



**ANALISIS KADAR PROTEIN DAN IDENTIFIKASI  
ASAM AMINO PADA IKAN PATIN (*Pangasius djambal*)**

**SKRIPSI**

Oleh:

**Meirinda Hermiastuti**

**NIM 081810301047**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**



**ANALISIS KADAR PROTEIN DAN IDENTIFIKASI  
ASAM AMINO PADA IKAN PATIN (*Pangasius djambal*)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

**Meirinda Hermiastuti**  
**NIM 081810301047**

**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2013**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Padmiasih Sri Mulyani, Ayahanda Heru Aguston, dan Adikku Sasongko Kurniawan;
2. Nenekku Sumiati dan Kakekku Sunandar;
3. guru-guruku di TK Kemala Bhayangkari, SD Negeri Citrodiwangsan 02, SMP Negeri 1 Sukodono, dan SMF Jember;
4. Almamater Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTTO

Tuntutlah ilmu, sesungguhnya menuntut ilmu adalah pendekatan diri kepada Allah Azza wajalla, dan mengajarkannya kepada orang yang tidak mengetahuinya adalah sodaqoh. Sesungguhnya ilmu pengetahuan menempatkan orangnya, dalam kedudukan terhormat dan mulia (tinggi). Ilmu pengetahuan adalah keindahan bagi ahlinya di dunia dan di akhirat. (HR. Ar-Rabii')<sup>1)</sup>

---

<sup>1)</sup> Almath, M. F. 2005. 1100 Hadits Terpilih (Sinar Ajaran Muhammad). Gema Insani Press: 206. [serial on line]. [http://books.google.co.id/books?id=Gbl1exn\\_1YJoC&dq=tahun+terbit+1100+Hadits+Terpilih&hl=id&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.co.id/books?id=Gbl1exn_1YJoC&dq=tahun+terbit+1100+Hadits+Terpilih&hl=id&source=gbs_navlinks_s). [21 Januari 2013].

## **PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Meirinda Hermiastuti

NIM : 081810301047

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis Kadar Protein dan Identifikasi Asam Amino pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Mei 2013

Yang menyatakan,

Meirinda Hermiastuti

NIM 081810301047

**SKRIPSI**

**ANALISIS KADAR PROTEIN DAN IDENTIFIKASI  
ASAM AMINO PADA IKAN PATIN (*Pangasius djambal*)**

Oleh:

**Meirinda Hermiastuti  
NIM 081810301047**

**Pembimbing**

**Dosen Pembimbing Utama : Ika Oktavianawati, S.Si, M.Sc.**

**Dosen Pembimbing Anggota : I Nyoman Adi Winata, S.Si, M. Si**

## PENGESAHAN

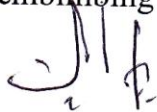
Skripsi berjudul “Analisis Kadar Protein dan Identifikasi Asam Amino pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal : **SENIN '10 JUN 2013**

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji:

Dosen Pembimbing Utama,



Ika Oktavianawati, S.Si, M.Sc.  
NIP 198010012003122001

Dosen Pembimbing Anggota,



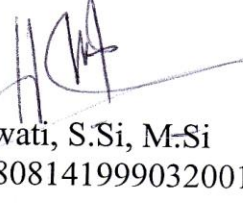
I Nyoman Adi Winata, S.Si, M. Si  
NIP 197105011998021002

Penguji I,



Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D.  
NIP 195910091986021001

Penguji II,



Asnawati, S.Si, M.Si  
NIP 196808141999032001



Mengesahkan  
Dekan FMIPA,

Drs. Kusno DEA, Ph.D  
NIP 196101081986021001

## RINGKASAN

**Analisis Kadar Protein dan Identifikasi Asam Amino pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*);** Meirinda Hermiastuti, 081810301047; 2013: 32 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Perikanan merupakan salah satu sektor yang potensial sebagai sumber protein bagi masyarakat Indonesia. Sumbangan perikanan Indonesia tidak dapat dipisahkan dari perkembangan perikanan budidaya. Pada tahun 2000 hingga 2008 perikanan budidaya mengalami pelonjakan produksi hampir mencapai 400%. Salah satu komoditas perikanan budidaya yang berprospek cerah adalah ikan patin (*Pangasius djambal*). Ikan Patin (*P. djambal*) merupakan salah satu spesies ikan air tawar dari jenis Pangasidae yang memiliki kadar protein tinggi (14,53%). Tingginya kadar protein dipengaruhi oleh asupan pakan yang dikonsumsi ikan. *Azolla pinnata* dan probiotik, umum ditambahkan bersama pakan ikan. *A. Pinnata* (matalele) merupakan tumbuhan dari jenis paku air yang memiliki kandungan asam amino esensial yang lengkap, sedangkan probiotik merupakan mikroba yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi kesehatan dan kehidupan inang. Pemberian probiotik dalam pakan, berpengaruh terhadap kecepatan fermentasi pakan dalam saluran pencernaan, sehingga akan sangat membantu proses penyerapan makanan dalam pencernaan ikan.

Berdasarkan keterangan diatas, timbul pemikiran bahwa asupan pakan ikan berupa *A. pinnata* dan probiotik akan memberikan perbedaan kandungan protein dan asam amino dalam daging ikan patin. Penelitian ini dirancang untuk menganalisis kandungan kadar protein menggunakan metode Kjeldahl dan identifikasi jenis asam amino menggunakan alat LC-MS.

Pada penelitian ini sampel ikan yang diperoleh dari tim PMW Universitas Jember 2012, merupakan ikan patin yang telah diberi perlakuan variasi pakan. Terdapat tiga variasi pakan yang telah dilakukan, antara lain: pellet; pellet dan tambahan pakan *A. Pinnata*; serta pellet dicampur probiotik. Variasi pakan ini



memberikan perbedaan kadar protein kasar pada dagingnya berturut-turut adalah 14,62%; 13,35%; 15,74%. Perbedaan kadar protein pada daging ikan, menunjukkan bahwa jenis pakan berpengaruh dalam produksi protein pada ikan.

Isolasi protein dilakukan dengan metode *alkali-aided protein extraction* pada kecepatan 12000 rpm dan pH 10,5. Isolat protein yang diperoleh dihidrolisis dengan HCl 6 N dan hasilnya dianalisis dengan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometer*). Untuk konfirmasi proses hidrolisis protein digunakan metode Bradford. Hasil analisis LC-MS menunjukkan bahwa jenis asam amino penyusun protein ikan patin yang diberi perlakuan variasi pakan hampir sama. Terdapat 13 asam amino penyusun protein pada ikan patin yang diberi pakan pellet dengan asam amino dominannya triptofan. Ikan patin yang diberi pakan pellet dan tambahan *A. pinnata* mengandung 14 jenis asam amino dan kandungan asam amino yang dominan adalah asparagin. Sementara itu ikan patin yang diberi pakan pellet dicampur probiotik mengandung 13 jenis asam amino dan asam glutamat adalah asam amino yang dominan.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Kadar Protein dan Identifikasi Asam Amino pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusun skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Akademik, I Nyoman Adi Winata, S.Si, M. Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
2. Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D., selaku Dosen Penguji I, dan Asnawati, S.Si., M.Si, selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktu untuk memberikan koreksi, kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. bapak/ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember yang telah memberikan ilmu yang sangat bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini;
4. keluarga besarku yang telah memberikan motivasi, doa dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
5. tim PMW Ikan Patin yang telah memberikan izin dalam pengambilan sampel;
6. Prof. Bambang Sugiharto, D.Agr, Sc, M.Agr, Sc yang telah memberikan izin dalam peminjaman alat;
7. bapak/ibu teknisi seluruh laboratorium Jurusan Kimia dan Teknisi Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember yang telah mendampingi dalam proses penelitian;
8. rekan kerjaku Laskar Patin (Alviona Noer Isnani, Dodik Andinata, dan Novita Rahmawati) yang telah membantu, memberikan perhatian, semangat dan doa;

9. sahabat-sahabatku Devy Jayanti Kartikasari dan Nine Crew (Fendra Nicola, Alfisa Surya Primaswara, Nurul Azizah, Muhammad Ali Mas'ud, Johan Prasetyo, Yanuard Arie Bungsu) yang telah membantu, memberikan perhatian, semangat dan doa;
10. teman-temanku tercinta Agustin Retnosari, Ucik Gita Parasmita, seluruh teman-teman wongkim 08, BS group, dan anak tante yang telah membantu, memberikan perhatian, semangat dan doa;
11. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Mei 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING SKRIPSI</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Batasan Masalah</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Tujuan Penelitian</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5 Manfaat Penelitian</b> .....	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Ikan Patin</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Pakan</b> .....	<b>6</b>
2.2.1 <i>Azolla pinnata</i> (matalele) .....	<b>7</b>
2.2.2 Probiotik .....	<b>8</b>
<b>2.3 Protein</b> .....	<b>9</b>
2.3.1 Isolasi protein .....	<b>10</b>

2.3.2	Analisis Kuantitatif Protein .....	11
<b>2.4</b>	<b>Asam Amino .....</b>	<b>13</b>
2.4.1	Analisis kualitatif dan kuantitatif asam amino .....	16
<b>BAB 3.</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Waktu dan Tempat Penelitian.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Alat dan Bahan.....</b>	<b>17</b>
3.2.1	Alat.....	17
3.2.2	Bahan .....	17
<b>3.3</b>	<b>Diagram Alir Penelitian .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Prosedur Kerja Penelitian .....</b>	<b>19</b>
3.4.1	Preparasi sampel .....	19
3.4.2	Penentuan N-Total cara Kjeldahl .....	19
3.4.3	Isolasi protein .....	20
3.4.4	Penentuan protein terlarut metode Bradford .....	20
3.4.5	Hidrolisis protein .....	21
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimasi pH pada isolasi protein .....</b>	<b>22</b>
4.1.1	Rendemen isolat .....	22
4.1.2	Kadar protein kasar pada isolat .....	23
<b>4.2</b>	<b>Pengaruh pakan terhadap kadar protein pada ikan .....</b>	<b>24</b>
4.2.1	Rendemen isolat .....	25
4.2.2	Kadar protein kasar pada isolat .....	25
4.2.3	Hidrolisis protein .....	27
4.2.4	Kadar protein terlarut pada isolat .....	28
4.2.5	Analisa kualitatif dan kuantitatif asam amino .....	30
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2</b>	<b>Saran.....</b>	<b>32</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>33</b>

<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>37</b>
-----------------------	-----------

## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi daging ikan patin segar .....	6
2.2 Jenis asam amino esensial yang terkandung dalam <i>A. pinnata</i> .....	8
2.3 Faktor konversi .....	11
2.4 Jenis-jenis asam amino .....	14
4.1 Jenis dan jumlah asam amino dalam isolat daging ikan patin.....	31

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Ikan patin ( <i>P. djambal</i> ) .....	5
2.2 Matalele ( <i>A. pinnata</i> ) .....	7
2.3 Hidrolisis protein menghasilkan asam amino bebas.....	10
2.4 Skema reaksi analisa protein menggunakan metode Bradford .....	12
2.5 Struktur umum asam amino .....	13
4.1 Rendemen isolat ikan patin pada optimasi pH .....	23
4.2 Kadar protein kasar isolat pada optimasi pH .....	24
4.3 Rendemen isolat pada masing-masing variasi pakan .....	25
4.4 Kadar protein kasar isolat pada masing-masing variasi pakan.....	26
4.5 Kadar protein kasar daging ikan patin pada masing-masing variasi pakan.....	26
4.6 Kadar protein terlarut sebelum dan setelah proses hidrolisis pada masing-masing variasi pakan .....	29



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<b>A. Optimasi pH pada isolasi protein .....</b>	<b>37</b>
<b>A.1 Rendemen Isolat.....</b>	<b>37</b>
<b>A.2 Kadar protein kasar pada isolat.....</b>	<b>38</b>
<b>B. Pengaruh pakan terhadap kadar protein pada ikan .....</b>	<b>39</b>
<b>B.1 Rendemen isolat .....</b>	<b>39</b>
<b>B.2 Kadar protein kasar pada isolat.....</b>	<b>40</b>
<b>B.3 Kadar protein kasar pada daging ikan .....</b>	<b>41</b>
<b>B.4 Standar BSA (<i>Bovine serum albumin</i>) .....</b>	<b>42</b>
<b>B.5 Kadar protein terlarut pada isolat .....</b>	<b>43</b>
<b>C. Analisa asam amino menggunakan LC-MS.....</b>	<b>45</b>
<b>C.1 Informasi alat UPLC-QTOF-MS/MS System (Waters) .....</b>	<b>45</b>
<b>C.2 Jenis dan jumlah asam amino dalam isolat daging         ikan patin.....</b>	<b>46</b>
<b>D. Pembuatan Larutan.....</b>	<b>47</b>
<b>D.1 Larutan HCl 6 N .....</b>	<b>47</b>
<b>D.2 Larutan HCl 2 N .....</b>	<b>47</b>
<b>D.3 Larutan HCl 0,1 N .....</b>	<b>48</b>
<b>D.4 Larutan HCl 0,02 N .....</b>	<b>49</b>
<b>D.5 Larutan HCl 0,01 N .....</b>	<b>50</b>
<b>D.6 Larutan NaOH 40 % (w/w) .....</b>	<b>50</b>
<b>D.7 Larutan NaOH 2 N .....</b>	<b>51</b>
<b>D.8 Larutan NaOH 0,5 N .....</b>	<b>51</b>
<b>D.9 Larutan NaOH 0,01 N.....</b>	<b>52</b>
<b>D.10 Larutan indikator fenolftalein (PP).....</b>	<b>53</b>
<b>D.11 Larutan indikator <i>metil orange</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>D.12 Larutan indikator <i>brom cressol green</i> .....</b>	<b>53</b>

<b>D.13 Larutan indikator <i>metil red</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>D.14 Larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1% (w/v).....</b>	<b>54</b>
<b>E. Sertifikat.....</b>	<b>55</b>
<b>E.1 Surat Keterangan Identifikasi Ikan Patin.....</b>	<b>55</b>
<b>E.2 Surat Keterangan Identifikasi <i>Azolla pinnata</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>E.3 Sertifikat Hasil Uji LC-MS Sampel Pellet .....</b>	<b>57</b>
<b>E.4 Sertifikat Hasil Uji LC-MS Sampel <i>A. pinnata</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>E.5 Sertifikat Hasil Uji LC-MS Sampel Probiotik .....</b>	<b>59</b>

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Wilayah Indonesia terdiri atas daratan dan perairan. Hampir 70% wilayah Indonesia terdiri atas perairan. Perikanan merupakan salah satu sektor yang potensial sebagai sumber protein masyarakat Indonesia. Sumbangan perikanan Indonesia tidak dapat dipisahkan dari perkembangan perikanan budidaya, yang tumbuh secara signifikan dari tahun ke tahun. Warta Pasar Ikan edisi Mei 2011 menuliskan bahwa pada tahun 2000 hingga 2008 perikanan tangkap tumbuh hanya sekitar 25%, pada periode yang sama produksi perikanan budidaya telah melonjak hampir mencapai 400%.

