

PENGARUH SODIUM CHLORIDE TERHADAP SIFAT TERMAL PROTEIN 30 kDa YANG DIISOLASI DARI BIJI MELINJO

[Effect of Sodium Chloride on Thermal Properties of 30 kDa Protein Isolated from Melinjo Seed]

Tri Agus Siswoyo

Pusat Penelitian Biologi Molekul dan Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian Universitas Jember

Diterima 20 Oktober 2006 / Disetujui 25 Mei 2007

ABSTRACT

The thermal properties of melinjo (*Gnetum gnemon*) protein were studied using differential scanning calorimetry. The melinjo protein obtained from crude seed protein was isolated using isoelectric precipitation method. The molecular weight of the protein isolate about 30 kDa as estimated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The thermogram of MSPI showed a major endothermic peak at 84.1°C and a minor transition at 109.5°C with enthalpy value of 0.52 and 0.32 J/g, respectively. The progressive increasing in major endothermic peak with increase in NaCl concentrations, which suggested a more compact conformation of MSPI with higher thermal stability. Treatment by heating the sample at 80°C for 5 min caused reduction of enthalpy value, indicated that MSPI denaturation occurred. In contrast, after MSPI combined with NaCl, the enthalpy value was increased, which showed that the of MSPI was more heat stable.

Key words: Melinjo, protein isolated, thermal, NaCl, enthalpy

PENDAHULUAN

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*), banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara Asia Tenggara lainnya sebagai penghasil tepung dari biji melinjo. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit dimana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Selain itu biji melinjo dapat digunakan sebagai pelapis atau campuran dalam pembuatan roti, biskuit atau dibuat kripik 'emping' setelah dikeringkan dibawah sinar matahari dan digoreng sebelum dikonsumsi. Tepung biji melinjo sangat potensial digunakan untuk berbagai tujuan. Akan tetapi, salah satu masalah yang timbul adalah tidak adanya informasi yang mendasar tentang interaksi antara komponen utama seperti pati, protein dan lipid. Interaksi antar komponen tersebut sangat berpengaruh terhadap sifat fisik tepung melinjo.

Di dalam sistem pangan, protein dapat berinteraksi dengan komponen yang lain seperti dengan pati dan lipid. Kebanyakan interaksi itu terjadi karena adanya perlakuan panas. Panas adalah salah satu perlakuan fisik yang mengakibatkan terjadinya denaturasi. Terjadinya perubahan terhadap struktur alami protein merupakan hal yang kritis terhadap sifat fungsionalnya seperti pembentukan gel, emulsifikasi dan pembentukan busa (Allen et al., 2002; Adebawale dan Lawal, 2003; Esra, 2005). Pelipatan dan pembukaan lipatan protein sangat berhubungan erat dengan perubahan entalpi (Privalov dan Khechinashvili, 1974; Kolakowski et al., 2001; Kelley dan McClements, 2003),

perubahan tersebut dapat diukur dengan menggunakan teknik *thermoanalytical* seperti *differential scanning calorimetry* (DSC). Analisis untuk puncak perubahan dapat digunakan sebagai penentuan terhadap transisi temperatur dan entalpi denaturasi seperti puncak maksimum temperatur dan luas areal puncak. DSC telah lama digunakan untuk mempelajari denaturasi akibat perubahan suhu pada beberapa jenis protein seperti kacang merah (Meng dan Ma, 2001), putih telur (Donovan et al., 1975), kedelai (Hermansson, 1979), gandum (Ruegg et al., 1977; De Wit dan Klarenbeck, 1984), β -lactoglobulin (De Wit dan Swinkels, 1980), jagung (Sandra et al., 2003), globulin pada oat (Ma dan Halwarkar, 1988) dan biji rami (Li-chan dan Ma, 2002).

