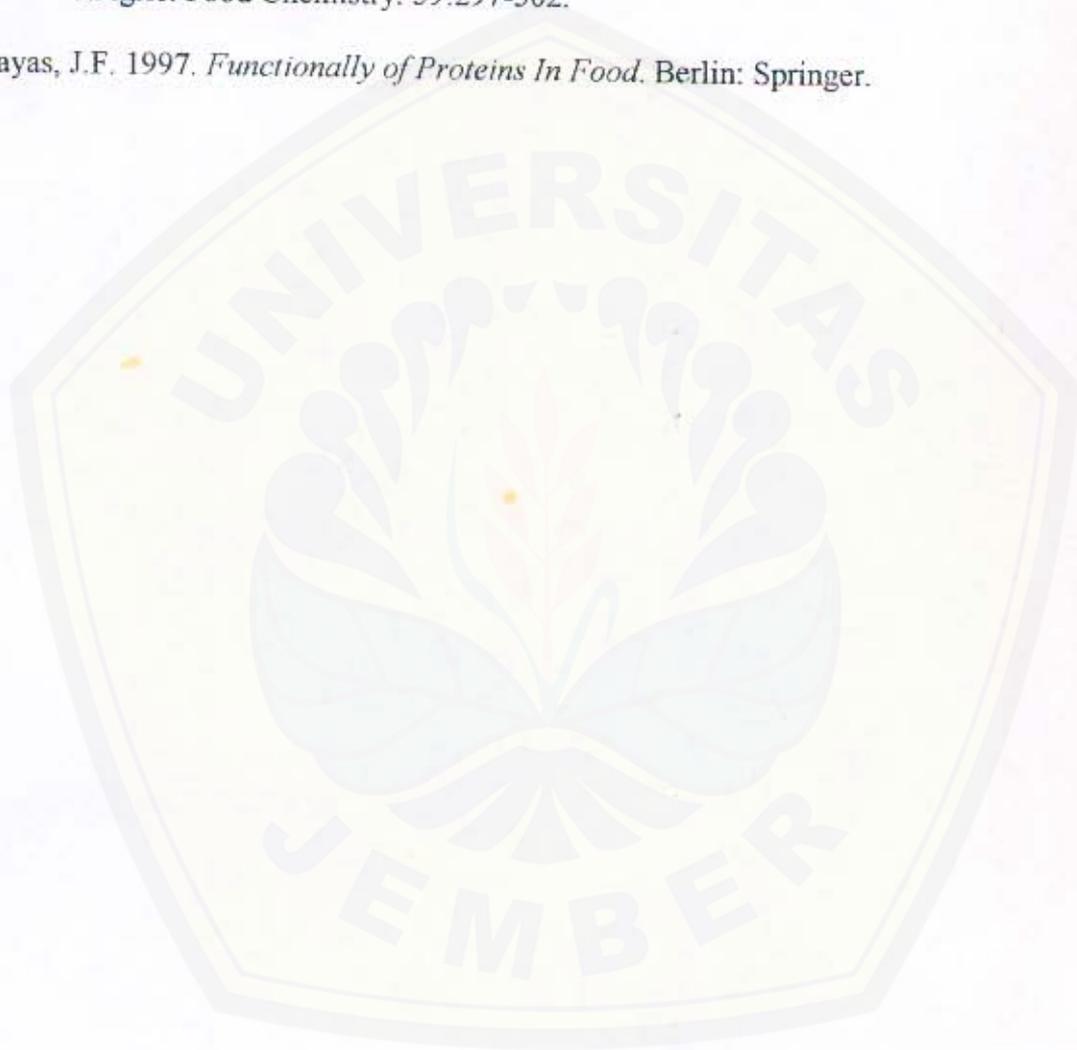
- Hettiarachchy, N.S and Ziegler. 1994. *Protein Functionally in Food Systems*. New York: Marcell Dekker. Inc.
- Hui, Y.H. 1992. *Encyclopedia of Food Science and Technology*. New york: John Willey & Sons, Inc.
- Inggrit, A. 2004. *Karakterisasi Sifat Fisik, Kimia dan Fraksinasi Protein Koro Kratok (Phaseolus lunatus (L.) Sweet) manik*. Jember: Karya Ilmiah Tertulis (SKRIPSI) Program Strata Satu Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Iwabuchi and Yamauchi. 1987. dalam Windrati S.W. 1999. *Studi Pembuatan tahu dengan Substitusi Non Kedelai dan Pengaruhnya Terhadap Perubahan Komposisi Globulin 7S dan 11S Serta Sifat-sifat Tahu*. Malang: Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Iwabuchi and Yamauchi. 1987. *Electrophoretic Analysis of Whey Proteins Present on Soybean Globulin Fraction*. J. Agric. Food Chemistry, 35: 205-209.
- Koswara, Sutrisno. 1995. *Teknologi Pengolahan Kedelai Menjadikan Makanan Bermutu*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.
- Lehninger, A. 1997. *Dasar-dasar Biokimia*. Alih Bahasa Thenawidjaya, M. Jakarta: Erlangga.
- Maesen dan Somaatmadja. 1993. *Prosea, Sumber Daya Nabati Asia Tenggara I*. Jakarta: gamedia Pustaka Utama.
- Matthews, R.H. 1989. *Legumes, Chemistry, Technology and Human Nutrition*. United states of America: Marcell Dekker. Inc.
- Newman, C.W., Roth, N.R. and Lockermen, R.H. 1987 dalam Subagio, A, Wiwik Siti Windrati, Yuli Witono. 2002. *Protein Albumin dan Globulin dari Beberapa Jenis Koro-koroan di Indonesia*. Prosiding Seminar Nasional PATPI, Malang 30-31 Juli 2002.
- Nielsen, N.C. 1985 dalam Subagio, A, Wiwik Siti Windrati, Yuli Witono. 2002. *Protein Albumin dan Globulin dari Beberapa Jenis Koro-koroan di Indonesia*. Prosiding Seminar Nasional PATPI, Malang 30-31 Juli 2002.
- Page, D. S. 1985. *Prinsip-prinsip Biokimia*. Surabaya: Erlangga.
- Robert, E.A. 1985. *Grain Legume Crops*. London: Collin.