Salah satu komoditas perikanan budidaya yang berprospek cerah adalah ikan patin (*Pangasius djambal*). Ikan patin merupakan jenis ikan konsumsi air tawar asli Indonesia yang tersebar di sebagian wilayah Sumatera dan Kalimantan (Susanto dan Amri, 2002). Daging ikan patin memiliki rasa yang khas, enak, lezat dan gurih sehingga digemari oleh masyarakat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Maghfiroh (2000), komposisi daging ikan patin terdiri dari 14,53 % protein, 1,09 % lemak, 0,74 % abu, dan 82,22% air. Tingginya kadar protein yang terkandung dalam daging ikan patin tersebut dapat dimanfaatkan sebagai asupan protein bagi manusia, yang mana kebutuhan protein orang dewasa per hari sekitar 0,54 - 0,57 g/kg berat badan (Winarno, 1986). Kualitas suatu protein salah satunya ditentukan oleh jenis dan jumlah asam amino penyusunnya. Asam amino terbagi menjadi dua yaitu, asam amino non esensial dan asam amino esensial. Asam amino yang dapat disintesis sendiri oleh tubuh disebut asam amino non esensial. Asam amino yang tidak dapat disintesis sendiri oleh tubuh dan harus diperoleh dari makanan disebut asam amino esensial.

Salah satu faktor penting dalam budidaya ikan adalah pemberian pakan. Pakan yang diberikan harus berkualitas tinggi, bergizi dan memenuhi syarat untuk dikonsumsi ikan yang dibudidayakan, serta tersedia secara terus menerus sehingga tidak mengganggu proses produksi dan dapat memberikan pertumbuhan yang optimal (Kordi, 2009).

*Azolla pinnata* dan probiotik, umum ditambahkan bersama pakan ikan. *A. pinnata* memiliki nama lokal matalele, merupakan tumbuhan air yang tumbuh dengan baik di daerah tropis maupun sub tropis (Sasa, 2004). Tumbuhan ini memiliki kandungan asam amino esensial yang lengkap, diantaranya: threonin, valin, metionin, isoleusin, leusin, fenilalanin, lisin, histidin, arginin, dan triptofan (Kuswandi, 1985). Pemanfaatan *A. pinnata* sebagai pelengkap pakan, kemungkinan dapat menambah jenis dan jumlah asam amino esensial yang terkandung dalam daging ikan.

Salminen dkk (1999) menyatakan bahwa probiotik merupakan sel mikroba yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi kesehatan dan kehidupan inang. Menurut Irianto (2007), pemberian organisme probiotik dalam akuakultur dapat diberikan melalui pakan, air maupun melalui perantaraan pakan hidup. Pemberian probiotik dalam pakan, berpengaruh terhadap kecepatan fermentasi pakan dalam saluran pencernaan, sehingga akan sangat membantu proses penyerapan makanan dalam pencernaan ikan. Fermentasi pakan mampu mengurai senyawa kompleks menjadi sederhana sehingga siap digunakan ikan, dan sejumlah mikroorganisme mampu mensintesa vitamin dan asam-asam amino yang dibutuhkan oleh larva hewan akuatik.

Berdasarkan keterangan diatas, timbul pemikiran bahwa asupan pakan ikan berupa *A. pinnata* dan probiotik akan memberikan perbedaan kandungan protein dan asam amino dalam daging ikan patin. Penelitian ini dirancang untuk menganalisis kandungan kadar protein menggunakan metode Kjeldahl dan identifikasi jenis asam amino menggunakan alat LC-MS. Penelitian ini sangat penting dilakukan karena berkaitan dengan pemanfaatan pelengkap pakan dalam budidaya ikan patin.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Berapa kadar protein pada daging ikan patin (*P. djambal*) pada masing-masing variasi pakan?
2. Bagaimana jenis dan komposisi asam amino pada isolat dari daging ikan patin (*P. djambal*) pada masing-masing variasi pakan?

## 1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang diperoleh dibudidaya oleh tim PMW Universitas Jember pada bulan Maret s.d November 2012 dan diambil pada bulan November 2012. Sampel yang diambil merupakan ikan patin (*P. djambal*) yang diberi perlakuan variasi pakan pada masing-masing kolam. Kolam 1 diberikan pakan pellet, kolam 2 diberikan pakan pellet dicampur probiotik, sedangkan kolam 3 diberikan pakan pellet dan matalele (*A. pinnata*) dengan perbandingan 3:1,
2. Sampel yang diambil hanya daging pada bagian badan ikan patin (*P. djambal*) yang telah dipisahkan dari kulit dan tulangnya,
3. Tidak dilakukan identifikasi asam amino pada pakan dan tidak dilakukan perhitungan jumlah pakan yang dimakan tiap ikan, diasumsikan semua ikan dalam satu kolam makan dengan jumlah yang sama,
4. Isolasi protein dilakukan dengan metode *alkali-aided protein extraction* pada kecepatan 12000 rpm.
5. Kadar protein diukur dengan metode Kjeldahl dan metode Bradford, identifikasi asam amino dilakukan dengan alat LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometer*).

### **1.3 Tujuan dan Manfaat**

#### 1.3.1 Tujuan

1. Mengetahui kadar protein pada daging ikan patin (*P. djambal*) pada masing-masing variasi pakan,
2. Mengetahui jenis dan komposisi asam amino pada isolat dari daging ikan patin (*P. djambal*) pada masing-masing variasi pakan.

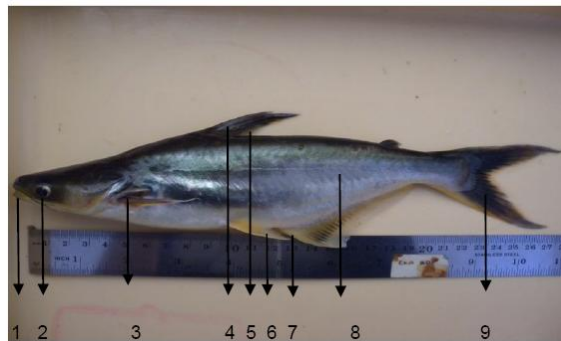
#### 1.3.2 Manfaat

1. Sebagai informasi khususnya mengenai kadar protein dan jenis asam amino yang terkandung dalam daging ikan patin (*P. djambal*),
2. Sebagai informasi variasi pakan yang menghasilkan daging ikan dengan kadar protein tertinggi.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Patin

Ikan Patin (Gambar 2.1) merupakan ikan konsumsi yang hidup di perairan tawar yang memiliki ciri-ciri umum tidak bersisik, tidak memiliki banyak duri, kecepatan tumbuhnya relatif cepat, dapat diproduksi secara massal dan memiliki peluang pengembangan skala industri (Susanto, 2009).



Gambar 2.1. Ikan patin (*P. djambal*)

Menurut Kottelat dkk (1993), ikan yang bernama ilmiah *Pangasius* di Indonesia terdiri dari *P. pangasius* atau *P. djambal*, *P. humeralis*, *P. lithostoma*, *P. macronema*, *P. micronemus*, *P. nasutus*, *P. niewenhuissii*, dan *P. polyuranodon*. Secara taksonomi, klasifikasi ikan patin adalah sebagai berikut:

Filum : *Chordata*  
Klas : *Pisces*  
Ordo : *Siluriformes*  
Famili : *Pangasidae*  
Genus : *Pangasiuse*  
Spesies : *Pangasius djambal* (Ghufran, 2010).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Maghfiroh (2000), komposisi daging ikan patin segar tertera dalam tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi daging ikan patin segar

Komposisi	Kadar (%)
Air	82,22
Abu	0,74
Protein	14,53
Lemak	1,09

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Monalisa dkk (2012), daging ikan patin (*P. Pangasius*) mengandung 14 asam amino antara lain: histidin, valin, leusin, isoleusin, metionin, treonin, lisin, arginin, serin, glisin, tirosin, alanin, aspartat dan glutamat.

Ikan patin merupakan golongan ikan pemakan segala. Susanto dan Amri (2002) menjelaskan, di alam makanan utama ikan patin berupa udang renik (crustacea), insekta dan moluska. Sementara makanan pelengkap ikan patin berupa rotifera, ikan kecil dan daun-daunan yang ada di perairan.

## 2.2 Pakan

Pakan ikan adalah pakan alami atau pakan buatan yang digunakan dalam proses budidaya ikan. Pakan ikan harus memenuhi ketentuan sebagai berikut: 1) mengandung nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan masing-masing jenis dan umur ikan; 2) meningkatkan pertumbuhan ikan secara optimal; 3) tidak mengandung zat beracun, bahan pencemaran yang berbahaya bagi ikan dan/atau manusia, atau yang mengakibatkan penurunan produksi atau menyebabkan pencemaran/kerusakan lingkungan; 4) tidak mengandung antibiotik dan hormone; 5) pakan telah terdaftar atau bersertifikat; 6) masih layak digunakan melalui proses uji mutu; 7) tidak



mengalami perubahan fisik (tekstur, warna, dan bau); 8) kemasan, wadah, atau pembungkusnya tidak rusak; 9) menggunakan bahan baku, pelengkap pakan, dan imbuhan pakan yang memenuhi persyaratan (Kep. 02/ Men/ 2007).

Pellet yang diberikan dalam budidaya ikan adalah pellet dengan nama dagang hi-pro-vite 781-3. Kandungan kimia pada pellet sesuai dengan tabel yang tertera dalam kemasan adalah 31-33% protein, 4% lemak, 5% serat, 13% abu, dan 12% air.

### 2.2.1 *Azolla pinnata* (matalele)

*A. pinnata* adalah tumbuhan dari jenis paku air yang sering ditemukan sebagai gulma di perairan tenang seperti danau, kolam, sungai, dan pesawahan (Haetami dkk, 2005). Berdasarkan berat keringnya *A. pinnata* mengandung protein kasar 24 -30 %, lemak kasar 3 - 3,2 %, abu 10 - 19 %, kalsium 0,4 -1,0 % dan fosfor 0,5 - 0,9% (Manin, 1997). *A. pinnata* memiliki kandungan asam amino esensial yang lengkap, seperti pada tabel 2.2.



Gambar 2.2. Matalele (*A. pinnata*)

(<http://balogo.wordpress.com/tag/azolla-pinnata>)

Penelitian yang dilakukan Haetami dkk (2005), menunjukkan bahwa penggunaan *A. pinnata* dalam ransum sebesar 29% dapat mempengaruhi pertumbuhan ikan bawal sebesar 2,66 g /ekor/hari. Pertumbuhan merupakan

pertambahan panjang atau bobot dalam kurun waktu tertentu. Pertumbuhan dalam individu diperoleh dari penambahan jaringan akibat penambahan sel secara mitosis. Hal ini terjadi apabila ada kelebihan sejumlah besar intake zat makanan penghasil energi dan asam amino (protein) yang mendorong proses pertumbuhan (Effendie, 1997).

Tabel 2.2 Jenis asam amino esensial yang terkandung dalam *A. pinnata*

Jenis Asam Amino	Kadar Asam Amino (% berat protein)
Metionin	1,88
Triptofan	2,01
Histidin	2,31
Treonin	4,70
Isoleusin	5,38
Fenilalanin	5,64
Lisin	6,45
Arginin	6,62
Valin	6,75
Leusin	9,05

(Kuswandi, 1985).

### 2.2.2 Probiotik

Probiotik adalah mikroba yang berpengaruh baik bagi kesehatan dan kehidupan inang (Salminen dkk, 1999). Proses kerja probiotik dibagi menjadi 3, yaitu: 1) menekan populasi mikroba melalui kompetisi dengan memproduksi senyawa-senyawa antimikroba atau melalui kompetisi nutrisi dan tempat pelekatan di dinding intestinum; 2) merubah metabolisme mikrobial dengan meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim; dan 3) menstimulasi imunitas melalui peningkatan kadar antibodi atau aktivitas makrofag. Salah satu faktor yang mempengaruhi

keberhasilan produk probiotik dalam meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan pada ikan yaitu keberadaan bakteri probiotik pada saluran pencernaan ikan (Irianto, 2003).