Sodium merupakan jenis mineral penting untuk nutrisi dan diketahui sebagai koagulan protein (Watanabe dan Saio, 1973; Torikata et al., 1987) dan juga sebagai agen pekat (Lee dan Rha, 1977), dimana regulasi formasi kompleks protein-sodium sangat penting. Banyak peneliti telah mempelajari interaksi antara ion sodium dan beberapa jenis protein menggunakan beberapa metode yang berbeda (Sakakibara dan Noguchi, 1977; Kroll, 1984; Scilingo dan Anom, 1996; Meng dan Ma, 2001; Li-chan dan Ma, 2002).

Di dalam penelitian ini akan dikaji beberapa pengaruh panas dan variasi konsentrasi sodium terhadap sifat termal protein isolat dari biji melinjo dengan menggunakan DSC.

METODOLOGI

Persiapan sampel

Biji melinjo dihancurkan dengan menggunakan alat penghancur biji skala laboratorium (Ultra-Centrifugal Mill, Type ZM-1, Kurt Retsch GmbH & Co, Haan, Germany) dengan ukuran partikel <150 mesh. Penghilangan lemak pada tepung melinjo dilakukan dengan sohket dengan pelarut hexane selama 16 jam. Bubur tepung dikeringkan pada suhu ruangan selanjutnya dihancurkan kembali dengan menggunakan alat penghancur biji skala laboratorium (Ultra-Centrifugal Mill, Type ZM-1, Kurt Retsch GmbH & Co, Haan, Germany) dengan ukuran partikel <150 mesh. Tepung yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C sampai pada saat analisis.

Preparasi isolasi protein

Isolasi protein dilakukan dengan cara 10 g tepung melinjo yang telah dihilangkan lemaknya dilarutkan pada aquades yang mengandung 0.5 M NaCl. Larutan (tepung/air, 1:10, w/v) diatur pada pH 8.0 menggunakan 2N NaOH setelah itu larutan dikocok selama 2 jam pada suhu ruang dan secara periodik pH larutan diukur dan diatur kembali pada pH 8. Selanjutnya larutan disaring menggunakan kertas saring, filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh diatur pH nya sampai 4 menggunakan 2 N HCl. Endapan dipisahkan dengan menggunakan sentrifus dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C dan dilarutkan dengan menggunakan air bebas ion.

Perlakuan

Larutan isolat protein melinjo (MSPI) dengan konsentrasi 40% (w/v) diatur pH-nya pada pH 8 dan ditambahkan NaCl dengan konsentrasi antara 0.5 - 4 M atau 5.75 - 141.8 mg Na/ml larutan protein dan larutan MSPI yang tidak mengandung NaCl digunakan sebagai kontrol. Sampel yang mengandung 0.5 dan 1 M NaCl dipanaskan pada suhu 80°C selama 5 menit sebagai perlakuan panas.

Pengukuran total protein terlarut

Pengukuran total protein terlarut dilakukan sesuai dengan metode Bradford (1976) dengan Bovin Serum Albumin sebagai standarnya. Konsentrasi protein ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

Sodium decocyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE dilakukan sesuai dengan metode Laemmli (1970) dengan konsentrasi 12.5% akrilamid. Pewarnaan biru dilakukan menggunakan Coomassie Brilliant Blue. Standar massa molekul protein yang

digunakan antara lain myosin, β -galactosidase, albumin, aldolase, carbonic anhydrase dan myoglobin.

Differential scanning calorimetry (DSC)

Pengukuran sifat termal MSPI dilakukan dengan menggunakan DSC (Model DSC-60, Shimadzu Co., Ltd., Kyoto, Japan) dengan tipe perangkat lunak TA-60 WS Versi 1.11 untuk analisis termalnya. Kalibrasi kalorimeter menggunakan indium (melting point = 156.7°C, $\Delta H = 27.6$ J/g) dengan parafin cair sebagai referensinya (Zhang et al., 1992; Morita et al., 1996; Siswoyo dan Morita, 2001). Larutan MSPI (4-5 mg protein) dimasukkan pada kapsul aluminium DSC dan ditutup rapat. Selanjutnya, setiap sampel diukur menggunakan DSC dengan suhu awal 30 sampai 140°C. Temperatur awal (T_o), puncak (T_p), dan akhir (T_f) serta nilai enthalpi (ΔH) dari sampel digunakan untuk karakterisasi sifat termal sampel.

