**BAB II**

**TINJAUAN PUSTAKA**

1. **Tinjauan Umum Tentang Jeruk Nipis**
2. **Morfologi tanaman jeruk nipis**

*Citrus aurantifolia* adalah tanaman yang berasal dari Asia dan tumbuh subur pada daerah yang beriklim tropis. *Citrus aurantifolia* merupakan salah satu tanaman yang berasal dari Famili Rutaceae dengan genus Citrus. Citrus aurantifolia memiliki tinggi sekitar 150-350 cm dan buah yang yang berkulit tipis serta bunga berwarna putih (Prastiwi dan Ferdiansyah, 2013).

Tanaman jeruk nipis merupakan pohon yang sangat kecil. Batangnya memiliki duri tajam dan banyak cabang-cabang kecil. Daunnya berbentuk bulat telur, bertekstur, dan memilki bau khas. Panjang daun sekitar 4-6 cm. Bagian tepi daun agak berlekuk ke atas. Sementara itu, tangkai daunnya kecil dan sempit. Bunga jeruk nipis berwarna putih dan harum. Buahnya berbentuk agak bulat dengan ujungnya sedikit menguncup. Saat masih muda, buah berwarna hijau. Semakin tua, warna buah semakin hijau tua atau kekuningan. Rasa buahnya asam dan segar (Muhlisah, 2007).

Buah jeruk nipis memiliki 3 lapisan menurut Tjitrosoepomo (2003), yaitu:

1. Lapisan luar yang kaku dan mengandung banyak kelenjar minyak atsiri, yang mula-mula berwarna hijau, tetapi jika buah masak warnanya berubah menjadi kuning atau jingga. Lapisan ini disebut flavedo.
2. Lapisan tengah yang bersifat seperti spon, terdiri atas jaringan bunga karang yang biasanya berwarna putih, dinamakan albedo.
3. Lapisan dalam yang bersekat-sekat, hingga terbentuk beberapa ruangan. Dalam ruangan ini terdapat gelembung-gelembung berair, dan bijinya terdapat bebas diantara gelembung-gelembung ini.



Gambar 1 Buah Jeruk Nipis (Sumber: Muhlisah, 2007)

1. **Taksonomi tanaman jeruk nipis**

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Sapindales

Keluarga : Rutaceae

Genus : Citrus

Spesies : *Citrus aurantifolia* (Apraj *et al*., 2011).

1. **Kandungan dalam jeruk nipis**

Buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki rasa pahit dan asam. Buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mengandung unsur-unsur senyawa kimia yang bermanfaat, seperti asam sitrat, asam amino (triptofan, lisin), minyak atsiri (sitral, limonen, felandren, lemon kamfer, kadinen, gerani-lasetat, linalil asetat, aktilaldehid, nonildehid), damar (resinae), glikosida, asam sitrun, lemak, kalsium, fosfor, besi, belerang, vitamin B1 dan C. Beberapa bahan kimia yang terkandung dalam jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) di antaranya adalah asam sitrat sebanyak 7-7,6% dari 100 gram buah, lemak, mineral, vitamin B1, sitral limonene, fellandren, lemon kamfer, geranil asetat, cadinen, linalin asetat. Selain itu, jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) juga mengandung vitamin C sebanyak 27 mg/100g jeruk, kalsium sebanyak 40 mg/100g jeruk, dan fosfor sebanyak 22 mg/100g jeruk. (Lestari, Amalia, dan Yuwono, 2018).

1. **Tinjauan Umum Tentang Urine**
2. **Pengertian urine**

Urine adalah cairan sisa metabolisme yang dieksresikan oleh ginjal yang kemudian akan di keluarkan dari dalam tubuh melalui proses urinasi. Ekskresi urin diperlukan untuk membuang molekul-molekul sisa dalam darah yang disaring oleh ginjal dan untuk menjaga hemostasis cairan tubuh. Urine disaring dalam ginjal, dibawa melalui ureter menuju kandung kemih, akhirnya dibuang keluar tubuh melalui uretra (Mukarrmah, Nardin, dan Utami, 2018).