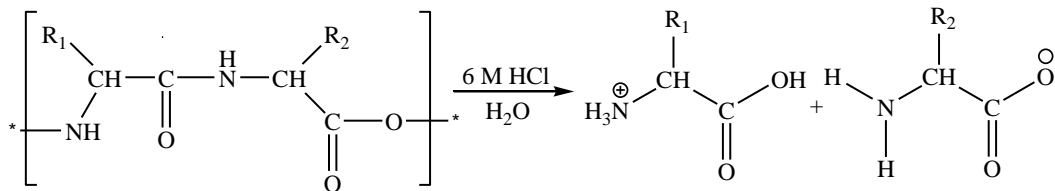
Adanya probiotik dalam saluran pencernaan diharapkan memberikan pengaruh terhadap ikan sesuai dengan jenis bakterinya. *Lactobacillus* adalah salah satu mikroorganisme fermentasi yang dapat membantu meningkatkan proses pencernaan ikan (Mansyur dan Tangko, 2008). Hal ini dilakukan dengan cara merubah karbohidrat menjadi asam laktat. Pembentukan asam laktat dapat menurunkan pH pada saluran pencernaan, sehingga dapat merangsang produksi enzim *edogenous*. Enzim tersebut dapat meningkatkan penyerapan nutrisi, konsumsi pakan, pertumbuhan dan menghalangi organisme patogen (Arief dkk, 2008).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Andriyanto dkk (2010), menunjukkan bahwa benih ikan *P. djambal* yang diberi probiotik memiliki laju pertumbuhan lebih tinggi dibanding benih ikan *P. djambal* yang tidak diberi probiotik.

### **2.3 Protein**

Protein merupakan sumber asam amino yang terdiri dari unsur C, H, O, dan N. Protein berfungsi sebagai zat pembangun jaringan-jaringan baru, pengatur proses metabolisme tubuh dan sebagai bahan bakar apabila keperluan energi tubuh tidak terpenuhi oleh lemak dan karbohidrat (Winarno 1986).

Protein tersusun dari berbagai asam amino yang masing-masing dihubungkan dengan ikatan peptida. Peptida adalah jenis ikatan kovalen yang menghubungkan suatu gugus karboksil satu asam amino dengan gugus amino asam amino lainnya sehingga terbentuk suatu polimer asam amino (Toha, 2001). Jika protein dimasak dengan asam atau basa kuat seperti pada gambar 2.3, asam amino unit pembangunnya dibebaskan dari ikatan kovalen yang menghubungkan molekul-molekul ini menjadi rantai (Lehninger, 1990).



Gambar 2.3. Hidrolisis protein menghasilkan asam amino bebas

### 2.3.1 Isolasi protein

Isolasi merupakan proses pemisahan komponen tertentu dari suatu sistem. Proses isolasi partikel dari bagian sel dilakukan melalui dua tahap, yaitu: 1) penghancuran sel; 2) pemisahan partikel tertentu dari suspensi melalui sentrifugasi (Sudarmadji, 1996).

Pembuatan isolat protein dilakukan berdasarkan kelarutan protein. Umumnya asam dan basa digunakan secara berturut-turut untuk proses ekstraksi dan penggumpalan/pengendapan. Ekstraksi protein pada pH basa dilakukan dengan penambahan larutan basa kedalam campuran suspensi dan dilakukan pengaturan pH dengan *range* antara 10,5-12. Hal ini bertujuan untuk mengamati pengaruh pH terhadap kelarutan protein (Moayedi dkk, 2010). Penggunaan NaOH untuk mengekstraksi suatu bahan dapat mendegradasi dinding sel dan menurunkan fraksi organik dari dinding sel (McManus, 1978).

Isolat protein dibuat dengan mengendapkan protein pada titik isoelektriknya. Titik isoelektrik adalah pH dimana protein tidak mempunyai selisih muatan dan karena itu tidak bergerak dalam medan listrik (Sudarmadji, 1996). Pada kondisi ini protein memiliki kelarutan minimum, sehingga protein dapat dipisahkan dari bagian bahan lainnya yang tidak diinginkan (Page, 1981). Sebagian besar protein hasil ekstraksi berdasarkan studi yang dilakukan mengendap pada pH antara 4 dan 5 (Pirie 1987).

### 2.3.2 Analisis Kuantitatif Protein

Analisis protein umumnya bertujuan untuk mengukur kadar protein dalam bahan makanan. Analisis protein dapat dilakukan antara lain dengan metode Kjeldahl, Lowry, Biuret, Bradford, turbidimetri dan titrasi formol (Sudarmadji dkk, 2007).

Metode Kjeldahl dilakukan untuk menganalisis kadar protein kasar dalam bahan makanan secara tidak langsung, karena yang dianalisis dengan cara ini adalah kadar nitrogennya (Winarno, 1986). Prinsip analisis Kjeldahl adalah sebagai berikut: bahan organik di didihkan dengan asam sulfat pekat sehingga unsur-unsur dapat terurai. Atom karbon menjadi  $\text{CO}_2$  dan nitrogen menjadi amonium sulfat. Larutan tersebut kemudian dibuat alkalis dengan menambahkan NaOH berlebihan sehingga ion amonium bebas menjadi amonia bebas. Amonia yang dipisahkan dengan cara distilasi kemudian dijerat dengan larutan asam borat. Garam borat yang terbentuk dititrasi dengan HCl (Sudarmadji, 1996).

Dari hasil titrasi dapat dihitung % N. Hasil % N tersebut dapat digunakan untuk memperkirakan kadar protein kasarnya. Umumnya campuran protein murni terdiri dari 16% nitrogen. Apabila jumlah N dalam bahan telah diketahui, maka jumlah protein dihitung dengan mengalikan jumlah N dengan faktor konversi 6,25 (100/16). Besarnya faktor konversi (tabel 2.3) tergantung pada persentase nitrogen yang menyusun protein dalam bahan pangan. Pada protein tertentu yang telah diketahui komposisinya dengan tepat, maka faktor konversi yang lebih tepatlah yang dipakai.

Tabel 2.3 Faktor konversi

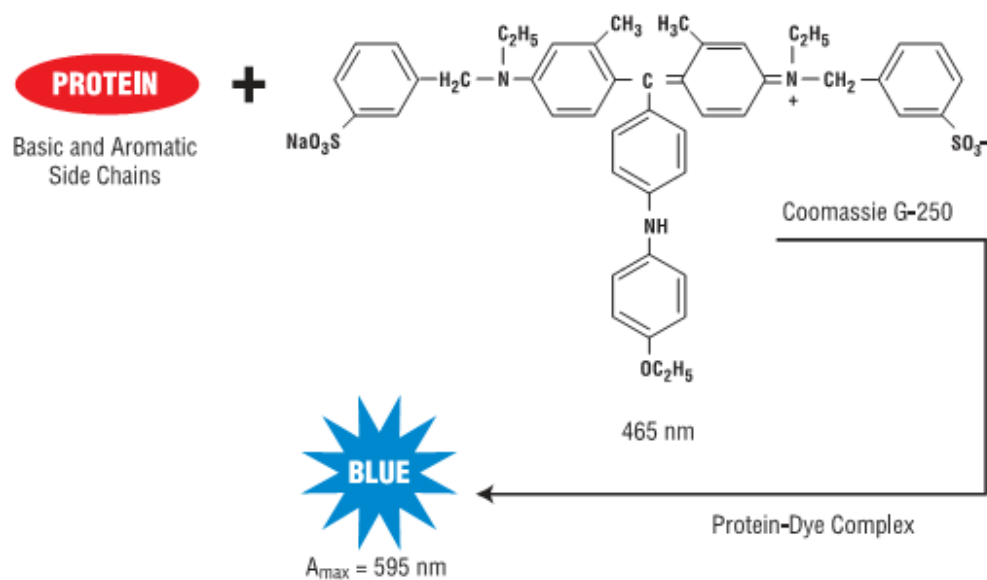
Produk	Faktor Konversi
Hewan	6,25
Kacang	5,46
Kedelai	5,71
Jagung	6,25

(Khee, 2001).

Kekurangan metode Kjeldahl ialah bahwa purin, purimidin, vitamin-vitamin, asam amino besar, kreatin, dan kreatinin ikut teranalisis dan terukur sebagai nitrogen protein (Winarno, 1986).

Metode Bradford digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam larutan. Prinsip metode ini berdasarkan pembentukan kompleks antara *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dengan larutan protein yang diukur pada panjang gelombang 595 nm (gambar 2.4). Pembentukan kompleks disebabkan adanya ikatan antara pewarna CBB dengan protein melalui interaksi ionik antara gugus asam sulfonat dengan muatan positif protein yaitu pada gugus amina ([http://www.berthold-jp.com/products/lifescience/pdf/coomassie\\_blue.pdf](http://www.berthold-jp.com/products/lifescience/pdf/coomassie_blue.pdf)).

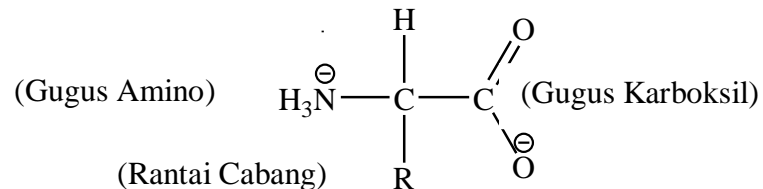
Asam amino bebas, peptida dan protein dengan berat molekul kecil tidak menghasilkan warna biru dengan reagen ini. Umumnya berat molekul peptida atau protein harus lebih besar dari 3000 Da untuk menghasilkan warna biru dengan reagen ini. Banyaknya ligan yang berikatan dengan molekul protein sebanding dengan muatan positif protein, sehingga jumlah absorbansi sebanding dengan kadar protein dalam larutan (Pierce, 2005).



Gambar 2.4. Skema reaksi analisa protein menggunakan metode Bradford (Pierce, 2005).

## 2.4 Asam Amino

Asam amino terdiri dari sebuah gugus amino, sebuah gugus karboksil, sebuah atom hidrogen, dan rantai cabang yang terikat pada sebuah atom C $\alpha$ .



Gambar 2.5. Struktur umum asam amino

Asam amino dalam kondisi netral berada dalam bentuk ion dipolar (ion *zwitter*), seperti pada gambar 2.5. Gugus amino pada asam amino dipolar mendapat tambahan sebuah proton dan gugus karboksil terdisosiasi (Winarno, 1986).

Dalam protein terdapat 20 asam amino utama yang berperan sebagai pembangun. Masing-masing asam amino berbeda satu dengan yang lain pada rantai sampingnya atau gugus R, seperti pada tabel 2.4. Asam amino yang dapat disintesis sendiri oleh makhluk hidup disebut asam amino non-esensial, sedangkan asam amino yang tidak dapat disintesis sendiri dan harus diperoleh dari makanan disebut asam amino esensial (Toha, 2001).

Metabolisme asam amino umumnya dapat terjadi dalam tiga jalur, yaitu 2 jalur katabolisme dan 1 jalur anabolisme. Jalur katabolisme asam amino merupakan proses degradasi dan glukoneogenesis, sementara jalur anabolisme asam amino merupakan proses sintesis protein. Sintesis protein dikode oleh DNA (kode genetik) yang terdapat di inti mitokondria. Tersedianya asam amino harus mencerminkan distribusinya dalam protein. Asam-asam amino diperlukan dalam sintesis protein tubuh dan senyawa-senyawa lain yang secara fisiologis penting bagi metabolisme, misalnya hormon-hormon dan neurotransmitter (Gusrina, 2008).

Protein dalam pakan pertama kali dicerna didalam lambung. Asam klorida yang terdapat dalam lambung akan memberikan medium asam yang dapat mengaktifasi pepsin dan renin untuk membantu mencerna protein. Pepsin memecah

protein menjadi gugus yang lebih sederhana yaitu protease dan pepton, dan akhirnya akan dipecah menjadi asam amino. Protein diserap oleh usus dalam bentuk asam amino (Gusrina, 2008).

Tabel 2.4 Jenis-jenis asam amino

Asam amino	Singkatan tiga huruf	Lambang satu huruf	Gugus R (rantai samping)
Alanin	Ala	A	$\text{—CH}_3$
Arginin	Arg	R	$\text{—C}_3\text{H}_6\text{N—C} \begin{matrix} \text{H} \\ \text{=} \\ \text{NH}_2^{\ominus} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$
Asparagin	Asn	N	$\text{—C—C} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{=} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$
Asam aspartat	Asp	D	$\text{—C—C} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{=} \\ \text{O}^{\ominus} \end{matrix}$
Sistein	Cys	C	$\text{—C—SH}$
Glutamin	Gln	Q	$\text{—C}_2\text{H}_4\text{—C} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{=} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$
Asam glutamat	Glu	E	$\text{—C}_2\text{H}_4\text{—C} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{=} \\ \text{O} \end{matrix}$
Glisin	Gly	G	$\text{—H}$
Histidin	His	H	$\text{—C—C} \begin{matrix} \text{H} \\ \text{=} \\ \text{N} \\ \text{HN} \\ \text{H}_2 \end{matrix}$



Isoleusin	Ile	I	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{---C---C}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{H} \end{array}$
Leusin	Leu	L	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ / \\ \text{---C---CH} \\   \quad \backslash \\ \text{H}_2 \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Lisin	Lys	K	$\text{---C}_4\text{H}_8\text{NH}_3^\ominus$
Metionin	Met	M	$\text{---C}_2\text{H}_4\text{S---CH}_3$
Fenilalanin	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\   \\ \text{---C---} \end{array} \text{C}_6\text{H}_5$
Prolin	Pro	P	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{C---CH}_2 \end{array}$
Serin	Ser	S	$\text{---CH}_2\text{OH}$
Treonin	Thr	T	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{---C---CH}_3 \\   \\ \text{H} \end{array}$
Triptofan	Trp	W	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HC---N} \\    \quad / \quad \backslash \\ \text{H}_2 \quad \text{C} \quad \text{C}_6\text{H}_4 \end{array}$
Tirosin	Tyr	Y	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\   \\ \text{---C---} \end{array} \text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$
Valin	Val	V	$\begin{array}{c}   \\ \text{---CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$

(Lehninger, 1990).