Analisis data

Analisis kurva dan sifat termal isolat protein berupa temperatur awal (T_o), puncak (T_p), dan akhir (T_f) serta nilai enthalpi (ΔH) ditentukan dengan menggunakan bantuan perangkat lunak komputer paket program TA-60 WS Versi 1.11. Data dari hasil analisis merupakan nilai rata-rata dari 3 kali ulangan dengan

$$\text{standar deviasi berdasarkan rumus} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

dimana $\bar{x}$, adalah rata-rata nilai sampel dan n adalah jumlah sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

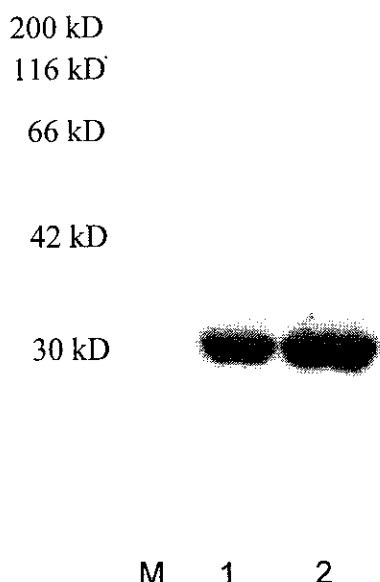
Isolasi protein melinjo

Hasil isolasi protein biji melinjo (MSPI) dengan menggunakan metode presipitasi isoelektrik dapat dilihat pada Tabel 1. Pada awal ekstraksi (pH 8) diperoleh jumlah protein sebesar 1674.16 mg dan setelah dilakukan presipitasi dengan mengatur pH sampai pada pH 4 menggunakan 2N HCl jumlah protein yang diperoleh yaitu 348.48 mg. Penurunan jumlah protein sebesar 80.07% dari semula menunjukkan adanya beberapa protein tertentu yang tidak terpresipitasi atau masih larut pada pH 4. Hal ini dapat dimungkinkan karena adanya perbedaan sifat fungsional pada setiap protein yang terkandung pada biji melinjo. Proses presipitasi sebagian protein ini terjadi karena adanya perubahan konfigurasi protein dimana terjadi peningkatan interaksi elektrostatis antar molekul protein sehingga interaksi antara protein dengan air menjadi menurun (Salcedo, 2002).

Tabel 1. Hasil tahapan isolasi protein melinjo

Tahapan	Total Volume (ml)	Total Protein (mg)	Hasil (%)
Protein kasar	73.33	1749.26	100
pH 8.0	78.00	1674.16	95.7
pH 4.0	24.40	348.48	28.3

Isolasi dengan metode ini dapat memperoleh protein murni yang cukup tinggi, secara kualitatif dapat dilihat pada **Gambar 1**. Hasil isolasi MSPI terlihat satu pita protein pada SDS-PAGE dengan estimasi berat molekul sekitar 30 kD, myosin, β -galactosidase, albumin, aldolase, carbonic anhydrase dan myoglobin sebagai standar.