Gambar 2 Urine (Sumber: Arianda, 2017)

1. **Proses pembentukan urine**

Urine berasal dari darah yang dibawa arteri renalis masuk ke dalam ginjal dengan melalui glomerulus berfungsi sebagai ultrafiltrasi pada simpai bowman, berfungsi untuk menampung hasil filtrasi dari glomerulus. Pada tubulus ginjal akan terjadi penyerapan kembali zat-zat yang sudah disaring pada glomerulus, sisa cairan akan diteruskan ke piala ginjal terus berlanjut ke ureter. Ada 3 tahap pembentukan urine menurut Irianto (2013):

1. Proses filtrasi

Proses ini terjadi di glomerulus, proses filtrasi terjadi karena permukaan aferen lebih besar sehingga terjadi penyerapan darah sedangkan sebagian yang tersaring adalah bagian cairan darah kecuali protein. Cairan yang tersaring ditampung oleh simpai bowman yang terdiri dari glukosa, air, natrium, klorida, sulfat, bikarbonat dan lain-lain, yang diteruskan ke tubulus ginjal (Irianto, 2013).

1. Proses Reabsorbsi

Fungsi utama tubulus proksimal adalah reabsorpsi yaitu proses di kembalikannya air bersama dengan glukosa, asam amino, asam urat dan protein yang berhasil menembus filter glomerulus ke aliran darah. Tubulus proksimal juga mengembalikan elektrolit, natrium, klorida dan bikarbonat. Tubulus distal secara halus mengatur konsentrasi ion-ion natrium, kalium, bikarbonat, fosfat dan hidrogen (Irianto, 2013).

1. Proses Sekresi

Proses ini adalah proses penyerapan urine sisa dari filtrasi dan reabsorpsi. Proses penyerapan urine ini terjadi pada tubulus dan diteruskan ke piala ginjal selanjutnya diteruskan ke ureter masuk ke vesika urinaria (Irianto, 2013).

1. **Komposisi urine**

Urine mengandung bermacam-macam zat, antara lain urea, amoniak, dan zat-zat lain yang merupakan hasil pembongkaran protein. Pada orang yang melakukan diet yang rata-rata berisi 80-100 gram protein dalam 24 jam, kadar air dan zat dalam air kemih adalah air 96%, zat padat 4% (terdiri atas urea 2% dan hasil metobolisme lainnya 2%) (Irianto, 2013).

1. **Ciri-ciri urine normal**

Jumlah urine normal rata-rata 1 sampai 2 liter sehari, tetapi berbeda-beda sesuai jumlah cairan yang dimasukkan. Banyaknya bertambah pula bila terlampau banyak protein yang dimakan, sehingga tersedia cukup cairan yang diperlukan untuk melarutkan urea. Urine normal berwarna bening orange pucat tanpa endapan, baunya tajam, reaksinya sedikit asam terhadap lakmus dengan pH rata-rata 6, berat jenisnya berkisar dari 1.010 sampai 1.025 (Pearce, 2009).

1. **Macam-macam sampel urine**

Macam- macam sampel urine menurut Gandasoebrata (2010):

1. Urine sewaktu

Urine sewaktu adalah urine yang dikeluarkan pada satu waktu yang tidak ditentukan dengan khusus. Urine sewaktu ini cukup baik untuk pemeriksaan rutin yang menyertai pemeriksaan badan tanpa pendapat khusus.

1. Urine pagi

Urine pagi adalah urine yang pertama-tama dikeluarkan pada pagi hari setelah bangun tidur. Urine ini lebih pekat dari urine yang dikeluarkan siang hari, jadi baik untuk pemeriksaan sedimen, berat jenis, protein, tes kehamilan dan lain-lain.

1. Urine post-prandial

Urine post-prandial adalah urine yang pertama kali dilepaskan 1 - 3 jam sehabis makan. Urine ini berguna untuk pemeriksaaan terhadap glukosuria.

1. Urine 24 jam

Urine 24 jam adalah urine yang dikumpulkan selama 24 jam. Urine yang pertama keluar dari jam 7 pagi dibuang, berikutnya ditampung termasuk juga urine jam 7 pagi esok harinya.

1. Urine 3 gelas dan urine 2 gelas pada laki-laki

Urine ini digunakan pada pemeriksaan urologik yang dimaksudkan untuk mendapatkan gambaran tentang letaknya radang atau lesi yang mengakibatkan adanya nanah atau darah dalam urine laki-laki. Urine 3 gelas adalah urine yang waktu keluar langsung ditampung ke dalam 3 gelas sedimen (gelas yang dasarnya menyempit) tanpa menghentikan aliran urinnya. Kedalam gelas pertama ditampung 20 - 30 ml urin yang mula-mula keluar, ke dalam gelas kedua dimasukkan urin berikutnya, beberapa ml terakhir ditampung dalam gelas ketiga. Untuk mendapat urine 2 gelas, caranya sama seperti urine 3 gelas, dengan perbedaan gelas ketiga tidak ada dan pada dalam gelas pertama ditampung 50 - 70 ml urine.