#### 2.4.1 Analisis kualitatif dan kuantitatif asam amino

Analisis asam amino dapat dilakukan dengan berbagai peralatan, antara lain: *Amino Acid Analyzer*, *Thin Layer Chromatography* (TLC), *Ion Exchange Chromatography*, *Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometer* (LC-MS), dan sebagainya. Akhir-akhir ini analisis asam amino lebih sering menggunakan kromatografi cair dengan kinerja tinggi atau yang lebih dikenal dengan istilah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Muchtadi 1989). Kromatografi cair merupakan teknik pemisahan yang cocok digunakan untuk memisahkan senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan, seperti asam amino, peptida dan protein.

*Mass spectrofotometer* (MS) merupakan alat yang dapat memberikan informasi mengenai berat molekul dan struktur senyawa organik. Selain itu, alat ini juga dapat mengidentifikasi dan menentukan komponen-komponen suatu senyawa. Perpaduan HPLC dengan MS (LC-MS) memiliki selektivitas yang tinggi, sehingga identifikasi dan kuantifikasi dapat dilakukan dengan jumlah sampel yang sedikit dan tahapan preparasi yang minimal. Hal ini membuat LC-MS semakin populer untuk mendeteksi berbagai senyawa (Maryam, 2007).

LC-MS digunakan fasa gerak atau pelarut untuk membawa sampel melalui kolom yang berisi padatan pendukung yang dilapisi cairan sebagai fasa diam. Selanjutnya analit dipartisikan di antara fasa gerak dan fasa diam tersebut, sehingga terjadi pemisahan karena adanya perbedaan koefisien partisi. Sampel yang telah dipisahkan dalam kolom diuapkan pada suhu tinggi, kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan ( $m/z$ ), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik menghasilkan spektra massa. Spektra massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya (Khopkar, 2008).

## **BAB 3. METODOLOGI PERCOBAAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2012 sampai Maret 2013 bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia dan Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Jember. Identifikasi asam amino menggunakan alat LC-MS dilakukan di Balai Pengkajian Bioteknologi Tangerang.

### **3.2 Alat dan Bahan**

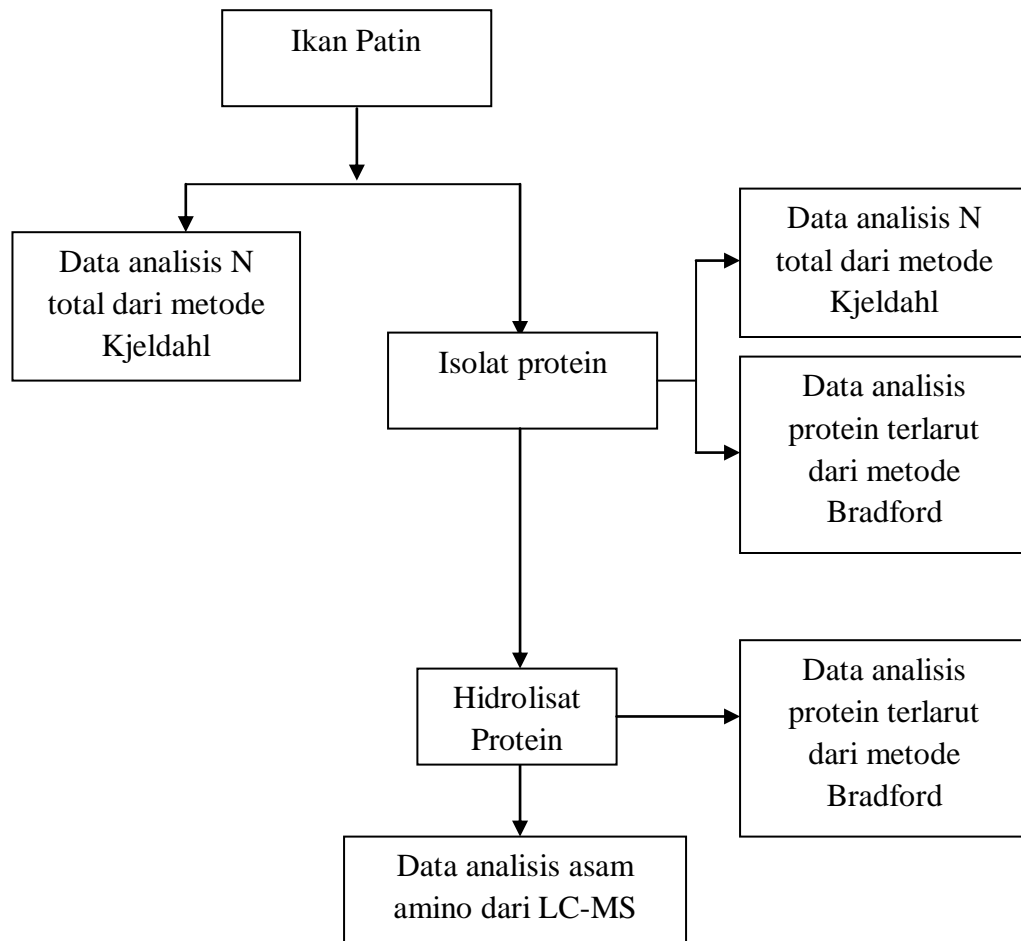
#### 3.2.1 Alat

Beaker glass, ball pipet, blender, buret, corong, erlenmeyer, gelas ukur, hot plate, kantong plastik, labu Kjeldahl, mortir dan stamper, pH meter, pipet tetes, pipet pasteur, pipet mohr, pisau, satu set alat distilasi, satu set alat LC-MS (Alliance 26950 awater - ESI-TOF-MS LCT Premier XE), *rotary evaporator*, sentrifuse (TOMY MRX-150 Inverter), spektrofotometer UV-Vis, dan tabung reaksi bertutup ulir.

#### 3.2.2 Bahan

Aquades, aquades beku, aqua bides, BSA (*Bovine Serum Albumin*),  $\text{CuSO}_4$ , ikan patin (*Pangasius djambal*), indikator metil merah, indikator *Brom Cresol Green*,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , larutan  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , larutan HCl, larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, larutan NaOH dan reagen Bradford.

### 3.3 Diagram Alir Penelitian



### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Preparasi sampel

Ikan patin (*P.djambal*) segera dibawa ke laboratorium menggunakan plastik dan disimpan dalam wadah berisi es dan air untuk mempertahankan kesegaran. Ikan dicuci dengan air bersih untuk membersihkan kotoran yang melekat. Daging bagian badan dipisahkan dari kulit dan tulangnya.

#### 3.4.2 Penentuan N-Total cara Kjeldahl

Metode penentuan N-Total cara Kjeldahl diadopsi dari AOAC (2001). Sampel ditimbang 1 g, kemudian dihaluskan menggunakan mortir dan stamper. Sampel yang telah halus dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Kemudian ditambahkan 7 g  $K_2SO_4$ ; 0,8 g  $CuSO_4$ , dan 12 mL  $H_2SO_4$  pekat ke dalam labu. Semua bahan dalam labu Kjeldahl dipanaskan dalam almari asap selama 60 menit. Dinginkan selama 10-20 menit. Setelah dingin ditambahkan secara hati-hati akuades hingga volume total 80 mL. Tambahkan NaOH 40 % (w/w) sebanyak 50 mL. Kemudian dilakukan distilasi, distilat yang diperoleh ditampung dalam erlenmeyer yang berisi 30 mL larutan  $H_3BO_3$  1% (w/v) yang telah diberi indikator campuran. Distilasi dilakukan hingga distilat yang diperoleh sebanyak 150 mL. Distilat yang diperoleh dititrasi dengan larutan standar HCl 0,1 M sampai warna ungu muda terbentuk. Dibuat juga larutan blanko dengan mengganti sampel dengan aquades, lakukan destruksi, distilasi, dan titrasi seperti pada sampel.

Perhitungan % N :

$$\% N = \frac{(\text{mL HCl sampel} - \text{mL HCl blanko}) \times M \text{ HCl} \times 14,01}{m \text{ sampel} \times 10}$$

Perhitungan % protein :

$$\% \text{ Protein kasar} = \% N \times \text{faktor konversi} (6,25)$$

### 3.4.3 Isolasi protein

Metode isolasi protein diadaptasi dari Moayed, dkk (2010). Daging ikan patin yang telah terpisah dari kulit dan tulangnya, ditimbang sebanyak 50 gram. Kemudian dicampur dengan 125 mL aquades beku dan diblender selama 15 menit. Campuran homogen, diatur pHnya menjadi 10; 10,5; 11; 11,5; 12 menggunakan NaOH 2N. Setelah pH sesuai, masing-masing campuran didiamkan pada lemari es selama 30 menit. Kemudian disentrifuse pada 12000 rpm, 4 °C selama 20 menit. Setelah proses sentrifugasi tersebut akan terbentuk 3 lapisan: lapisan atas lemak, lapisan tengah protein yang larut dalam air, dan lapisan bawah endapan. Lapisan tengah yang merupakan supernatan protein dipisahkan dari kedua lapisan secara hati-hati menggunakan pipet pasteur. Supernatan protein yang diperoleh kemudian diatur pHnya menjadi 5,2 menggunakan HCl 2N. Selanjutnya dilakukan pengendapan protein dengan sentrifugasi 12000 rpm, 4 °C selama 20 menit. Endapan protein dicampur dengan 87,5 g aquades beku kemudian diblender selama 7 menit, dan diatur pHnya pada 6,2 dilanjutkan proses sentrifugasi pada 12000 rpm, 4 °C selama 20 menit. Isolat protein yang diperoleh disimpan didalam *freezer*. Langkah-langkah diatas, dilakukan pengulangan triplo.

### 3.4.4 Penentuan protein terlarut metode Bradford (Bradford, 1976)

Isolat protein ditimbang 0,01 g, kemudian ditambahkan 200 µL NaOH 0,5 M. Campuran tersebut dipanaskan di atas penangas air selama 10 menit, kemudian didinginkan dalam penangas es (Moayed dkk, 2010).

Sampel sebanyak 10 µL ditambahkan 40 µL akuades dan 950 µL reagen Bradford. Dicampur menggunakan vortex dan di inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm.

### 3.4.5 Hidrolisis protein

Metode hidrolisis protein diadopsi dari Sudarmadji, dkk (2007). Protein ditimbang sebanyak 0,05 g, dimasukkan dalam tabung reaksi bertutup ulir. Kemudian ditambahkan 4 mL HCl 6 N, dialirkan gas N<sub>2</sub> selama 1 menit dan ditutup rapat. Campuran tersebut dipanaskan dalam oven pada suhu 110 °C selama 24 jam.

Setelah dingin, campuran disaring dengan kertas saring milipore. Filtrat dituang kedalam labu alas bulat 50 mL, cuci tabung reaksi bekasnya beberapa kali dengan HCl 0,01 N. Uapkan semua campuran di dalam *rotary evaporator* sampai kering dengan temperatur pemanas 40 °C. Setelah kering, tambahkan 2 mL NaOH 0,01 N, dibiarkan dalam keadaan terbuka selama 4 jam. Kemudian ditambahkan 6 mL HCl 0,02 N.

## **BAB 4. PEMBAHASAN**

Ikan Patin (*Pangasius djambal*) merupakan salah satu spesies ikan air tawar dari jenis Pangasidae yang memiliki kadar protein tinggi. Tingginya kadar protein dipengaruhi oleh asupan pakan yang dikonsumsi ikan. Pada penelitian ini sampel ikan yang diperoleh dari tim PMW Universitas Jember 2012 merupakan ikan patin yang telah diberi perlakuan variasi pakan, sehingga dapat diketahui pengaruhnya terhadap kadar protein pada daging ikan. Terdapat tiga variasi pakan yang telah dilakukan, antara lain: pellet; pellet dan tambahan pakan *Azolla Pinnata*; serta pellet dicampur probiotik.

### **4.1 Optimasi pH pada isolasi protein**

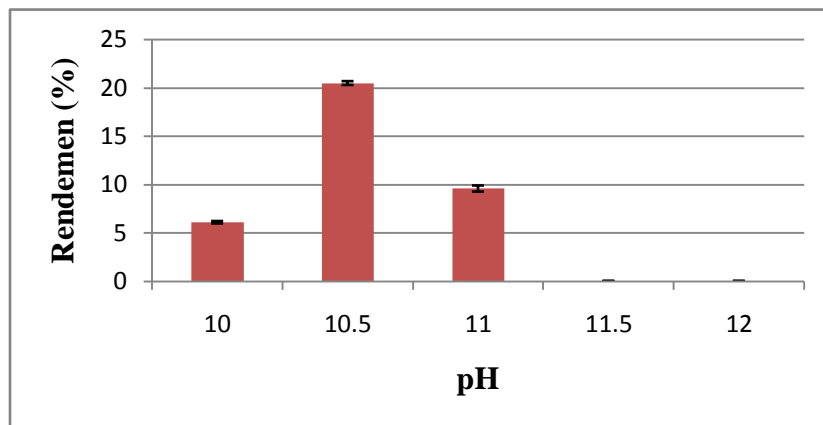
Pada penelitian ini, isolasi protein dilakukan berdasarkan kelarutannya dalam pH basa. Setiap bahan organik memiliki jenis protein yang berbeda-beda. Perbedaan jenis protein tersebut dapat mempengaruhi kelarutannya, sehingga perlu dilakukan optimasi pH untuk isolasi protein. Optimasi pH bertujuan mengetahui pH yang paling sesuai untuk isolasi protein. Parameter pH yang dikatakan sesuai untuk isolasi protein adalah pH yang menghasilkan rendemen isolat dan kadar protein tertinggi. Sampel yang digunakan untuk optimasi pH adalah daging ikan yang diberi pakan pellet dicampur probiotik.