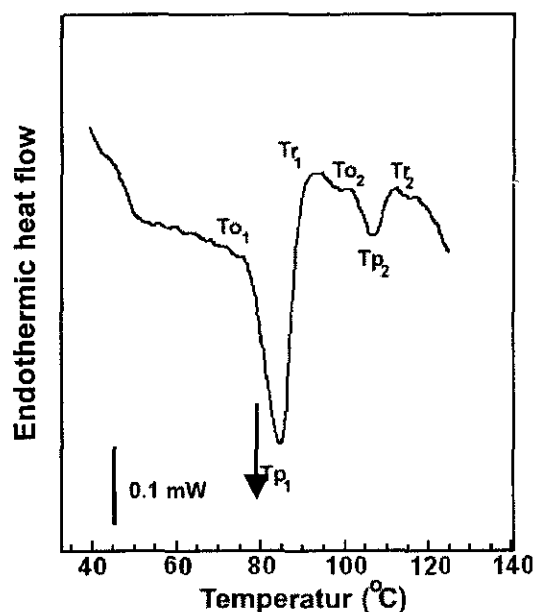


Gambar 1. Hasil SDS-PAGE analisis terhadap protein hasil isolasi dari biji melinjo. M. Marker protein, 1. 15 μ g protein, 2. 30 μ g protein

Sifat termal

Analisis sifat termal MSPI dilakukan dengan menggunakan DSC. Termograph DSC yang dihasilkan menunjukkan dua puncak, puncak utama adalah endotermik protein asli dengan kisaran temperatur 84.1°C dengan nilai entalpi sebesar 0.52 J/g, sedangkan puncak endotermik kedua berkisar 109.5°C dengan nilai entalpi sebesar 0.32 J/g (Gambar 2). Puncak temperatur utama pada MSPI ini mempunyai kisaran yang hampir sama dengan protein pada beberapa jenis biji-bijian seperti kedelai (89°C), kacang panjang (94°C), kacang hijau (90.5°C) dan kacang babi (89°C) (Wright dan Boulter, 1980). Selain itu pula nilai entalpi pada puncak pertama lebih besar dibandingkan dengan puncak ke dua, hal ini dimungkinkan karena protein MSPI didominasi oleh protein 30 kD (Gambar 1) sedangkan terbentuknya puncak temperatur ke dua dengan nilai entalpi lebih rendah kemungkinan terjadi proses pembentukan protein dengan konfigurasi baru selama proses isolasi (metode presipitasi pH). Protein dengan

konfigurasi baru tersebut dapat terjadi karena adanya interaksi hidrofobik antara molekul-molekul protein yang ada (Wright et al., 1977; Arntfield dan Murray, 1981; Salcedo, 2002).

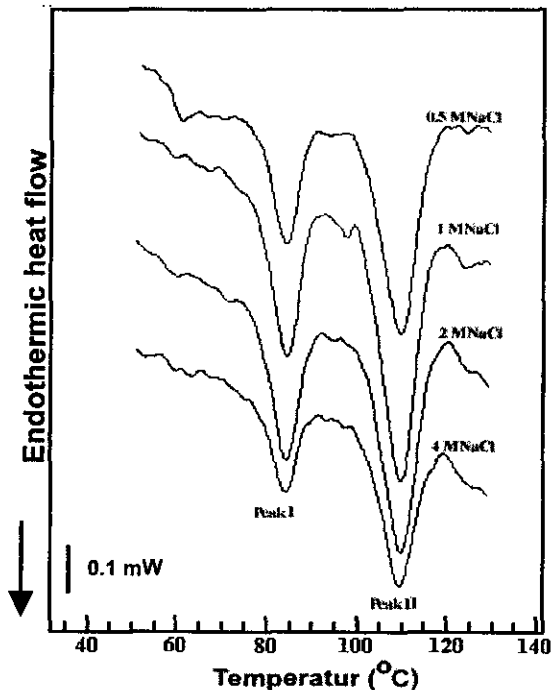


Gambar 2. Termograph DSC dari isolat protein dari biji melinjo. T_0 , Temperatur awal; T_p , Temperatur puncak; T_r , Temperatur balik.