1. **Tinjauan Umum Tentang Proteinuria**

Di antara pemeriksaan kimia rutin yang dilakukan pada urine, tanda penyakit ginjal yang paling jelas adalah penentuan protein. Proteinuria sering kali dikaitkan dengan penyakit ginjal awal yang menjadikan pemeriksaan protein urine sebagai bagian penting dari semua pemeriksaan fisik. Urine normal mengandung sangat sedikit protein, biasanya kurang dari 10 mg/dL atau 100 mg per 24 jam setelah diekskresikan, protein tersebut terdiri atas protein serum dengan berat molekul rendah yang telah disaring oleh glomerulus dan protein yang dihasilkan disaluran kemih kelamin (Strangsinger dan Lorenzo, 2017).

Tingkat proteinuria yang terbentuk dan dikeluarkan lewat urin setiap hari dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu keadaan ringan (protein yang terbentuk dan dikeluarkan lewat urin < 1,0 gr hari), keadaan sedang (protein yang terbentuk dan dikeluarkan lewat urin antara 1,0 gr-3,0 gr/hari) dan keadaan berat (protein yang terbentuk dan dikeluarkan lewat urin > 3,0/hari) (Estridge, 2012).



Gambar 3 Proteinuria (Arianda, 2017)

1. **Arti klinik proteinuria**

Adanya proteinuria dalam analisis rutin tidak selalu menandakan penyakit ginjal, namun keberadaannya mengharuskan pemeriksaan tambahan untuk menentukan apakah protein tersebut mewakili kondisi normal atau patologis. Proteinuria klinis terjadi jika protein di dalam urine 30 mg/dL atau lebih (300 mg/dL). Penyebab proteinuria beragam dan dapat dikelompokkan ke dalam tiga kategori utama, yaitu prerenal, renal dan pascarenal berdasarkan asal protein (Strangsinger dan Lorenzo, 2017).

1. **Penyebab terjadinya proteinuria**

Proteinuria dapat disebabkan oleh faktor-faktor sebagai berikut:

1. Penyakit glomelurus

Albumin protein yang dominan sekitar 60-90% pada urin, sedangkan sisanya protein dengan berat molekul rendah ditemukan hanya dalam jumlah sedikit. Ada 2 faktor utama sebagai penyebab filtrasi glomerulus meningkat yaitu ketika barier filtrasi diubah oleh penyakit yang dipengaruhi oleh glomerulus pada sejumlah kapasitas tubulus yang berlebihan menyebabkan proteinuria dan faktor kedua yaitu peningkatan tekanan kapiler glomerulus menyebabkan gangguan hemodinamik. Filtrasi menyebabkan proteinuria glomerulus oleh tekanan yang meningkat tanpa perubahan apapun pada permeabilitas intrinsik dinding kapiler glomerulus. Akibat terjadinya kebocoran pada glomerulus yang berhubungan dengan kenaikan permeabilitas membran basal glomerulus terhadap protein akan menyebabkan proteinuria. Contoh dari proteinuria glomerulus, mikroalbuminuria (jumlah 30-300 mg/hari), normal bila tidak lebih dari 30 mg/hari, merupakan marker penurunan faal ginjal laju filtrasi glomerulus (LFG) dan penyakit kardiovaskular sistemik, proteinuria klinis, jumlahnya 1-5 mg/hari (Strangsinger dan Lorenzo, 2017).

1. Penyakit tubulus

Ditemukannya protein berat molekul rendah antara 100-150 mg/hari terdiri atas β-2 mikroglobulin karena renal tubular asidosis (RTA), sarkoidosis, sindrom Fankoni, pielonefritis kronis dan akibat cangkok ginjal (Strangsinger dan Lorenzo, 2017).