#### **4.1.1 Rendemen isolat**

Rendemen isolat merupakan kuantisasi banyaknya isolat yang diperoleh dari proses isolasi protein dalam sejumlah sampel tertentu. Hasil optimasi pH antara 10-12 pada isolasi protein dapat dilihat pada gambar 4.1. Prosentase rendemen tertinggi (lampiran A.1) dihasilkan pada pH 10,5 yaitu 20,47 %. Isolasi protein pada pH 10 dan 11 menghasilkan rendemen sebanyak 6,08% dan 9,56 %. Pada pH 11,5 dan 12



tidak terjadi pemisahan setelah proses sentrifugasi, karena *slury* yang terbentuk terlalu kental. Penelitian yang dilakukan Moayedid dkk (2010) menggunakan metode isolasi protein yang serupa untuk sampel daging ayam menunjukkan bahwa rendemen terbanyak (19,4%) diperoleh pada pH 12. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis protein yang terkandung di dalam daging ayam dan ikan.



Gambar 4.1 Rendemen isolat ikan patin pada optimasi pH

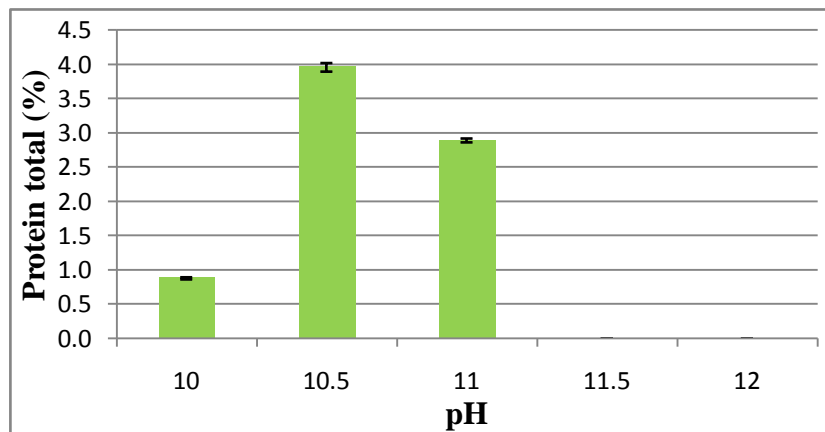
#### 4.1.2 Kadar protein kasar pada isolat

Kadar protein kasar diukur menggunakan metode Kjeldahl. Pada metode Kjeldahl, protein diukur berdasarkan jumlah nitrogen total yang ada di dalam sampel, sehingga ada kemungkinan molekul-molekul lain yang bukan protein tetapi mengandung nitrogen ikut terukur sebagai nitrogen total. Semakin banyak jumlah nitrogen yang terukur, maka semakin besar kadar protein yang terkandung dalam sampel tersebut.

Pada metode Kjeldahl, bahan organik mengalami reaksi oksidasi dengan adanya asam sulfat. Ion amonium yang terbebas dari bahan organik tersebut, berikatan dengan ion sulfat membentuk amonium sulfat. Amonium sulfat terionisasi dalam air menjadi kation amonium dan anion sulfat. Penambahan NaOH menyebabkan ion amonium melepaskan satu atom hidrogennya dan membentuk amonia bebas. Amonia bebas sifatnya mudah menguap, oleh karena itu perlu ditampung dalam larutan penjerat asam borat. Satu atom hidrogen dalam asam borat

diberikan kepada amonia sehingga membentuk ion amonium, ion amonium yang terbentuk dititrasi dengan HCl standar untuk mengetahui jumlahnya dalam larutan. Dalam hal ini, jumlah HCl yang dibutuhkan pada saat titrasi sebanding dengan jumlah ion amonium karena keduanya memiliki perbandingan mol yang sama.

Data rendemen isolat pada gambar 4.1, memiliki pola yang sama dengan data kadar protein kasar yang ditentukan menggunakan metode Kjeldahl. Hasil perhitungan kadar protein kasar (lampiran A.2) menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh dari pelarutan protein pada pH 10,5 lebih banyak mengandung protein dibandingkan isolat yang mengalami pelarutan protein pada pH 10 dan 11 (gambar 4.2). Berdasarkan data tersebut (gambar 4.1 dan 4.2), maka isolasi protein selanjutnya akan dilakukan pada pH 10,5.



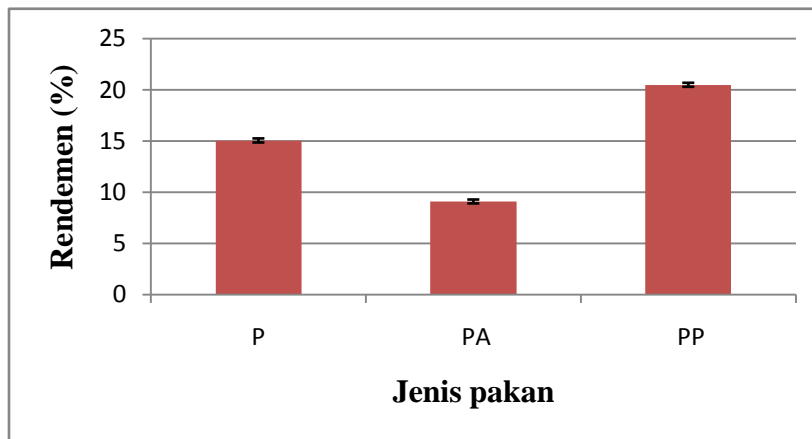
Gambar 4.2 Kadar protein kasar isolat pada optimasi pH

#### 4.2 Pengaruh pakan terhadap kadar protein pada ikan

Salah satu faktor penting dalam budidaya ikan adalah pemberian pakan. Pakan yang diberikan harus berkualitas tinggi, bergizi dan memenuhi syarat untuk dikonsumsi ikan yang dibudidayakan, serta tersedia secara terus menerus sehingga tidak mengganggu proses produksi dan dapat memberikan pertumbuhan yang optimal (Kordi, 2009).

#### 4.2.1 Rendemen isolat

Rendemen yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan perbedaan antara ketiga sampel (gambar 4.3). Rendemen isolat terbanyak (lampiran B.1) adalah isolat dari daging ikan yang diberi pakan pellet dicampur probiotik (20,47%), dan yang terendah adalah isolat dari daging ikan yang diberi pakan pellet dan tambahan pakan *A. Pinnata* (9,07%).



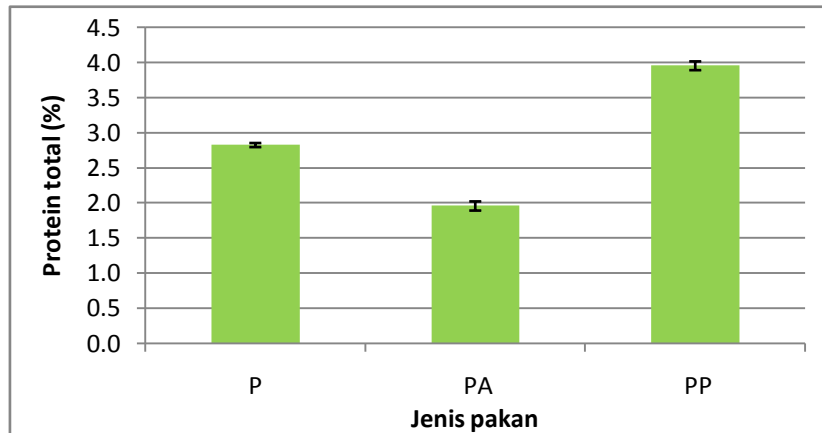
Gambar 4.3 Rendemen isolat pada masing-masing variasi pakan  
Keterangan: P. Pellet; PA. Pellet dan tambahan pakan *A. pinnata*; PP. Pellet dicampur probiotik

#### 4.2.2 Kadar protein kasar pada isolat

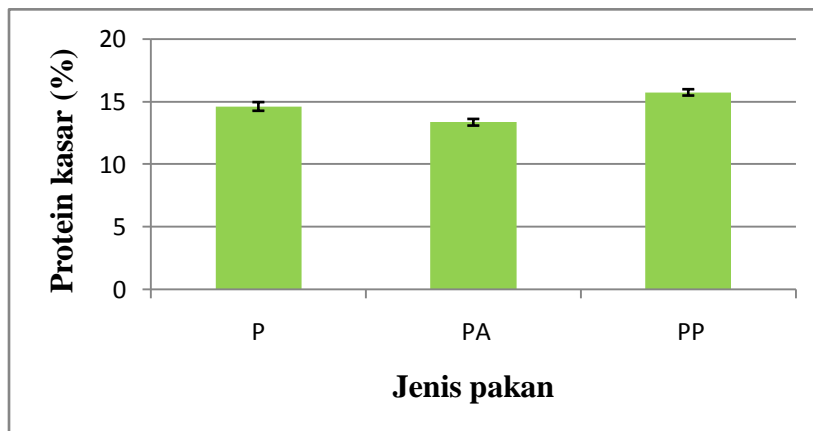
Gambar 4.4 menunjukkan perbedaan kadar protein kasar pada isolat protein dari masing-masing ikan yang diberi perlakuan variasi pakan. Kadar protein kasar tertinggi (lampiran B.2) terdapat pada isolat dari daging ikan yang diberi pakan pellet dicampur probiotik (3,96%) dan terendah adalah isolat dari daging ikan yang diberi pakan pellet dan tambahan pakan *A. Pinnata* (1,96%).

Data kadar protein isolat pada gambar 4.4 memiliki pola yang sama dengan data kadar protein pada sampel daging ikannya sendiri. Perbedaan kadar protein pada masing-masing daging ikan (gambar 4.5) ternyata mempengaruhi jumlah rendemen dan kadar protein isolatnya. Daging ikan yang memiliki kadar protein lebih tinggi

menghasilkan isolat dengan kadar protein kasar yang lebih banyak dibandingkan dengan daging ikan yang memiliki protein lebih rendah.



Gambar 4.4 Kadar protein kasar isolat pada masing-masing variasi pakan  
Keterangan: P. Pellet; PA. Pellet dan tambahan pakan *A. pinnata*; PP. Pellet dicampur probiotik



Gambar 4.5 Kadar protein kasar daging ikan patin pada masing-masing variasi pakan  
Keterangan: P. Pellet; PA. Pellet dan tambahan pakan *A. pinnata*; PP. Pellet dicampur probiotik

Berdasarkan data diatas, daging ikan yang mengandung protein kasar tertinggi (lampiran B.3) adalah ikan yang diberi pakan pellet dicampur probiotik (15,74%) dan terendah adalah ikan yang diberi pakan pellet dan tambahan pakan *A. Pinnata*

(13,35%). Perbedaan kadar protein pada daging ikan, menunjukkan bahwa jenis pakan berpengaruh dalam produksi protein pada ikan.

Ikan yang diberi pakan pellet dicampur probiotik memiliki kandungan protein kasar yang lebih tinggi dibanding ikan dengan variasi pakan lainnya. Hal ini disebabkan probiotik mengandung bakteri *Lactobacillus*, mikroorganisme fermentasi yang mampu merubah karbohidrat menjadi asam laktat. Pembentukan asam laktat ini menyebabkan penurunan pH pada saluran pencernaan yang mengakibatkan sekresi enzim pencernaan dan aktivitas proteolitik dalam lambung menjadi optimum. Proses pemecahan makanan menjadi molekul sederhana oleh enzim pencernaan dilambung, dapat mempermudah proses penyerapan makanan yang terjadi di usus (Arief dkk, 2008).

*A. Pinnata* sebagai salah satu tambahan pakan ikan, memiliki kandungan protein yang tinggi yaitu 24 -30 % (Manin, 1997). Namun tingginya kadar protein dalam bahan pakan tidak menjamin peningkatan kadar protein dalam daging ikan, karena pada proses penyerapan makanan membutuhkan enzim pencernaan yang berfungsi untuk memecah makanan menjadi molekul sederhana. Sehingga rendahnya kandungan protein pada daging ikan yang diberi tambahan pakan *A. pinnata* ini kemungkinan disebabkan tidak adanya bakteri yang membantu proses fermentasi makanan.

#### 4.2.3 Hidrolisis protein

Hidrolisis protein adalah proses pemecahan ikatan kovalen yang menghubungkan asam-asam amino penyusun protein. Isolat yang diperoleh dari proses isolasi protein dihidrolisis menggunakan HCl 6 N pada suhu 110 °C selama 24 jam. Pada proses hidrolisis, ikatan kovalen antara molekul asam amino akan terputus, sehingga menghasilkan asam amino bebas. Asam amino tersebut akan dianalisa menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometer*).

Kemampuan metode hidrolisis untuk memecah protein menjadi asam amino berbeda pada setiap sampelnya, sehingga diperlukan metode analisa tambahan untuk

mengkonfirmasi terjadinya hidrolisis protein menjadi asam amino. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah dengan mengukur kadar protein terlarutnya menggunakan metode Bradford.

#### 4.2.4 Kadar protein terlarut pada isolat

Metode Bradford digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam larutan. Metode ini dipilih untuk mengkonfirmasi terjadinya hidrolisis protein menjadi asam amino, karena pada metode ini asam amino dan peptida tidak mampu membentuk kompleks dengan CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) sehingga tidak menghasilkan warna biru (Pierce, 2005). Pada analisis kadar protein kasar menggunakan metode Kjeldahl hasil yang diperoleh bukan merupakan kadar protein murni, tetapi ada beberapa senyawa yang memiliki gugus nitrogen juga ikut terukur sebagai protein total misalnya: asam amino bebas, purin, purimidin, vitamin, dan sebagainya.