Hasil SDS-PAGE analisis terhadap protein hasil isolasi dari biji melinjo. Pengaruh konsentrasi NaCl

Pengaruh penambahan NaCl pada sampel menunjukkan peningkatan suhu stabilitas sampel dan peningkatan nilai entalpi ΔH_2 . Karakter termal protein MSPI dapat ditunjukkan pada Gambar 3. DSC termogram untuk puncak temperatur (T_p) antara I dan II lebih cenderung tidak berubah antara 83.6 sampai 84.5°C dan 106.7 sampai 109.5°C akan tetapi pada Tabel 2 nilai entalpi (ΔH_1) menunjukkan kecenderungan mengalami penurunan dari 0.52 sampai 0.23 J/g, sedang nilai ΔH_2 mengalami peningkatan dari 0.32 sampai 0.96 J/g.

Pengaruh peningkatan konsentrasi NaCl pada karakter termal DSC termogram terutama penurunan entalpi ΔH_1 dan peningkatan ΔH_2 dengan puncak temperatur yang meningkat mengindikasikan bahwa NaCl dapat meningkatkan stabilitas protein MSPI. Hasil ini juga dapat ditemukan pada jenis protein dari oat (Harwalker dan Ma, 1987) dan kacang babi (Arntfield et al., 1986).



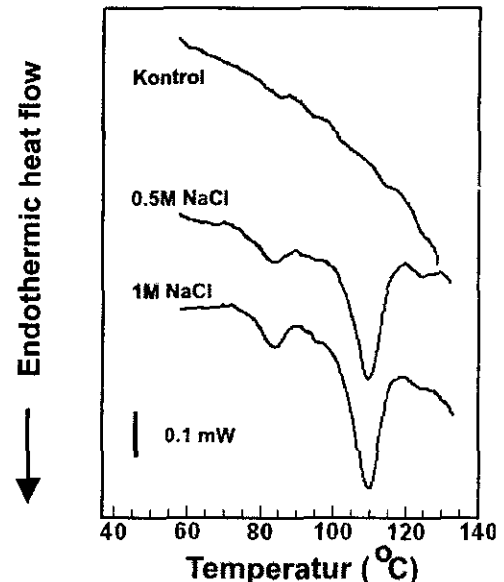
Gambar 3. DSC termogram isolat protein melinjo akibat pengaruh penambahan NaCl.

Selanjutnya Salcedo (2002) menjelaskan, peningkatan stabilitas protein dapat diakibatkan oleh adanya perubahan elektrostatis respon atau induksi perubahan struktur air disekitar protein sehingga tingkat hidrasi protein menjadi meningkat dan juga jika konsentrasi NaCl terus ditingkatkan akan mengakibatkan

kelarutan protein menjadi menurun dan terbentuk agregat (Sathe dan Sze, 1997).

Pengaruh pemanasan

Pengaruh pemanasan terhadap protein MSPI kontrol pada suhu 80°C selama 5 menit setelah dianalisis menggunakan DSC, tidak menunjukkan adanya puncak temperatur atau endotermik respon ($\Delta H=0$) (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa protein MSPI mengalami denaturasi selama masa pemasanan.



Gambar 4. Termogram isolat protein melinjo akibat pengaruh pemanasan dan penambahan NaCl.

Tabel 2. Pengaruh penambahan NaCl terhadap sifat termal dan nilai entalpi isolat protein dari biji melinjo

	Puncak I			
	T_{o1} (°C)	T_{p1} (°C)	T_{r1} (°C)	ΔH_1 (J/g)
Protein Kontrol	77.7±0.5	84.5±0.1	89.2±1.0	0.52±0.12
Protein + 0.5 M NaCl	78.1±0.7	83.6±1.0	88.7±0.3	0.53±0.06
Protein + 1 M NaCl	78.8±0.2	84.4±0.2	89.0±0.4	0.45±0.03
Protein + 2 M NaCl	79.4±0.1	84.3±0.1	89.4±0.1	0.38±0.04
Protein + 4 M NaCl	79.5±0.2	84.2±0.2	88.7±0.5	0.23±0.02
	Puncak II			
	T_{o2} (°C)	T_{p2} (°C)	T_{r2} (°C)	ΔH_2 (J/g)
Protein Kontrol	102.5±2.0	106.7±2.0	110.3±0.4	0.32±0.1
Protein + 0.5 M NaCl	101.4±0.2	109.5±0.1	115.4±1.0	0.78±0.1
Protein + 1 M NaCl	101.9±1.3	109.5±0.1	115.0±1.0	0.85±0.1
Protein + 2 M NaCl	101.9±1.5	109.5±0.1	116.3±2.0	0.88±0.2
Protein + 4 M NaCl	101.9±1.2	109.3±0.2	116.0±1.0	0.96±0.3