- Sastrapradja, S., Lubis, S.H.A., Djajakusuma E., Sutarno H dan Lubis, J. 1981. dalam Windrati S.W. 1999. *Studi Pembuatan tahu dengan Subtitusi Non Kedelai dan Pengaruhnya Terhadap Perubahan Komposisi Globulin 7S dan 11S Serta Sifat-sifat Tahu*. Malang: Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Schumm, Dorothy E. 1992. *Intisari Biokimia*. Jakarta: Binarupa Aksara
- Stryer, L. 1996. *Biokimia 1 vol 1 edisi 4*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Subagio. A. *Pengembangan Produk-produk Protein Fungsional Dari Koro-koroan: Peningkatan Rendemen Dan Perbaikan Sifat-sifatnya Secara Enzimatis, Khemis Dan Fisis*. Proposal Riset Unggulan Terpadu. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Sudarmadji, S.B Haryono dan Suhardi. 1997. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Suhardi. 1989. *Kimia dan Teknologi Protein*. PAU. Pangan dan Gizi. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Syarief, R dan Anies I. 1986. *Pengetahuan Bahan Untuk Industri Pertanian*. Jakarta: PT Melton Putra.
- Tanh dan Shibasaki. 1976 dalam Widowati, S dan Sri Kusuma Susi Wijaya. 1997. *Isolasi dan Karakterisasi Globulin 7S dan Globulin 11S dari Sepuluh Varietas Kedelai di Indonesia*. Prosiding Seminar Teknologi Pangan.
- Utsumi, S dan J.E. Kinsella. 1985. dalam Widowati, S dan Sri Kusuma Susi Wijaya. 1997. *Isolasi dan Karakterisasi Globulin 7S dan Globulin 11S dari Sepuluh Varietas Kedelai di Indonesia*. Prosiding Seminar Teknologi Pangan.
- Widowati, S dan Sri Kusuma Susi Wijaya. 1997. *Isolasi dan Karakterisasi Globulin 7S dan Globulin 11S dari Sepuluh Varietas Kedelai di Indonesia*. Prosiding Seminar Teknologi Pangan.
- Winarno, F.G. 1991. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- , 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Windrati S.W. 1999. *Studi Pembuatan tahu dengan Subtitusi Non Kedelai dan Pengaruhnya Terhadap Perubahan Komposisi Globulin 7S dan 11S Serta Sifat-sifat Tahu*. Malang: Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang.