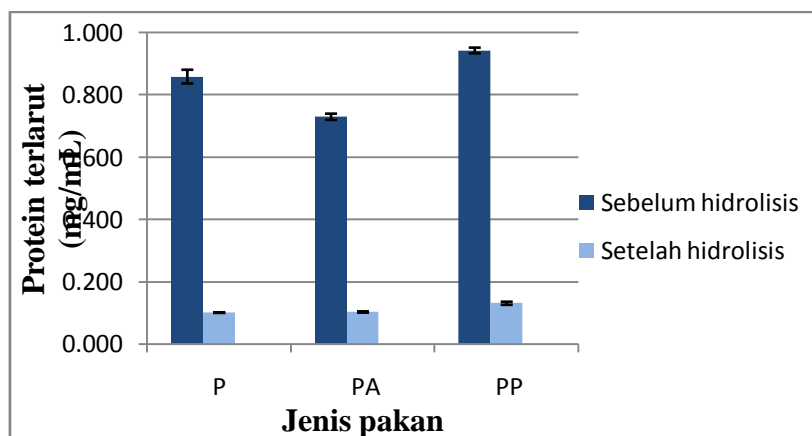
Isolat yang diperoleh berbentuk padatan sehingga diperlukan pelarut untuk melarutkan isolat. Pelarut yang digunakan adalah larutan NaOH 0,5 N dan dibantu pemanasan pada *water bath* selama 10 menit (Moayedi dkk, 2010). Derajat kelarutan protein dipengaruhi oleh gaya elektrostatik dan interaksi hidrofobik antara molekul protein. Permukaan protein memiliki muatan, tergantung lingkungan pH. Keadaan dimana protein memiliki muatan positif dan negatif yang seimbang dalam permukaannya, dan memiliki kelarutan minimal disebut titik isoelektrik. Pada pH di atas atau di bawah titik isoelektrik, protein membawa muatan positif atau negatif. Adanya muatan pada permukaan protein menyebabkan kelarutan protein meningkat (Damodaran, 1996). Penambahan NaOH 0,5 N disertai pemanasan pada *water bath* bertujuan untuk memunculkan muatan pada permukaan protein, sehingga kelarutannya dapat meningkat.

Larutan protein yang diperoleh kemudian ditambahkan dengan reagen Bradford yaitu CBB, dan membentuk kompleks CBB-protein yang berwarna biru. Pembentukan kompleks disebabkan adanya interaksi ionik antara gugus asam sulfonat

dengan muatan positif protein yaitu pada gugus amina (Bio Imaging System). Warna biru tersebut kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm.

*Bovine serum albumin* (BSA) sering digunakan sebagai standar untuk pengukuran kadar protein terlarut menggunakan metode Bradford karena tingkat kemurniannya tinggi dan harganya relatif murah (Khee, 2001). Pada penelitian ini digunakan standar BSA dengan konsentrasi 0,1-1 mg/mL, dan diperoleh persamaan garis  $y = 0,249x + 0,021$ . Persamaan yang diperoleh dari kurva standar BSA, dapat digunakan untuk menghitung kadar protein dalam larutan sampel. Pada penelitian ini kadar protein terlarut diukur dua kali, yaitu sebelum proses hidrolisis dan setelah hidrolisis.

Kadar protein terlarut sebelum proses hidrolisis dapat dilihat pada gambar 4.6. Kadar protein terlarut tertinggi (lampiran B.5) terdapat pada isolat daging ikan yang diberi pakan pellet dicampur probiotik (0,943 mg/mL), dan terendah pada isolat daging ikan yang diberi pakan pellet dan tambahan pakan *A. Pinnata* (0,730 mg/mL). Tren yang dihasilkan sama dengan kadar protein total yang diukur menggunakan metode Kjeldahl, tetapi terdapat perbedaan nilai kadar proteinnya.



Gambar 4.6 Kadar protein terlarut sebelum dan setelah proses hidrolisis pada masing-masing variasi pakan  
Keterangan: P. Pellet; PA. Pellet dan tambahan pakan *A. pinnata*; PP. Pellet dicampur probiotik

Gambar 4.6 menunjukkan adanya penurunan kadar protein terlarut setelah proses hidrolisis. Hal ini berarti proses hidrolisis protein menjadi asam amino telah berlangsung. Kadar protein terlarut (lampiran B.5) pada isolat daging ikan yang diberi pakan pellet dicampur probiotik (0,131 mg/mL), isolat daging ikan yang diberi pakan pellet (0,101 mg/mL), dan isolat daging ikan yang diberi pakan pellet dan tambahan pakan *A. Pinnata* (0,103 mg/mL).

#### 4.2.5 Analisis kualitatif dan kuantitatif asam amino

Analisis kualitatif dan kuantitatif asam amino dilakukan dengan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometer*). Pada LC (kromatografi) digunakan fasa gerak untuk membawa sampel melalui kolom yang berisi padatan pendukung dan dilapisi cairan sebagai fasa diam. Selanjutnya analit dipartisikan di antara fasa gerak dan fasa diam tersebut, sehingga terjadi pemisahan karena adanya perbedaan koefisien partisi. Data informasi hasil pemisahan pada kolom tersebut berupa kromatogram.

Sampel yang telah melalui kolom kromatografi, bergerak menuju MS (spektroskopi massa) untuk mengalami ionisasi. Selanjutnya dideteksi secara elektrik menghasilkan spektra massa. Spektra massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya. Analisis kualitatif dapat dilakukan dengan membandingkan berat molekul yang tertera pada kromatogram dan spektra massa dengan berat molekul asam amino yang diperoleh dari pustaka.

Analisis kuantitatif asam amino diperoleh dari data intensitas masing-masing asam amino yang tertera pada spektra massa. Tingginya intensitas dipengaruhi oleh kekuatan ionisasi dan kadar senyawa, oleh karena itu tidak dapat dibandingkan antar asam amino karena masing-masing asam amino memiliki kekuatan ionisasi yang berbeda. Prosentase relatif asam amino diperoleh dengan membandingkan intensitas jenis asam amino tertentu pada masing-masing sampel.

Hasil analisis asam amino menggunakan LC-MS pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa semua isolat daging ikan patin tidak mengandung asam amino serin, glisin,



sistein, dan alanin. Sampel ikan patin yang diberi pakan pellet dicampur probiotik juga tidak mengandung asam amino triptofan, sedangkan pada kedua sampel lainnya terdapat asam amino tersebut. Selain itu pada ikan patin yang diberi pakan pellet tidak terdapat asam amino asparagin dan asam glutamat yang terdapat dalam kedua sampel lainnya.

Terdapat 13 asam amino penyusun protein pada ikan patin yang diberi pakan pellet dengan asam amino dominannya triptofan. Ikan patin yang diberi pakan pellet dan tambahan *A. pinnata* mengandung 14 jenis asam amino dan kandungan asam amino yang dominan adalah asparagin. Sementara itu ikan patin yang diberi pakan pellet dicampur probiotik mengandung 13 jenis asam amino dan asam glutamat adalah asam amino yang dominan.

Tabel 4.1 Jenis dan jumlah asam amino dalam isolat daging ikan patin

No.	Asam amino	% Relatif		
		Pellet (%)	<i>A. Pinnata</i> (%)	Probiotik (%)
1	Metionin	48,95	25,72	25,32
2	Triptofan	72,68	27,31	-
3	Histidin	38,83	32,42	28,75
4	Treonin	33,61	36,34	30,05
5	Isoleusin/ Leusin	55,68	23,25	21,07
6	Fenilalanin	35,20	25,24	39,56
7	Lisin	47,65	29,40	22,95
8	Arginin	41,09	28,31	30,60
9	Valin	63,72	22,30	13,98
10	Tirosin	42,29	42,50	15,21
11	Serin	-	-	-
12	Glisin	-	-	-
13	Sistein	-	-	-
14	Alanin	-	-	-
15	Asam aspartat	100,00	-	-
16	Asparagin	-	46,50	53,50
17	Asam glutamat	-	40,92	59,07
18	Glutamin	45,86	33,36	20,77
19	Prolin	44,66	13,99	41,34

## **BAB 5. PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

1. Kadar protein kasar pada daging ikan patin yang diberi pakan pellet; pellet dan *A. pinnata*; pellet dicampur probiotik berturut-turut adalah 14,62%; 13,35%; 15,74%.
2. Jenis asam amino penyusun protein ikan patin yang diberi perlakuan variasi pakan hampir sama. Terdapat 13 asam amino penyusun protein pada ikan patin yang diberi pakan pellet dengan asam amino dominannya triptofan. Ikan patin yang diberi pakan pellet dan tambahan *A. pinnata* mengandung 14 jenis asam amino dan kandungan asam amino yang dominan adalah asparagin. Sementara itu ikan patin yang diberi pakan pellet dicampur probiotik mengandung 13 jenis asam amino dan asam glutamat adalah asam amino yang dominan.

### **5.2 Saran**

Pada budidaya ikan patin akan lebih baik jika pakan yang diberikan adalah pellet yang dicampur dengan probiotik, karena daging ikan yang diberi pakan tersebut memiliki kandungan protein kasar lebih tinggi jika dibanding dengan ikan yang hanya diberi pakan pellet saja.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 2001. Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseed. *J. AOAC. Int.*
- Andriyanto, S.; Listyanto, N. dan Rahmawati, R. 2010. Pengaruh Pemberian Probiotik dengan Dosis yang Berbeda terhadap Sintasan dan Pertumbuhan Benih Ikan Patin Jambal (*Pangasius djambal*). Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur.
- Arief, Muhammad; Mufidah dan Kusurningrum. 2008. "Pengaruh Penambahan Probiotik pada Pakan Buatan terhadap Pertumbuhan dan Rasio Konversi Pakan." *Jurnal Berkala Ilmiah Perikanan*. Vol. 3 (2):3.
- Bio Imaging System. Application Note #2. Coomassie Brilliant Blue. Informasi Online. [http://berthold-jp.com/products/lifescience/pdf/coomassie\\_blue.pdf](http://berthold-jp.com/products/lifescience/pdf/coomassie_blue.pdf) [16 Mei 2013].
- Bradford. 1976. *A Rappid and Sensitive Methode for Quantitation of Protein Utilization*. The Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*72:248-254.
- Damodaran, S. 1996. *Functional properties. Pages 167-224 in Food Proteins: Properties and Characterization*. Wiley-VCH, Inc., New York, NY.
- Effendie, M.I. 1997. *Biologi Perikanan*. Yogyakarta: Yayasan Pustaka Nusantara.
- Gusrina, 2008. *Budidaya Ikan Jilid 2*. Klaten: PT Macanan Jaya Cemerlang.
- Ghufran, M, 2010. *Budidaya Ikan Patin di Kolam Terpal*. Yogyakarta: Lily Publisher.
- Haetami, Kiki., Junianto, dan Andriani, Yuli. 2005. "Tingkat Penggunaan Gulma Air *Azolla pinnata* dalam Ransum Terhadap Pertumbuhan dan Konversi Pakan Ikan Bawal Air Tawar". Tidak Diterbitkan. Laporan Penelitian. Semarang: Universitas Padjajaran.
- Irianto, A. 2003. *Probiotik Akuakultur*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- Irianto, A. 2007. *Potensi Mikroorganisma : Di Atas Langit Ada Langit*. Ringkasan Orasi Ilmiah di Fakultas Biologi Universitas Jenderal Sudirman.
- Khee, C. R. 2001. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Son 5, Inc.
- Khopkar, S. M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Alih bahasa oleh A. Saptorahardjo. Jakarta: UI Press.
- Kordi. 2009. *Pemeliharaan Ikan Nila Di Kolam Air Deras*. Jakarta: PT Perca.
- Kottelat, M. 1993. *Ikan Air Tawar Indonesia Bagian Barat dan Sulawesi Edisi Dwi Bahasa (Inggris-Indonesia)*. Jakarta: Periplus Edition (Hk) Ltd.
- Kuswandi. 1985. "Bisakah Azolla untuk Pakan Ternak Ayam dan Telur". *Majalah Pertanian dan Peternakan*, 15 (03).
- Lehninger. 1990. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Alih bahasa oleh Maggy Thenawidjaja. Jakarta: Erlangga.
- Maghfiroh, I. 2000. "Pengaruh Penambahan Bahan Pengikat Terhadap Karakteristik Nugget dari Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*).". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Manin. 1997. Penggunaan Tepung Eceng Gondok (*Eichornia crassipes Mart*) dan Azolla (*Azolla pinnata Brown*) dalam Ransum Ternak Itik Periode Pertumbuhan. *J. Peternakan Lingkungan*. Vol. 3(2):13-20.
- Mansyur, A. dan Tangko. 2008. Probiotik: Pemanfaatannya untuk Pakan Ikan Berkualitas Rendah. *Jurnal Media Akuakultur*. Vol 3 (2): 1.
- Maryam, R. 2007. Metode Deteksi Mitotoksin. *J. Mikol. Ked. Indon*. Vol. 7 (1-2): 12-24.
- McManus, W. R. 1978. Alkali effects on agricultural wastes and their cell wall fraction. *Australian J Experim Agric Anim Husbandry*. Vol. 18: 231-242.
- Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. 2007. *Cara Budidaya Ikan yang Baik*. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia.
- Muchtadi, D. 1989. *Petunjuk Laboratorium Evaluasi Nilai Gizi Pangan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Moayedi., Omana., Chan., Xu., dan Betti. 2010. Alkali-aided protein extraction of chicken dark meat: composition and stability to lipid oxidation of the recovered proteins. *Poultry Science Association Inc.* Vol. 89: 766-775.
- Monalisa, K., Islam, M. Z., Khan, T., Abdullah, A. T. M., dan Hoque, M. M. 2012. Comparative Study on Nutrient Contents of Native and Hybrid Khoi (*Anabas testudineus*) and Pangas (*Pangasius pangasius*, *Pangasius hypotalamus*) Fish in Bangladesh. *International Food Research Journal.* 20(2): 79-797 (203).
- Page, David. 1981. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Alih Bahasa oleh R. Soendoro. Jakarta: Erlangga.
- Pemimpin Redaksi. "Ikan Penyuplai Protein." *Warta Pasarikan*. Mei 2011 no. 93. Halaman 3.
- Pierce. 2005. Protein Assay Technical Handbook. [www.piercenet.com/path95n](http://www.piercenet.com/path95n). [25 Januari 2013].
- Pirie, NW. 1987. *Leaf Protein and Its by-products in Human and Animal*. 2<sup>nd</sup> Ed. Melborne: Combridge University Press.
- Salminen, S., A. Ovwehand, Y. Benno, dan Y. K. Lee. 1999. "Probiotics: How Should Be Defined?." *Trends In Food Science and Technology*. Vol. 10: 107-110.
- Sasa, J.J. 2004. Padat Penebaran Ikan Mas Sistem Mina Padi Azolla dan Pengaruhnya Terhadap Produktivitas dan Emisi Gas Methan dan Pendapatan Usahatani. *Jurnal Tanaman Pangan*.
- Sudarmadji, Slamet. 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 2007. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta.
- Susanto, H dan Amri. 2002. *Budidaya Ikan Patin*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Susanto, H. 2009. *Pembenihan dan Pembesaran Patin*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Toha, A. H. 2001. *Biokimia: Metabolisme Biomolekul*. Bandung: Alfabeta.
- Veni. 2011. Red Azolla: Super Hopes, Super Plans For Super Plant. Informasi Online. <http://balogo.wordpress.com/tag/azolla-pinnata/>. [2 Juni 2012].