1. Pre-eklamsia**/**eklamsia

Pre-eklamsia adalah sindrom spesifik kehamilan berupa berkurangnya perfusi organ akibat vasospasme dan aktivasi endotel. Proteinuria adalah satu dari tiga tanda penting dari pre-eklamsia. Penyakit dengan tanda-tanda hipertensi, edema dan proteinuria yang timbul pada kehamilan. Penyakit ini umumnya terjadi dalam triwulan ke-3 kehamilan atau pada trimester terakhir (Strangsinger dan Lorenzo, 2017).

Pre-eklamsia merupakan kumpulan gejala yang timbul pada ibu hamil, bersalin dan dalam masa nifas yang terdiri dalam trias yaitu hipertensi, proteinuria, dan edema. Ibu hamil tersebut tidak menunjukan tanda-tanda kelainan vaskular atau hipertensi sebelumnya (Strangsinger dan Lorenzo, 2017).

Pre-eklamsia dapat disebut sebagai hipertensi yang diinduksi-kehamilan atau penyakit hipertensi akut pada kehamilan. Pre-eklamsia tidak semata-mata terjadi pada wanita muda pada kehamilan pertamanya. Sedangkan eklamsia didefinisikan sebagai penambahan kejang umum pada sindrom pre-eklamsia ringan atau berat. Pre-eklamsia/eklamsia merupakan kumpulan gejala yang timbul pada ibu hamil, bersalin dan dalam masa nifas yang terdiri dari trias yaitu hipertensi, proteinuria dan edema yang kadang-kadang disertai konvulsi sampai koma (Strangsinger dan Lorenzo, 2017).

1. **Macam-macam proteinuria**
2. Fungsional proteinuria

Disebabkan oleh karena ekspose dengan udara yang sangat dingin, otot-otot yang bekerja keras yang akan menghilang setelah istirahat (tidur). Pada kehamilan disebut ortostatik atau postural protein (Estridge, 2012).

1. Organik proteinuria
2. Pre-renal proteinuria

Di karenakan penyakit yang umum terjadi dan merupakan indikasi penyakit ginjal misalnya ascites dan karena keracunan obat bahan kimia seperti merkuri (Hg) dan timbal (Pb) karena peningkatan permeabilitas glomerulus, seperti keadaan-keadaan hipertensi esensial dan eklamsia pada kehamilan. Pada proteinuria jenis ini melebihi 2 gram dalam 24 jam dan jarang terjadi proteinuria pre renal sejati, tanpa kerusakan ginjal tetapi apabila berkepanjangan dengan sendirinya dapat mengakibatkan kerusakan ginjal (Estridge, 2012).

1. Renal proteinuria

Proteinuria dapat menjadi tanda satu-satunya dari kerusakan ginjal dini oleh obat-obatan nefrositik atau pada penyakit ginjal, dan diabetes melitus merupakan penyebab yang sering. Pada berbagai jenis penyakit ginjal dapat dilihat derajat proteinuria yang berbeda. Pada glomerulonefritis proteinuria disebabkan oleh kebocoran melalui glomerulus yang rusak bervariasi sesuai jenis gangguan patologis. (Estridge, 2012).

1. Pasca renal proteinuria

Proteinuria yang berasal dari pasca renal selalu berhubungan dengan sel-sel, dan minimal ditemukan pada infeksi berat traktus urinarius bagian bawah, dan disertai dengan hematuria bila pelvis ginjal atau ureter dirangsang oleh batu atau ada penyakit keganasan setempat (Estridge, 2012).

1. **Tinjauan Umum Tentang Metode Pemeriksaan Protein Urine**
2. **Metode carik celup**

Metode carik celup berupa secarik plastik kaku yang pada sebelah sisinya dilekati dengan satu sampai sembilan kertas isap atau bahan penyerap lain yang masing-masing mengandung reagen-reagen spesifik terhadap salah satu zat yang mungkin ada di dalam urine. Adanya dan banyaknya zat yang dicari ditandai oleh perubahan warna tertentu pada bagian yang mengandung reagen spesifik, skala warna yang timbul pada strip carik celup memberikan penilaian secara semikuantitatif (Gandasoebrata, 2010).

Walaupun sangat sensitif dan spesifik, pemakaian metode carik celup cara penggunaannya harus mengikuti petunjuk-petunjuk yang ditentukan oleh perusahaan pembuat carik celup itu, jika tidak mengikutinya maka hasil pemeriksaan dapat menyimpang dari keadaan sebenarnya (Gandasoebrata, 2010).