Windrati S.W. 1999. *Studi Pembuatan tahu dengan Substitusi Non Kedelai dan Pengaruhnya Terhadap Perubahan Komposisi Globulin 7S dan 11S Serta Sifat-sifat Tahu*. Malang: Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang

Yu, M dan Damodaran. 1991. *Kinetic of Destabilization of Soy Protein Foams*. J.Agric. Food Chemistry. 39:297-302.

Zayas, J.F. 1997. *Functionally of Proteins In Food*. Berlin: Springer.



Lampiran 1. Sifat Fisik dan Kimia Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* (L.) Sweet)
Varietas Kratok Putih.

A. SIFAT FISIK

1. Sifat Tebal, Lebar, Panjang dan Berat

Biji Ke	Tebal (cm)	Rerata	Lebar (cm)	Rerata	Panjang (cm)	Berat (gr)
1	0.65	0.064	0.85	0.87333	1.22	0.489
	0.62		0.9			
	0.64		0.87			
	0.64					
	0.65					
2	0.45	0.452	0.92	0.92	1.32	0.423
	0.46		0.93			
	0.45		0.91			
	0.45					
	0.45					
3	0.54	0.544	0.87	0.86333	1.23	0.399
	0.55		0.85			
	0.55		0.87			
	0.55					
	0.53					
4	0.62	0.622	0.91	0.89	1.23	0.439
	0.63		0.89			
	0.6		0.87			
	0.62					
	0.64					
5	0.51	0.546	0.88	0.87667	1.37	0.442
	0.56		0.87			
	0.56		0.88			
	0.56					
	0.52					
6	0.55	0.546	0.88	0.87667	1.22	0.368
	0.54		0.87			
	0.54		0.88			
	0.55					
	0.55					
7	0.55	0.552	0.88	0.87	1.32	0.414
	0.55		0.86			
	0.55		0.87			
	0.55					
	0.56					
8	0.55	0.552	0.91	0.9	1.36	0.462
	0.55		0.91			
	0.54		0.88			
	0.56					
	0.56					
9	0.52	0.532	0.85	0.83	1.22	0.378
	0.53		0.86			
	0.52		0.78			

	0.54					
	0.55					
10	0.6	0.602	0.92	0.89333	1.32	0.445
	0.6		0.89			
	0.59		0.87			
	0.61					
	0.61					
	RERATA	0.5012		0.87933	0.879333333	0.4259
	SD	0.159956105		0.02408	0.062441083	0.037418

2. BDD

No.	Biji utuh	Biji Tanpa Kulit	BDD
1	0.417	0.384	92.08
2	0.42	0.387	92.14
3	0.404	0.375	92.82
4	0.429	0.404	94.17
5	0.406	0.379	93.35
6	0.407	0.376	92.38
7	0.352	0.321	91.19
8	0.267	0.244	91.39
9	0.361	0.333	92.24
10	0.325	0.298	91.69
	RERATA		92.345
	SD		0.90467

3. Warna

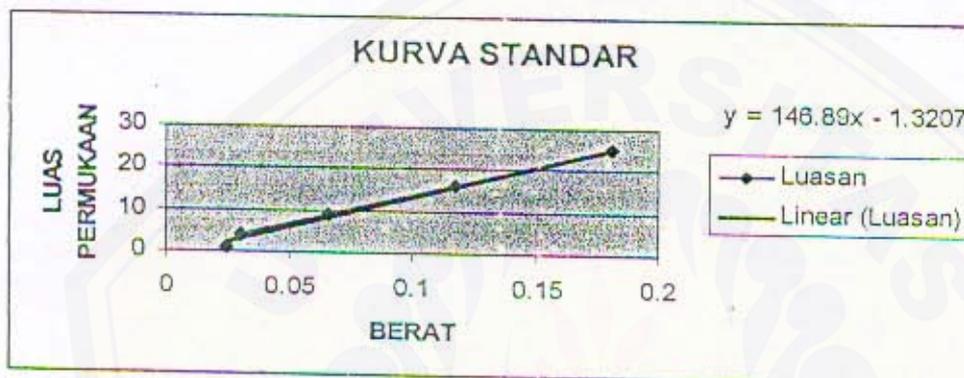
No.	dE	dL	da	db
1	22.6	-20.5	4.4	8.3
2	25.1	-23.7	2.4	7.6
3	20.3	-16.9	3.5	10.7
4	20.4	-18.2	3.4	8.5
5	26.4	-25.5	3.9	5.4
6	22	-18.2	4.9	11.3
7	23.9	-21.6	5.3	8.9
8	21.2	-19.5	3.7	7.6
9	26.5	-24.6	3.2	9.2
10	26	-22.5	3.7	12.4
11	21.6	-20.2	2.7	7.3
12	26.5	-23.1	4.8	11.9
RERATA	23.54166667	-21.2083333	3.825	9.0916667
SD	2.471090423	2.740755913	0.685360738	2.1021454