Winarno F, G. 1986. *Kimia Pangan dan Gizi I*. Jakarta: PT. Gramedia.

## LAMPIRAN

### Lampiran A. Optimasi pH pada isolasi protein

#### A.1 Rendemen Isolat

$$\% \text{ Rendemen isolat} = \frac{\text{m hasil isolasi}}{\text{m sampel}} \times 100\%$$

pH	Berat sampel (g)	Hasil isolasi (g)	Rendemen (%)
10	50,0513	3,0021	6,00
	50,0271	3,1121	6,22
	50,0023	3,0073	6,01
	Rata-rata	3,0405	6,08
	SD	0,0621	0,12
10,5	50,0240	10,3502	20,69
	50,0036	10,1880	20,37
	50,0260	10,1712	20,33
	Rata-rata	10,2365	20,47
	SD	0,0989	0,20
11	50,0901	4,9519	9,89
	50,0231	4,6288	9,25
	50,0077	4,7729	9,54
	Rata-rata	4,7845	9,56
	SD	0,1619	0,32
11,5	50,0831	0	0
	50,0521	0	0
	50,0079	0	0
	Rata-rata	0	0
	SD	0	0
12	50,0091	0	0
	50,0325	0	0
	50,0642	0	0
	Rata-rata	0	0
	SD	0	0

## A.2 Kadar protein kasar pada isolat

$$\% N = \frac{(\text{mL HCl sampel} - \text{mL HCl blanko}) \times M \text{ HCl} \times 14,01}{m \text{ sampel} \times 10}$$

$$\% \text{ Protein kasar} = \% N \times \text{faktor konversi (6,25)}$$

pH	Isolat	Berat isolat (g)	Volume HCl (mL)	Nitrogen total (%)	Protein kasar (%)
10	1	1,0152	1,025	0,15	0,93
		1,0100	0,927	0,14	0,84
		1,0127	0,982	0,14	0,89
				Rata-rata	0,89
				SD	0,04
	2	1,0401	0,966	0,14	0,85
		1,0427	1,006	0,14	0,89
		1,0523	0,960	0,13	0,84
				Rata-rata	0,86
				SD	0,02
	3	1,0125	1,006	0,15	0,91
		1,0011	0,947	0,14	0,87
1,0110		0,960	0,14	0,87	
			Rata-rata	0,89	
			SD	0,02	
10,5	1	1,0400	4,624	0,65	4,09
		1,0807	4,577	0,62	3,89
		1,0957	4,663	0,63	3,91
				Rata-rata	3,96
				SD	0,11
	2	1,0138	4,291	0,62	3,89
		1,0375	4,720	0,67	4,18
		1,0420	4,501	0,64	3,97
				Rata-rata	4,02
				SD	0,15
	3	1,0194	4,510	0,65	4,07
		1,0670	4,362	0,60	3,76
1,0375		4,340	0,62	3,85	
			Rata-rata	3,89	
			SD	0,16	



pH	Pengulangan	Berat isolat (g)	Volume HCl (mL)	Nitrogen total (%)	Protein kasar (%)
11	1	1,0006	3,123	0,46	2,87
		1,0521	3,283	0,46	2,87
		1,0311	3,227	0,46	2,88
				Rata-rata	2,87
				SD	0,00
	2	1,0143	3,229	0,47	2,93
		1,0042	3,201	0,47	2,93
		1,0131	3,208	0,47	2,91
				Rata-rata	2,92
				SD	0,01
	3	1,0053	3,143	0,46	2,87
		1,0107	3,181	0,46	2,89
1,0042		3,122	0,46	2,86	
			Rata-rata	2,88	
			SD	0,02	

## Lampiran B. Pengaruh pakan terhadap kadar protein pada ikan

### B.1 Rendemen isolat

Sampel	Berat sampel (g)	Hasil isolasi (g)	Rendemen (%)
Pelet	50,0478	7,5213	15,03
	50,1026	7,4307	14,83
	50,0484	7,6211	15,23
	Rata-rata	7,5244	15,03
	SD	0,0952	0,20
Pelet dan <i>A. pinnata</i>	50,0930	4,5176	9,02
	50,0571	4,6440	9,28
	50,0801	4,4601	8,91
	Rata-rata	4,5406	9,07
	SD	0,0941	0,19
Pelet dicampur Probiotik	50,0240	10,3502	20,69
	50,0036	10,1880	20,37
	50,0260	10,1712	20,33
	Rata-rata	10,2365	20,47
	SD	0,0989	0,20

**B.2 Kadar protein kasar pada isolat**

<b>Sampel</b>	<b>Isolat</b>	<b>Berat isolat (g)</b>	<b>Volume HCl (mL)</b>	<b>Nitrogen total (%)</b>	<b>Protein kasar (%)</b>
Pelet	1	1,0006	3,116	0,46	2,86
		1,0621	3,176	0,44	2,75
		1,0111	3,045	0,44	2,77
				Rata-rata	2,79
				SD	0,06
	2	1,0043	3,128	0,46	2,86
		1,0036	3,092	0,45	2,83
		1,0052	3,114	0,46	2,85
				Rata-rata	2,85
				SD	0,02
	3	1,0073	3,166	0,46	2,89
		1,0127	3,070	0,45	2,79
		1,0012	3,096	0,45	2,84
				Rata-rata	2,84
				SD	0,05
Pelet dan <i>A. pinnata</i>	1	1,0052	2,168	0,32	1,98
		1,0100	2,242	0,33	2,04
		1,0027	2,160	0,32	1,98
				Rata-rata	2,00
				SD	0,03
	2	1,0401	2,160	0,31	1,91
		1,0411	2,133	0,30	1,88
		1,0523	2,126	0,30	1,86
				Rata-rata	1,88
				SD	0,03
	3	1,0025	2,166	0,32	1,99
		1,0011	2,202	0,32	2,02
		1,0110	2,164	0,31	1,97
				Rata-rata	1,99
				SD	0,03

<b>Sampel</b>	<b>Isolat</b>	<b>Berat isolat (g)</b>	<b>Volume HCl (mL)</b>	<b>Nitrogen total (%)</b>	<b>Protein kasar (%)</b>
Pelet dicampur Probiotik	1	1,0400	4,624	0,65	4,09
		1,0807	4,577	0,62	3,89
		1,0957	4,663	0,63	3,91
				Rata-rata	3,96
				SD	0,11
	2	1,0138	4,291	0,62	3,89
		1,0375	4,720	0,67	4,18
		1,0420	4,501	0,64	3,97
				Rata-rata	4,02
				SD	0,15
	3	1,0194	4,510	0,65	4,07
		1,0670	4,362	0,60	3,76
		1,0375	4,340	0,62	3,85
				Rata-rata	3,89
				SD	0,16

### B.3 Kadar protein kasar pada daging ikan

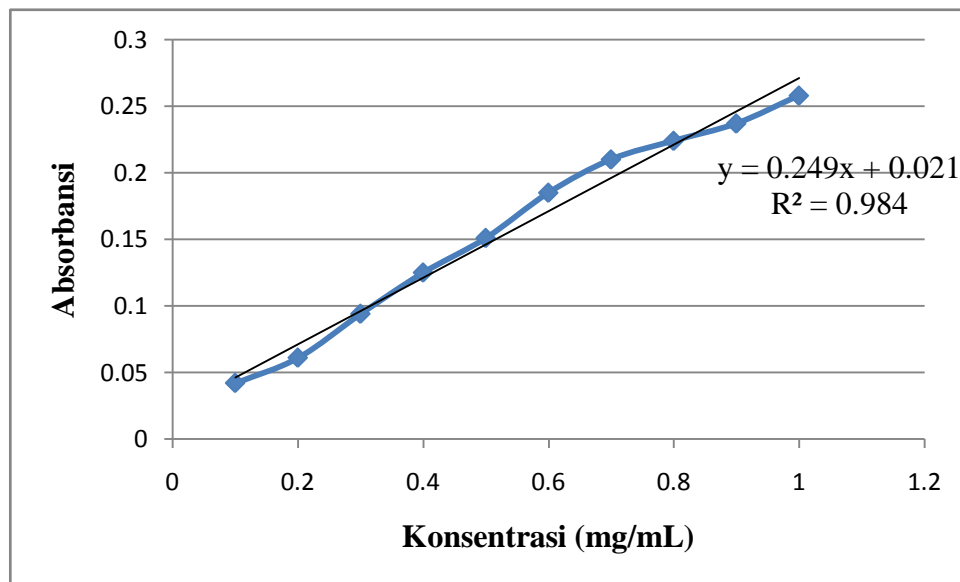
<b>Sampel</b>	<b>Berat isolat (g)</b>	<b>Volume HCl (mL)</b>	<b>Nitrogen total (%)</b>	<b>Protein kasar (%)</b>
Pelet	1,0111	16,388	2,38	14,90
	1,0130	16,212	2,35	14,71
	1,0551	16,330	2,28	14,23
			Rata-rata	14,62
			SD	0,35
Pelet dan <i>A. pinnata</i>	1,0583	15,021	2,09	13,05
	1,0027	14,701	2,16	13,48
	1,0097	14,862	2,17	13,53
			Rata-rata	13,35
			SD	0,27
Pelet dicampur Probiotik	1,0756	18,100	2,48	15,47
	1,0302	17,671	2,52	15,77
	1,0027	17,420	2,56	15,97
			Rata-rata	15,74
			SD	0,25

**B.4 Standar BSA (*Bovine serum albumin*)**

---

<b>Konsentrasi BSA (mg/mL)</b>	<b>Absorbansi</b>
0,1	0,042
0,2	0,061
0,3	0,094
0,4	0,125
0,5	0,151
0,6	0,185
0,7	0,210
0,8	0,224
0,9	0,237
1	0,258

---



### B.5 Kadar protein terlarut pada isolat

$$y = 0,249x + 0,021$$

<b>Sebelum hidrolisis</b>					
<b>Sampel</b>	<b>Absorbansi</b>			<b>Absorbansi Rata-rata</b>	<b>Protein terlarut (mg/mL)</b>
Pelet	0,236	0,236	0,235	0,236	0,862
	0,230	0,230	0,228	0,229	0,837
	0,232	0,235	0,253	0,240	0,880
	Rata-rata				0,859
	SD				0,022
Pelet dan <i>A. pinnata</i>	0,203	0,203	0,201	0,202	0,728
	0,200	0,198	0,203	0,200	0,720
	0,203	0,206	0,207	0,205	0,740
	Rata-rata				0,730
	SD				0,010
Pelet dicampur Probiotik	0,257	0,250	0,258	0,255	0,940
	0,257	0,252	0,254	0,254	0,937
	0,259	0,256	0,260	0,258	0,953
	Rata-rata				0,943
	SD				0,009

<b>Setelah hidrolisis</b>					
<b>Sampel</b>	<b>Absorbansi</b>			<b>Absorbansi Rata-rata</b>	<b>Protein terlarut (mg/mL)</b>
Pelet	0,048	0,046	0,044	0,046	0,100
	0,045	0,047	0,047	0,046	0,102
	0,049	0,044	0,045	0,046	0,100
	Rata-rata				0,101
	SD				0,001
Pelet dan <i>A. pinnata</i>	0,047	0,047	0,045	0,046	0,102
	0,047	0,049	0,043	0,046	0,102
	0,049	0,045	0,048	0,047	0,106
	Rata-rata				0,103
	SD				0,002
Pelet dicampur Probiotik	0,055	0,050	0,053	0,053	0,127
	0,056	0,053	0,050	0,053	0,129
	0,056	0,056	0,053	0,055	0,137
	Rata-rata				0,131
	SD				0,005