Keadaan yang menyebabkan hasil carik celup tidak akurat pemakaian reagen strip haruslah dilakukan secara hati-hati. Oleh karena itu harus diperhatikan cara kerja dan batas waktu pembacaan. Setiap habis mengambil 1 batang reagen strip, botol/wadah harus segera ditutup kembali dengan rapat, agar terlindung dari kelembaban, sinar, dan uap kimia. Setiap strip harus diamati sebelum digunakan untuk memastikan bahwa tidak ada perubahan warna. Keterbatasan lain dari carik celup adalah harus dipakai secara hati-hati. Strip harus dipakai dalam wadah tertutup rapat dilingkungan yang dingin dan terlindung dari kelembaban, sinar, dan uap kimia (Gandasoebrata, 2010).

1. **Metode asam sulfosalisitat 20%**

Tes dengan asam sulfosalisilat tidak besifat spesifik, meskipun sangat peka. Adanya protein dalam konsentrasi 0,002% dapat dinyatakan. Jika hasil tes negatif, maka hasil negatif proteinuria. Penilaian sekuantitatif dari tes ini ditentukan kemudian yang diuji adalah derajat kekeruhan sebelum dilakukan pemanasan (Gandasoebrata, 2010).

1. **Metode asam asetat 6%**

Asam asetat dapat juga digunakan untuk uji protein, pemberian asam asetat untuk mencapai titik isiolektrik protein. Dengan pemanasan mengakibatkan denaturasi dan terjadi presipitasi, proses presipitasi dibantu dengan adanya garam-garam yang telah ada dalam urine atau dengan sengaja ditambahkan pada urine. Metode ini cukup peka karena dapat menyatakan protein sebanyak 0,004% (Gandasoebrata, 2010).

1. **Tinjauan Umum Tentang Jeruk Nipis Sebagai Reagen Pemeriksaan**

Pemeriksaan protein urine merupakan pemeriksaan urin rutin. Salah satu cara yang digunakan untuk melakukan pemeriksaan ini adalah melalui pemanasan dengan asam asetat. Asam asetat atau asam cuka adalah senyawa organik yang mengandung gugus asam karboksilat yang dikenal sebagai pemberi rasa asam dan aroma dalam makanan (Wusnah, Meriatna, dan Lestari, 2018).

Prinsip pemeriksaan dengan metode asam asetat 6% ini di dasarkan pada adanya protein alam suasana asam lemah dan bila dipanaskan akan mengalami denaturasi dan terjadi endapan. Pada pemeriksaan protein urine ada dua tahap penting yang dilakukan yaitu pemanasan dan penambahan asam. Fungsi pemanasan adalah agar protein yang terdapat dalam urine mengalami denaturasi sehingga terbentuk presipitat atau endapan putih. Sedangkan fungsi penambahan asam adalah untuk mendekati titik isoelektrik protein didalam urine (Kurniawan, 2014)

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan tanaman yang sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai tanaman berkhasiat. Hal ini disebabkan karena komponen kimia yang terkandung dalam jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) seperti asam amino (triptofan dan lisin), asam sitrat, minyak atsiri (limonene, linalin asetat, geramil asetat, fellandren sitrat, lemon kamfer, kadinen, aktialdehid, anildehid), vitamin C, dan vitamin B1. Serta jeruk nipis mempunyai kandungan asam dengan pH 2.0 (Sarwono, 2001). Salah satu kandungan jeruk nipis adalah asam sitrat serta jeruk nipis mempunyai kandungan asam dengan pH 2.0 (Aswad, 2015). Asam sitrat pada jeruk nipis memungkinkan mendenaturasi protein pada urine saat pemanasan dan penambahan larutan air perasan jeruk nipis.

Asam amino yang terkandung dalam buah jeruk nipis adalah triptofan dan lisin. Triptofan dan lisin masing-masing mempunyai titik isoelektrik 5,89 dan 9,74. Lisin termasuk ke dalam asam amino polar yang memiliki sifat sebagai berikut, memiliki gugus R yang tidak bermuatan, dan bersifat hidrofilik, serta cenderung terdapat di bagian luar molekul protein. Sifat protein yang hidrofilik atau mampu menyerap air disebabkan oleh adanya rantai yang mempunyai gugus-gugus polar, seperti karbonil, hidroksil, amino, karboksil, dan sulfhidril, sehingga dapat membentuk ikatan hidrogen dengan air dengan jumlah dan tipe gugus-gugus polar yang berbeda maka kemampuan protein dalam menyerap air pun berbeda. Triptofan merupakan asam amino non polar dan bersifat hidrofobik. Asam amino non polar pada protein cenderung berada di bagian dalam molekul untuk meminimumkan interaksinya dengan molekul air di lingkungan (Suhartono, 2017).