$$a^* = 1,92 \quad b^* = 15,6 \quad c^* = 15,72$$

$$H = 97,02 \text{ (Netral - kuning)} \quad L = 73,14 \text{ (Cerah)}$$

4. Luas Permukaan

Luasan Berat	1 cm ²	4 cm ²	9 cm ²	16 cm ²	25 cm ²
1	0.009	0.034	0.065	0.123	0.182
2	0.008	0.03	0.065	0.112	0.179
3	0.008	0.026	0.065	0.12	0.182
4	0.01	0.023	0.068	0.116	0.178
5	0.088	0.039	0.068	0.116	0.183
RERATA	0.0246	0.0304	0.0662	0.1174	0.1808



Biji Ke	Berat Kertas di Blat (g)	Luas Permukaan (cm ²)
1	0.01	1.1626
2	0.011	1.30178
3	0.008	0.88424
4	0.011	1.30178
5	0.013	1.58014
6	0.012	1.44096
7	0.009	1.02342
8	0.011	1.30178
9	0.012	1.44096
10	0.009	1.02342
RERATA		1.246108
SD		0.219573329

5. Volume Biji

Biji Ke	Gelas Kosong	Gelas + Air	Air	Vol Biji
1	1.0117	3.1658	2.1541	2.16037
2	1.0107	3.2906	2.2799	2.28651
3	1.0104	3.2036	2.1932	2.19958
4	1.0109	3.0198	2.0089	2.01474
5	1.0098	3.255	2.2452	2.25173
6	1.0103	3.2598	2.2495	2.25604
7	1.0113	3.0152	2.0039	2.00973
8	1.0117	3.2119	2.2002	2.2066
9	1.0092	3.0344	2.0252	2.03109
10	1.01	3.0306	2.0206	2.02648
RERATA				2.14429
SD				0.11207

6. Ketebalan Kulit

Biji Ke	Tebal Kulit (mm)
1	0.20
2	0.20
3	0.16
4	0.15
5	0.23
6	0.185
7	0.155
8	0.155
9	0.17
10	0.16
RERATA 0.177	
SD 0.026055	

B. SIFAT KIMIA

1. Kadar Air

No.	Berat Botol (a)	Botol + bahan (b)	Oven (c)	Ka
1	18.708	20.71	20.479	11.5385
2	11.126	13.127	12.907	10.995
3	10.01	12.011	11.788	11.1444
RERATA				11.226
SD				0.28078

2. Kadar Abu

No.	Berat Kurs (a)	Kurs + bahan (b)	Pengabuan (c)	Kadar Abu
1	18.503	20.504	18.59	4.348
2	17.717	19.718	17.805	4.397
3	25.531	27.532	25.618	4.348
RERATA				4.3643333
SD				0.0282902

3. Kadar Lemak

No.	Kertas saring + bahan (a)	Oven (b)	Soxhlet + Oven ©	Kadar lemak
1	2.529	2.486	2.4538	1.273
2	2.523	2.3954	2.37	1.006
RERATA				1.1395
SD				0.1887975