^a Rata-rata±SD (n=3). T_o , temperatur awal; T_p , temperatur puncak; T_r , temperatur akhir; ΔH_1 , nilai entalpi puncak I; ΔH_2 , nilai entalpi puncak II.

Sementara itu, pada protein MSP1 yang mengandung NaCl menunjukkan karakter endotermik protein MSP1 asli (sebelum dipanaskan) dengan dua puncak temperatur (T_{p1} dan T_{p2}) dan dua endotermik transisi (ΔH_1 dan ΔH_2). Pada Table 3 menunjukkan suatu perubahan nilai entalpi baik ΔH_1 maupun ΔH_2 , jika dibandingkan dengan protein MSP1 asli (Gambar 2), ΔH_1 mengalami penurunan sampai dengan nol ($\Delta H_1 = 0$), sedangkan penambahan NaCl hanya mampu mempertahankan nilai enthalpi sebesar 0.16 – 0.17 J/g. Hal ini berbeda dengan nilai entalpi yang dihasilkan oleh ΔH_2 , peningkatan konsentrasi NaCl dapat meningkatkan nilai ΔH_2 sebesar 0.89 J/g untuk penambahan 0.5 M NaCl dan 0.91 J/g untuk penambahan 1.0 M NaCl.

Dari hasil yang diperoleh dapat dinyatakan bahwa penambahan NaCl dapat meningkatkan stabilitas protein MSP1 pada suhu tinggi, hal ini dimungkinkan karena NaCl dapat memberikan suatu kontrol terhadap keseimbangan antara polar dan nonpolar protein kearah pembagian residu non-polar (Bigelow, 1967). Konfigurasi protein akibat penambahan NaCl memberikan pengaruh terhadap interaksi elektrostatis antara polar dan non-polar group, dan juga interaksi hidropobik melalui modifikasi struktur air dan protein (Arakawa dan Timasheff, 1982). Peningkatan konsentrasi NaCl mengakibatkan kelarutan protein makin berkurang dan mengakibatkan terbentuknya agregat molekul protein

yang merupakan hasil dari kompetisi antara molekul air dan protein sehingga stabilitas protein dapat ditingkatkan (Morrissey et al., 1987).

KESIMPULAN

Karakter endotermik isolat protein 30 kD dari biji melinjo dengan menggunakan DSC analisis menunjukkan satu puncak temperatur utama (84°C) dan satu puncak minor (109.5°C) dengan dua endotermik transisi. Pengaruh peningkatan konsentrasi NaCl dan pemanasan pada karakter termal DSC termogram terjadi penurunan entalpi pada puncak pertama dan peningkatan entalpi pada puncak kedua dengan temperatur yang meningkat. Hal ini mengindikasikan bahwa NaCl dapat meningkatkan stabilitas termal isolat protein 30 kD dari biji melinjo.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Naofumi Morita (Osaka Prefecture University, Japan) atas fasilitas yang diberikan selama penelitian.