1. **Tinjauan Umum Tentang Denaturasi Protein**
2. **Definisi Protein**

Protein adalah polimer yang terbentuk oleh untaian monomernya, yaitu asam amino melalui ikatan peptida. Oleh sebab itu, protein kerap juga polipeptida. Melalui urutan dan jenis asam amino penyusunnya, struktur dan karakter dari suatu protein dapat diperkirakan (Suhartono, 2017).

Adanya dua gugus yang dapat terionisasi membuat asam amino dapat bermuatan positif atau negatif (ion *zwitter*), bergantung pada tingkat keasaman (pH) di lingkungan. Sementara itu, gugus fungsi dari rantai samping yang terikat menentukan apakah asam amino bersifat polar atau nonpolar. Asam amino polar terbagi menjadi asam amino netral, asam (bermuatan negatif), basa (bermuatan positif) (Suhartono, 2017).

1. **Sifat-Sifat Protein**

Sifat fisikokimia setiap protein tidak sama, tergantung pada jumlah dan jenis asam aminonya. Protein memiliki berat molekul yang sangat besar sehingga bila protein dilarutkan dalam air akan membentuk suatu dispersi koloidal. Protein dapat dihidrolisis oleh asam, basa, atau enzim tertentu dan menghasilkan campuran asam-asam amino (Winarno, 2004). Sebagian besar protein bila dilarutkan dalam air akan membentuk dispersi koloidal dan tidak dapat berdifusi bila dilewatkan melalui membran semipermeabel. Beberapa protein mudah larut dalam air, tetapi ada pula yang sukar larut. Namun, semua protein tidak dapat larut dalam pelarut organik seperti eter, kloroform, atau benzena (Yazid, 2006).

Pada umumnya, protein sangat peka terhadap pengaruh-pengaruh fisik dan zat kimia, sehingga mudah mengalami perubahan bentuk. Perubahan atau modifikasi pada struktur molekul protein disebut denaturasi. Protein yang mengalami denaturasi akan menurunkan aktivitas biologi protein dan berkurannya kelarutan protein, sehingga protein mudah mengendap. Bila dalam suatu larutan ditambahkan garam, daya larut protein akan berkurang, akibatnya protein akan terpisah sebagai endapan. Apabila protein dipanaskan atau ditambahkan alkohol, maka protein akan menggumpal. Hal ini disebabkan alkohol menarik mantel air yang melingkupi molekul-molekul protein; selain itu penggumpalan juga dapat terjadi karena aktivitas enzim-enzim proteolitik (Yazid, 2006). Setiap jenis protein dalam larutan mempunyai pH tertentu yang disebut titik isoelektrik. Pada pH isoelektrik, molekul protein yang mempunyai muatan positif dan negatif yang sama, sehingga saling menetralkan atau bermuatan nol. Akibatnya protein tidak bergerak di bawah pengaruh medan listrik. Pada titik isoelektrik, protein akan mengalami pengendapan (koagulasi) paling cepat dan prinsip ini digunakan dalam proses-proses pemisahan atau pemurnian suatu protein (Yazid, 2006).

1. **Denaturasi Protein**

Denaturasi protein adalah fenomena transformasi struktur protein yang berlipat menjadi terbuka. Perubahan konformasi protein mempengaruhi sifat protein. Protein-protein yang terdenaturasi cenderung untuk membentuk agregat dan endapan yang disebut koagulasi. Tingkat kepekaan suatu protein terhadap pereaksi denaturasi tidak sama, sehingga sifat tersebut dapat digunakan untuk memisahkan protein yang tidak diinginkan dari suatu campuran dengan cara koagulasi (Estiasih dkk, 2016).