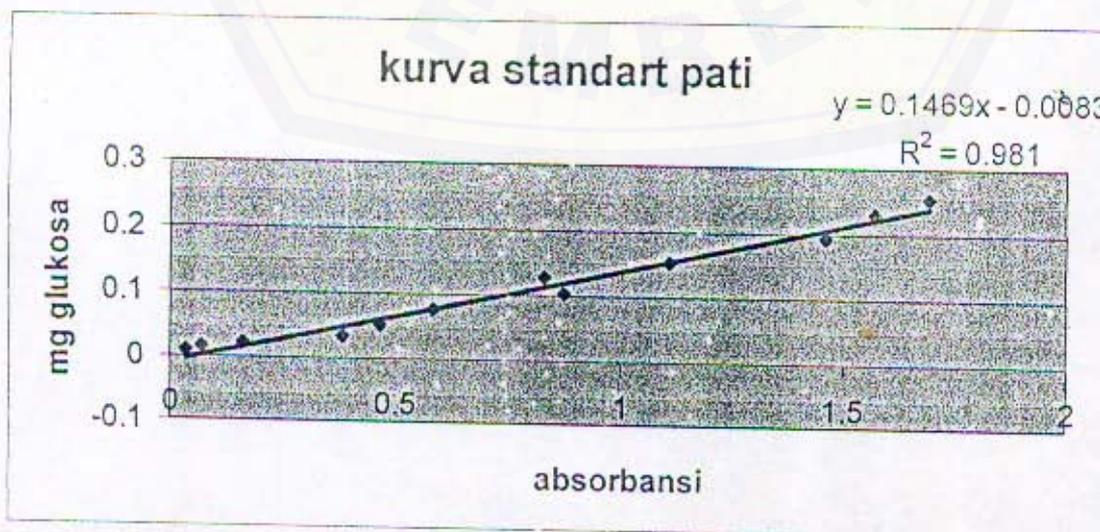
4. Protein

No.	g Sampel	ml titrasi NaOH 0.0947 N	% N	Kadar protein
1	0.2231	22.25	2.5567	15.979375
2	0.2287	22.05	2.6102	16.31375
Blanko		26.55	RERATA	16.146563
SD				0.2364388

5. Pati

KURVA STANDART PATI

glukosa	0.001276	mg/mikroliter
Abs	mg glukosa	Pengambilan
0.033	0.00638	5
0.069	0.01276	10
0.382	0.0319	25
0.468	0.05104	40
0.585	0.07656	60
0.834	0.1276	100
0.16	0.01914	15
0.874	0.10208	80
1.112	0.15312	120
1.458	0.1914	150
1.57	0.22968	180
1.69	0.2552	200



Kadar Pati

Abs	mg glukosa 20 mikro	mg glukosa	kadar pati(%)
0.814	0.1112766	1390.9575	62.5930875
0.79	0.107751	1346.8875	60.6099375
0.902	0.1242038	1552.5475	69.8646375
0.745	0.1011405	1264.25625	56.89153125
0.739	0.1002591	1253.23875	56.39574375
		Rerata	61.2709875
		SD	5.453975488

6. Serat

Berat stlh soxhlet	Berat kertas saring	Berat akhir	Kadar Serat
1.9835	1.0188	1.0465	1.396521301
1.9814	1.0099	1.0474	1.892601191
1.9791	1.0001	1.0292	1.470365318
		Rerata	1.586495936
		SD	0.267653797

7. Total Gula

Abs	mg glukosa 5 ml	mg glukosa	Kadar gula(%)
0.882	0.1212658	60.6329	3.031645
0.756	0.1027564	51.3782	2.56891
		Rerata	2.8002775
		SD	0.327203056

8. Karbohidrat

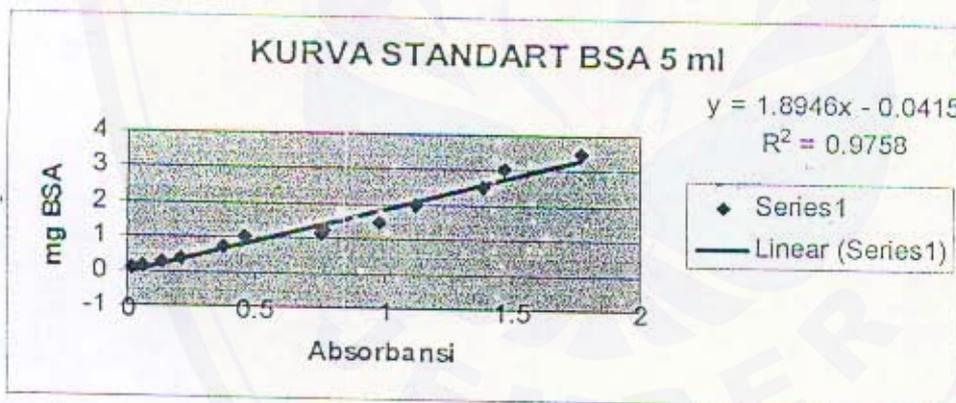
$$\begin{aligned}
 \% \text{ Karbohidrat} &= 100 - (\text{K. Air} + \text{K. Abu} + \text{K. Lemak} + \text{K. protein}) \\
 &= 100 - (11.226 + 4.3643333 + 1.1395 + 16.146563) \\
 &= 100 - 32.8763963 \\
 &= 67.1236037 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 2. Analisa Protein Terlarut Dengan Metode Lowry