Tabel 3. Pengaruh pemanasan dan konsentrasi NaCl terhadap sifat termal isolat protein dari biji melinjo

Puncak I				
	T_{01} (°C)	T_{p1} (°C)	T_{r1} (°C)	ΔH_1 (J/g)
Protein Kontrol	ND	ND	ND	ND
Protein + 0.5 M NaCl	78.1±0.7	83.6±1.0	88.3±0.3	0.16±0.6
Protein + 1 M NaCl	78.2±0.2	84.2±0.2	88.3±0.4	0.17±0.2
Puncak II				
	T_{02} (°C)	T_{p2} (°C)	T_{r2} (°C)	ΔH_2 (J/g)
Protein Kontrol	ND	ND	ND	ND
Protein + 0.5 M NaCl	102.3±0.9	109.7±0.1	115.7±1.0	0.89±0.1
Protein + 1 M NaCl	102.2±1.3	109.9±0.1	114.9±1.0	0.91±0.1

^a Rata-rata±SD (n=3). ND, not detectable; T_0 , temperatur awal; T_p , temperatur puncak; T_r , temperatur akhir; ΔH_1 , nilai entalpi puncak I; ΔH_2 , nilai entalpi puncak II.

DAFTAR PUSTAKA

- Adebowale, K. O. dan Lawal, O. S. 2003. Foaming, Gelation and Electrophoretic Characteristics of Mucuna Bean (*Mucuna pruriens*) Protein Concentrates. Food Chemistry. 83,237-246.
- Allen E. F., Jack, P. D., Dany D. dan Matthew K. M. 2002. Advances in Modifying and Understanding Whey Protein Functionality.Trend in Food Science and Technology. 13,151-159.
- Arakawa, J. dan Timasheff, S. N. 1982. Preferential Interactions of Proteins with Salt in Concentrated Solutions. Biochemistry, 21, 6545-6552.
- Arntfield, S. D. dan Murray, E. D. 1981. The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality. I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 14, 289-294.
- Arntfield, S. D., Murray, E. D. dan Ismond, M. A. H. 1986. Effect of Salt on The Thermal Stability of Storage Proteins from Fababean (*Vicia faba*). Journal of Food Science, 51, 371-377.
- Bigelow, C. C. 1967. On the Average Hydrophobicity of Proteins and the Relationship Between It and Protein Structure. Journal of Theoretical Biology, 16, 187-211.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. J. Anal. Biochem. 72,248-254.
- De Wit, J. N. dan Swinkels, G. A. M. 1980. A Differential Scanning Calorimetric Study of The Thermal Denaturation of Bovine Lactoglobulin. Thermal Behaviors at Temperatures Up to 100 °C. Biochim. Biophys. Acta 624, 40-50.
- De Wit, J. N. dan Klarenbeck, G. 1984. Effects of Various Heat Treatments on Structure and Solubility of Whey Proteins. J. Dairy Sci., 67, 2701-2710.
- Donovan, J. W., Maxes, C. J., Davis, J. G. dan Garbaldi, J. A. 1975. A Differential Scanning Calorimetric Study of Egg White to Heat Denaturation. J. Sci. Food Agric. 26, 73-83.
- Esra, I. 2005. Effect of Hydrocolloids on The Thermal Denaturation of Proteins. Food Chemistry, 90, 621-626.
- Harwalkar, V. R. dan Ma, C.-Y. 1992. Evaluation of Interactions of β -lactoglobulin by Differential Scanning Calorimetry. In H. Visser (Ed.), Protein interactions (pp. 359-378). Weinheim: VCH Publishers.
- Hermansson, A. M. 1978. Physico-chemical Aspects of Soy Proteins Structure Formation. J. Text. Stud., 9, 33-58.
- Kelley, D. dan McClements, D. J. 2003. Interactions of Bovine Serum Albumin with Ionic Surfactants in Aqueous Solutions, Food hydrocolloids.17, 73-85.
- Kolakowski, P., Dumay, E. dan Cheftel, J. C. 2001. Effects of High Pressure and Low Temperature on β -lactoglobulin Unfolding and Aggregation. Food hydrocolloids. 15, 215-232.
- Kroll, R. D. 1984. Effect of pH on the Binding of Calcium Ions by Soybean Proteins. Cereal Chem. 61, 490-495.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. 227, 680-685.
- Lee, Ch. dan Rha, Ch. 1977. Thickening of Soy Protein Suspensions with Calcium. J. Text. Stud., 7, 441-449.
- Li-Chan, E.C.Y. dan Ma, C.Y. 2002. Thermal Analysis of Flaxseed (*Linum usitatissimum*) Protein by Differential Scanning Calorimetry. Food Chemistry. 77, 495-502.
- Ma, C.-Y. dan Halwarkar, V. R. 1988. Studies of Denaturation of Oat Globulin by Differential Scanning Calorimetry. J. Food Sci., 53, 531-534.
- Meng, G. T. dan Ma, C. Y. 2001. Thermal Properties of *Phaseolus angularis* (red bean) Globulin. Food Chemistry. 73:453-460.
- Morita N., Nakata, K., Hamauzu, Z. dan Toyosawa, I. 1996. Effect of α -Glucosyl Rutin As Improvers For Wheat Dough and Breadbaking. Cereal Chem., 73, 99-104.
- Morrissey, P. A., Mulvihill, D. M. dan O'Neill, E. M. 1987. Functional Properties of Muscle Proteins. In B. J. F. Hudson (Ed.), Development in food proteins (Vol. 5) (pp. 195-256). London:Elsevier Applied Science.
- Privalov, P. L. dan Khechinashvili, N. N. 1974. A Thermodynamic Approach To The Problem of Stabilization of Globular Proteins: A Calorimetric Approach. J. Mol. Biol. 86, 665-684.
- Ru egg, M., Moor, U. dan Blanc, B. 1977. A Calorimetric Study of Thermal Denaturation of Whey Proteins In Simulated Milk Ultrafiltrate. J. Dairy Res., 44, 509-520.
- Sakakibara, M. dan Noguchi, H. 1977. Interaction of 11S Fraction of Soybean Protein with Calcium Ion. Agric. Biol. Chem., 41, 1575-1580.