Penggumpalan protein dan endapan yang terbentuk dapat disebabkan oleh terjadinya koagulasi dan denaturasi protein. Denaturasi dapat mengubah sifat protein menjadi sukar larut dalam air. Penggumpalan ini dapat disebabkan oleh pemanasan, penambahan asam, penambahan enzim, dan adanya logam berat Penambahan asam asetat dilakukan setelah pemanasan pada suhu 80°C. Pemanasan lebih lanjut dan penambahan asam ini akan menyebabkan denaturasi rusaknya struktur protein sehingga protein akan mengendap. Denaturasi dapat diartikan sebagai perubahan atau modifikasi terhadap struktur sekunder, tersier dan kuartener molekul protein, tanpa terjadinya pemecahan ikatan-iaktan kovalen. Karena itu denaturasi dapat pula dikatakan sebagai suatu proses terpecahnya ikatan hydrogen interaksi hidrofobik, ikatan garam,dan terbentuknya lipatan (Triyono, 2010)

Pengendapan protein oleh asam asetat terjadi cukup cepat karena adanya panas. Pertama akan terjadi presipitasi yaitu pembentukan presipitat atau partikel kecil yang melayang dalam larutan dan dapat mengendap dalam waktu singkat. Presipitat tersebut akan saling tergabung membentuk agregat (partikel yang lebih besar) dari presipitat tapi belum mengendap. Jika jumlah agregat terus bertambah maka akan saling membentuk endapan. Adanya ion H+ menyebabkan sebagian jembatan atau ikatan peptida terputus. Dalam suasana asam, ion H+ akan bereaksi dengan gugus COO– membentuk COOH sedangkan sisanya (asam) akan berikatan dengan gugus amino NH2 membentuk NH3 + , sehingga apabila larutan peptida dalam keadaan isoelektris diberi asam akan menyebabkan bertambahnya gugus bermuatan yang membentuk afinitas terhadap air dan kelarutan dalam air (Triyono, 2010).

Denaturasi disebabkan oleh beberapa faktor antara lain:

1. Penyebab fisik
2. Panas

Ketika larutan protein dipanaskan secara bertahap di atas suhu kritis, protein mengalami transisi dari keadaan asli ke terdenaturasi. Mekanisme suhu menginduksi denaturasi protein cukup kompleks dan menyebabkan destabilisasi interaksi nonkovalen di dalam protein. Ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, dan gaya van der Waals bersifat eksotermis, sehingga mengalami destabilisasi pada suhu tinggi dan mengalami stabilisasi pada suhu rendah (Estiasih dkk, 2016).

1. Tekanan

Denaturasi akibat tekanan terjadi pada suhu 25⁰C jika tekanan yang diberikan cukup tinggi. Kebanyakan protein mengalami denaturasi pada tekanan 1-12 kbar. Tekanan dapat menyebabkan denaturasi protein karena protein bersifat fleksibel dan dapat dikompresi. Walaupun residu asam amino tersusun rapat di bagian dalam protein globular, biasanya masih terdapat rongga di dalam protein. Akibatnya, protein bersifat dapat dikompresi dan terjadi penurunan volume protein. Penurunan volume tersebut disebabkan rongga yang hilang dalam struktur protein dan hidrasi protein. Denaturasi akibat tekanan bersifat reversible (Estiasih dkk, 2016).

1. Pengadukan

Pengadukan mekanik kecepatan tinggi seperti pengocokan, pengulenan, dan pembuihan menyebabkan protein terdenaturasi. Banyak protein yang terdenaturasi dan mengalami presipitasi ketidak diaduk intensif. Denaturasi terjadi akibat inkorporasi udara dan adsorpsi molekul protein ke dalam antarmuka udara-cairan. Energi untuk antarmuka udara-cairan lebih besar dibandingkan fase curah sehingga protein mengalami perubahan konformasi dipengaruhi oleh fleksibilitas protein (Estiasih dkk, 2016).

1. Penyebab kimiawi
2. pH

Protein bersifat lebih stabil pada pH di titik isolelektrik dibandingkan pH lain. Pada pH netral, kebanyakan protein bermuatan negatif dan hanya sedikit yang bermuatan positif. Rendahnya gaya tolak elektrostatik dibandingkan interaksi yang lain, menjadikan kebanyakan protein bersifat stabil pada pH mendekati netral. Pada pH ekstrem, gaya tolak elektrostatik dalam molekul protein yang disebabkan muatan tinggi mengakibatkan struktur protein membengkak dan terbuka. Derajat terbukanya struktur protein lebih besar pada pH alkali dibandingkan pada pH asam. Pada kondisi alkali terjadi ionisasi gugus karboksil, fenolik, dan sulfihidril di bagian dalam protein sehingga struktur protein terbuka dengan tujuan mengekspos gugus tersebut pada fase air. Denaturasi protein akibat pH kebanyakan bersifat reversibel. Akan tetapi, pada sejumlah kasus hidrolisis ikatan peptida secara parsial, deamiadase residu asparagin dan glutamin, dan kerusakan gugus sulfihidril pada pH alkali dapat menyebabkan denaturasi protein yang bersifat irreversible (Estiasih dkk, 2016)