Standart Lowry

Kurva Standart BSA 0.005 mg/mikroliter

Pengambilan (mikroliter)	Absorbansi	mg BSA
15	0.014	0.075
25	0.061	0.125
50	0.134	0.25
75	0.208	0.375
150	0.375	0.75
200	0.458	1
225	0.753	1.125
250	0.765	1.25
300	0.983	1.5
400	1.121	2
500	1.385	2.5
600	1.468	3
700	1.77	3.5



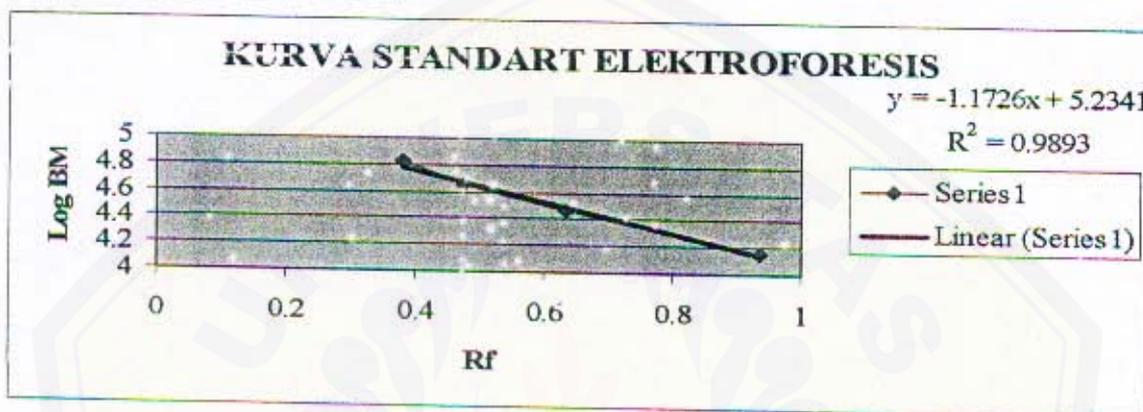
Hasil Analisa Protein terlarut Dengan Metode lowry

Jenis Protein	Absorbansi	Total Protein (mg)	Kadar Protein (%)
Globulin	1.454	90.442	3.36177
Albumin	1.558	145.514	5.8206
Glutelin	0.252	145.313	5.8125
Prolamin	0.051	0.9187	0.0367
Total Protein			15.03157
Globulin 7S	0.925	57.0335	2.28134
Globulin 11S	0.951	13.8676	0.554704
Total Protein			2.836044

Lampiran 3. Elektroforesa

Persamaan Standart Elektroforesa

Rf (x)	Log BM (y)
0.380952381	4.820857989
0.476190476	4.653212514
0.634920635	4.462397998
0.936507937	4.152288344



Berat Molekul Protein Hasil Elektroforesa

Protein	Rf	Log BM	BM	BM (KD)
Alb	0.54839	4.591061	38999.712	38.9997
	0.58065	4.553236	35746.677	35.7467
	0.62903	4.496497	31368.74	31.3687
	0.66129	4.458671	28752.218	28.7522
	0.72581	4.38302	24155.714	24.1557
	0.74194	4.364107	23126.346	23.1263
	0.87097	4.212803	16323.111	16.3231
Glb	0.53226	4.609974	40735.614	40.7356
	0.56452	4.572149	37337.784	37.3378
	0.59677	4.534323	34223.373	34.2234
	0.62903	4.496497	31368.74	31.3687
	0.66129	4.458671	28752.218	28.7522
	0.72581	4.38302	24155.714	24.1557
	0.75807	4.345193	22140.783	22.1408
	0.90323	4.174977	14961.571	14.9616
Glb 7S	0.62903	4.496497	31368.74	31.3687
	0.64516	4.477584	30031.997	30.032
	0.72581	4.38302	24155.714	24.1557

	0.75807	4.345193	22140.783	22.1408
Glb 11S	0.51613	4.628887	42548.782	42.5488
	0.53226	4.609974	40735.614	40.7356
	0.56452	4.572149	37337.784	37.3378
	0.58065	4.553236	35746.677	35.7467
	0.62903	4.496497	31368.74	31.3687
	0.67742	4.439758	27526.975	27.527
	0.72581	4.38302	24155.714	24.1557