- Salcedo-chaávez, B., Osuna-castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domiáñez-domiáñez, J. dan O. Paredes-Loápez. 2002.** Optimization of the Isoelectric Precipitation Method to Obtain Protein Isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. *J. Agri. Food Chem.* 50, 6515-6520.
- Sandra, S. A., Ernesto M. M. dan Ma. Angeles V. L. 2003.** Study of Denaturation of Corn Proteins During Storage Using Differential Scanning Calorimetry. *Food Chemistry.* 83, 531-540.
- Sathe, S.K. dan Sze, K.W.C. 1997.** Thermal Aggregation of Almond Protein Isolate. *Food Chemistry,* 59, 95-99.
- Scilingo, A.A. dan Anom, M.C. 1966.** Calorimetric Study of Soybean Protein Isolate: Effect of Calcium and Thermal Treatment. *J. Agri. Food Chem.* 44, 3751-3756.
- Siswoyo, T.A. dan Morita, N. 2002.** Thermal Properties and Kinetic Parameters of Amylose-Glycerophosphatidylcholine Complexes with Various Acyl Chain Lengths. *Food Research International,* 35, 737-744.
- Torikata, Y., Ishihara, J. dan Yano, T. 1987.** Protein Coagulation Through Reversible and Irreversible Bindings of Calcium. *Agric. Biol.Chem.,* 51. 707-714.
- Watanabe, T. dan Saio, K. 1973.** Tofu. *J. Chem. Biol.,* 11, 32-36.
- Wright, D.J. dan Boulter, D. 1980.** Differential Scanning Calorimetric Studies of Meals and Constituents of Some Food Grain Legumes. *J. Sci. Food Agric.* 31, 1231-1241.
- Zhang, W. dan Jackson, D.S. 1992.** Retrogradation Behavior of Wheat Starch Gels with Differing Molecular Profiles. *J. Food Sci.,* 57, 1429-1432.