1. Pelarut organik

Pelarut organik mempengaruhi stabilitas interaksi hidrofobik protein, ikatan hidrogen, dan interaksi elektrostatik. Rantai samping residu asam amino nonpolar lebih larut pada pelarut organik dibandingkan air. Hal tersebut mengakibatkan interaksi hidrofobik menjadi melemah. Sebaliknya, stabilitas dan pembentukan ikatan hidrogen antarikatan peptida meningkat pada lingkungan dengan permisivitas rendah maka sejumlah pelarut organik dapat meningkatkan atau memperkuat pembentukan ikatan hidrogen antarikatan peptide (Estiasih dkk, 2016)

1. Senyawa organik

Sejumlah senyawa organik seperti urea dan guanidin hidroksida menyebabkan denaturasi protein. Urea dan guanidin pada konsentrasi tinggi membentuk ikatan hidrogen dan menyebabkan ikatan hidrogen dalam air menjadi terganggu. Rusaknya ikatan hidrogen antarmolekul air menjadikan air sebagai pelarut yang baik untuk residu nonpolar. Dampaknya adalah struktur protein terbuka dan terjadi pelarutan residu nonpolar dari bagian dalam molekul protein (Estiasih dkk, 2016)

1. Deterjen

Deterjen seperti *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) merupakan pendenaturasi protein yang kuat. Deterjen terikat kuat pada protein yang terdenaturasi sehingga menyempurnakan denaturasi. Akibatnya, denaturasi protein menjadi bersifat irreversible (Estiasih dkk, 2016)

1. Garam

Garam mempengaruhi stabilitas struktural protein. Hal ini berkaitan dengan kemampuan garam untuk mengikat air secara kuat dan mengubah sifat hidrasi protein. Pada konsentrasi rendah, garam menstabilkan struktur protein karena meningkatkan hidrasi protein dan terikat lemah pada protein (Estiasih dkk, 2016)

1. **Tinjauan Umum Tentang Titik Isoelektrik**

Titik isoelektris adalah saat dimana pada pH asam amino berada pada bentuk amfoter (*zwitter ion*), dan pada saat titik isoelektris ini kelarutan protein menurun dan mencapai angka terendah, protein akan mengendap dan menggumpal. Pada saat titik isoelektris ini jumlah kation dan anion yang terbentuk sama banyaknya. Berdasarkan struktur molekulnya, pada dasarnya asam amino merupakan senyawa yang bermuatan ganda atau *zwitter ion*, keadaan ini mudah berubah karena dipengaruhi oleh keadaan sekitar atau pH lingkungan. Pada pH rendah (suasana asam) asam amino akan bermuatan positif sedangkan pada pH tinggi (suasana basa) akan bermuatan negatif. Pada pH 4,8– 6,3 (pH isoelektris) asam amino akan berada pada keadaan dipolar atau ion zwitter. Pada keadaan ini kelarutan protein dalam air paling kecil sehingga protein akan menggumpal dan mengendap. (Suhartono, 2017).

Tabel 1

pH Isoelektrik Asam Amino

|  |  |
| --- | --- |
| Asam Amino | pH Isoelektrik |
| Glisin  | 5,97 |
| Alanin  | 6,01 |
| Valin | 5,97 |
| Leusin | 5,98 |
| Ileusin | 6,02 |
| Serin | 5,68 |
| Trionin | 5,87 |
| Metionin  | 5,74 |
| Fenilalanin | 5,48 |
| Triptofan | 5,89 |
| Asparagin | 5,41 |
| Glutamin | 5,65 |
| Prolin | 6,48 |
| Aspartat | 2,77 |
| Glutamat | 3,22 |
| Histidin | 7,59 |
| Sistein | 5,07 |
| Tirosin | 5,66 |
| Lisin | 9,74 |
| Arginin | 10,76 |

Sumber: (Suhartono, 2017).