## Lampiran C. Analisis asam amino menggunakan LC-MS

### C.1 Informasi alat UPLC-QTOF-MS/MS System (Waters)

#### a. UPLC Acquity SDS (Waters)

Column : Acquity UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 50 mm

Flow rate : 0,3 mL/min

Injection : 5  $\mu\text{L}$

Temperatur : 40  $^{\circ}\text{C}$

Eluent : A.  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% formic acid

B. Acetonitrile + 0,1% formic acid

#### Gradient Method

Time (min)	% A	% B
0	98	2
3	98	2
9	0	100
10,7	0	100
11	98	2
13	98	2

#### b. MS XEVO-G2QTOF (Waters)

ESI Positive : m/z 70-1000 Da

Capillary voltage : 3 kV

Sample cone voltage : 38 V

Desolvation T : 300  $^{\circ}\text{C}$

Source T : 110  $^{\circ}\text{C}$

Desolvation gas : 500 L/h

Cone gas : 16 L/h

### C.2 Jenis dan jumlah asam amino dalam isolat daging ikan patin

No.	Asam amino	Berat molekul	Intensitas			Jumlah	% Relatif		
			Pelet	A. Pinnata	Probiotik		Pelet (%)	A. Pinnata (%)	Probiotik (%)
1	Metionin	149,051	491000	258000	254000	1003000	48,95	25,72	25,32
2	Triptofan	204,0899	93400	35100	0	128500	72,68	27,31	-
3	Histidin	155,0695	212000	177000	157000	546000	38,83	32,42	28,75
4	Treonin	119,0582	12300000	13300000	11000000	36600000	33,61	36,34	30,05
	Isoleusin/								
5	Leusin	131,0946	4070000	1700000	1540000	7310000	55,68	23,25	21,07
6	Fenilalanin	165,079	129000	92500	145000	366500	35,20	25,24	39,56
7	Lisin	146,1055	598000	369000	288000	1255000	47,65	29,40	22,95
8	Arginin	174,1117	611000	421000	455000	1487000	41,09	28,31	30,60
9	Valin	117,079	340000	119000	74600	533600	63,72	22,30	13,98
10	Tirosin	181,0739	420000	422000	151000	993000	42,29	42,50	15,21
11	Serin	105,0426	0	0	0	0	-	-	-
12	Glisin	75,032	0	0	0	0	-	-	-
13	Sistein	121,0197	0	0	0	0	-	-	-
14	Alanin	89,0477	0	0	0	0	-	-	-
15	Aspartat	133,0375	42100	0	0	42100	100	-	-
16	Asparagin	132,0535	0	81100	93300	174400	-	46,50	53,50
17	Glutamat	147,0532	0	115000	166000	281000	-	40,92	59,07
18	Glutamin	146,0691	499000	363000	226000	1088000	45,86	33,36	20,77
19	Prolin	115,0633	121000	37900	112000	270900	44,66	13,99	41,34



## Lampiran D. Pembuatan Larutan

### D.1 Larutan HCl 6 N

Sebanyak 49,7 mL HCl pekat 12,06 M, dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml yang telah berisi 30 mL akuades. Kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

Pembakuan larutan HCl 6 N dengan larutan baku boraks 1 N

Pipet 25 mL  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  1 N, dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 2 tetes indikator *metil orange*. Kemudian dititrasi dengan HCl, titrasi dihentikan jika warna campuran berubah dari kuning menjadi merah muda. Prosedur tersebut diulangi triplo.

Volume HCl: I. 8,248 mL

II. 8,235 mL

III. 8,216 mL

Volume HCl rata-rata: 8,233 mL

$$\frac{(V \times N)_{\text{HCl}}}{(V \times N)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{n_{\text{HCl}}}{n_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}}$$

$$\frac{(8,233 \times N)_{\text{HCl}}}{(25 \times 1)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{2}{1}$$

$$N_{\text{HCl}} = 6,073$$

### D.2 Larutan HCl 2 N

Sebanyak 41,5 mL HCl pekat 12,06 M, dimasukkan kedalam labu ukur 250 ml yang telah berisi 150 mL akuades. Kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

Pembakuan larutan HCl 2 N dengan larutan baku boraks 0,2 N

Pipet 25 mL  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,2 N, dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 2 tetes indikator *metil orange*. Kemudian dititrasi dengan HCl, titrasi

dihentikan jika warna campuran berubah dari kuning menjadi merah muda. Prosedur tersebut diulangi triplo.

Volume HCl: I. 4,955 mL  
 II. 4,941 mL  
 III. 4,846 mL

Volume HCl rata-rata: 4,914 mL

$$\frac{(V \times N)_{\text{HCl}}}{(V \times N)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{n_{\text{HCl}}}{n_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}}$$

$$\frac{(4,914 \times N)_{\text{HCl}}}{(25 \times 0,2)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{2}{1}$$

$$N_{\text{HCl}} = 2,035$$

### D.3 Larutan HCl 0,1 N

Sebanyak 8,3 mL HCl pekat 12,06 M, dimasukkan kedalam labu ukur 1000 ml yang telah berisi 500 mL akuades. Kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

Pembakuan larutan HCl 0,1 N dengan larutan baku boraks 0,05 N

Pipet 25 mL  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,05 N, dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 2 tetes indikator *metil orange*. Kemudian dititrasi dengan HCl, titrasi dihentikan jika warna campuran berubah dari kuning menjadi merah muda. Prosedur tersebut diulangi triplo.

Volume HCl: I. 24,126 mL  
 II. 24,228 mL  
 III. 24,462 mL

Volume HCl rata-rata: 24,272 mL

$$\frac{(V \times N)_{\text{HCl}}}{(V \times N)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{n_{\text{HCl}}}{n_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}}$$

$$\frac{(24,272 \times N)_{\text{HCl}}}{(25 \times 0,05)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{2}{1}$$

$$N_{\text{HCl}} = 0,103$$

#### D.4 Larutan HCl 0,02 N

Sebanyak 19,4 mL HCl 0,103 N, dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml yang telah berisi 50 mL akuades. Kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

Pembakuan larutan HCl 0,02 N dengan larutan baku boraks 0,005 N

Pipet 25 mL  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,005 N, dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 2 tetes indikator *metil orange*. Kemudian dititrasi dengan HCl, titrasi dihentikan jika warna campuran berubah dari kuning menjadi merah muda. Prosedur tersebut diulangi triplo.

Volume HCl: I. 11,861 mL  
 II. 11,921 mL  
 III. 11,930 mL

Volume HCl rata-rata: 11,904 mL

$$\frac{(V \times N)_{\text{HCl}}}{(V \times N)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{n_{\text{HCl}}}{n_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}}$$

$$\frac{(11,904 \times N)_{\text{HCl}}}{(25 \times 0,005)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{2}{1}$$

$$N_{\text{HCl}} = 0,021$$

### D.5 Larutan HCl 0,01 N

Sebanyak 9,7 mL HCl 0,103 N, dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml yang telah berisi 50 mL akuades. Kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

Pembakuan larutan HCl 0,01 N dengan larutan baku boraks 0,005 N

Pipet 25 mL  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,005 N, dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 2 tetes indikator *metil orange*. Kemudian dititrasi dengan HCl, titrasi dihentikan jika warna campuran berubah dari kuning menjadi merah muda. Prosedur tersebut diulangi triplo.

Volume HCl: I. 20,958 mL  
 II. 20,846 mL  
 III. 20,696 mL

Volume HCl rata-rata: 20,833 mL

$$\frac{(V \times N)_{\text{HCl}}}{(V \times N)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{n_{\text{HCl}}}{n_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}}$$

$$\frac{(20,833 \times N)_{\text{HCl}}}{(25 \times 0,005)_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}} = \frac{2}{1}$$

$$N_{\text{HCl}} = 0,012$$

### D.6 Larutan NaOH 40 % (w/w)

Disiapkan akuades dingin (hasil pendidihan selama 5 menit) sebanyak 600 mL. Timbang butiran NaOH bersama beaker glass sebanyak 400,0521 g. Segera tuangi 600 mL akuades dingin dan diaduk hingga larut. Larutan ini segera dituang kedalam botol, ditutup rapat dan diberi label.

### D.7 Larutan NaOH 2 N

Disiapkan akuades dingin (hasil pendidihan selama 5 menit) sebanyak 100 mL. Timbang butiran NaOH bersama beaker glass sebanyak 8,1851 g. Segera tuangi 50 mL akuades dingin dan diaduk hingga larut. Larutan ini segera dituang ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

Pembakuan larutan NaOH 2 N dengan larutan baku sekunder HCl 0,103 N

Pipet 25 mL HCl 0,103 N, dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 2 tetes indikator pp. Kemudian dititrasi dengan NaOH, titrasi dihentikan jika warna campuran berubah menjadi merah muda. Prosedur tersebut diulangi triplo.

Volume HCl: I. 1,265 mL

II. 1,258 mL

III. 1,269 mL

Volume HCl rata-rata: 1,264 mL

$$\frac{(V \times N)_{\text{NaOH}}}{(V \times N)_{\text{HCl}}} = \frac{n_{\text{NaOH}}}{n_{\text{HCl}}}$$

$$\frac{(1,264 \times N)_{\text{NaOH}}}{(25 \times 0,103)_{\text{HCl}}} = \frac{1}{1}$$

$$N_{\text{NaOH}} = 2,037$$

### D.8 Larutan NaOH 0,5 N

Disiapkan akuades dingin (hasil pendidihan selama 5 menit) sebanyak 100 mL. Timbang butiran NaOH bersama beaker glass sebanyak 2,0512 g. Segera tuangi 50 mL akuades dingin dan diaduk hingga larut. Larutan ini segera dituang ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

Pembakuan larutan NaOH 0,5 N dengan larutan baku sekunder HCl 0,103 N

Pipet 25 mL HCl 0,103 N, dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 2 tetes indikator pp. Kemudian dititrasi dengan NaOH, titrasi dihentikan jika warna campuran berubah menjadi merah muda. Prosedur tersebut diulangi triplo.

Volume HCl: I. 5,048 mL

II. 5,045 mL

III. 5,054 mL

Volume HCl rata-rata: 5,049 mL

$$\frac{(V \times N)_{\text{NaOH}}}{(V \times N)_{\text{HCl}}} = \frac{n_{\text{NaOH}}}{n_{\text{HCl}}}$$

$$\frac{(5,049 \times N)_{\text{NaOH}}}{(25 \times 0,103)_{\text{HCl}}} = \frac{1}{1}$$

$$N_{\text{NaOH}} = 0,510$$

#### D.9 Larutan NaOH 0,01 N

Disiapkan akuades dingin (hasil pendidihan selama 5 menit) sebanyak 500 mL. Timbang butiran NaOH bersama beaker glass sebanyak 0,1125 g. Segera tuangi 100 mL akuades dingin dan diaduk hingga larut. Larutan ini segera dituang ke dalam labu ukur 250 mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

Pembakuan larutan NaOH 0,01 N dengan larutan baku  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  0,01 N

Pipet 20 mL  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  0,01 N, dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. Ditambahkan 2 tetes indikator pp. Kemudian dititrasi dengan NaOH, titrasi dihentikan jika warna campuran berubah menjadi merah muda. Prosedur tersebut diulangi triplo.

Volume HCl: I. 28,570 mL  
 II. 28,574 mL  
 III. 28,570 mL

Volume HCl rata-rata: 28,571 mL

$$\frac{(V \times N)_{\text{NaOH}}}{(V \times N)_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}} = \frac{n_{\text{NaOH}}}{n_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}}$$

$$\frac{(28,571 \times N)_{\text{NaOH}}}{(20 \times 0,01)_{\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4}} = \frac{2}{1}$$

$$N_{\text{NaOH}} = 0,014$$

#### **D.10 Larutan indikator fenolftalein (PP)**

Sebanyak 0.1010 g fenolftalein dilarutkan dalam 100 mL etanol. Kemudian ditambahkan akuades 100 mL dan dihomogenkan.

#### **D.11 Larutan indikator metil orange**

Sebanyak 0.0104 g metil orange dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 mL dalam beaker glass. Diaduk – aduk sampai semua terlarut dan homogen.

#### **D.12 Larutan indikator brom cressol green**

Sebanyak 0,0103 g indikator *brom cressol green* dilarutkan dalam 10 mL metanol. Diaduk hingga larut, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

#### **D.13 Larutan indikator metil red**

Sebanyak 0,0101 g indikator *metil red* dilarutkan dalam 10 mL metanol. Diaduk hingga larut, disimpan di dalam botol, dan diberi label.

**D.14 Larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1% (w/v)**

Sebanyak 10,0284 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dilarutkan dalam akuademin panas. Dimasukkan kedalam labu ukur 1000 mL dan ditambahkan akuademin hingga volume 900 mL. Larutan di dinginkan pada suhu ruang, kemudian ditambahkan 10 mL larutan indikator *brom cressol green* dan 7 mL larutan indikator *metil red*. Larutan diencerkan dengan akuademin hingga tanda batas. Dikocok, disimpan di dalam botol, dan diberi label.



## E. Sertifikat

### E.1 Surat keterangan identifikasi ikan patin (*Pangasius djambal*)



**PEMERINTAH KABUPATEN LUMAJANG  
DINAS KELAUTAN DAN PERIKANAN**

Jln. Jend. A. Yani No. 10 Telp. ( 0334 ) 881720 Fax. (0334) 888980

**LUMAJANG - 67316**

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen hewan yang telah dibeli dari Balai Benih Ikan (BBI) Kabupaten Lumajang :

Nama / NIM : 1. Meirinda Hermiastuti  
2. Alviona Noer Isnani  
3. Dodik Andinata  
4. Novita Rahmawati

Jur. / Fak. / PT : Kimia / FMIPA / Universitas Jember

maka dapat disampaikan bahwa spesimen tersebut adalah :

*Pangasius djambal*

( Family – *Pangasidae* ; Vernacular name – ikan patin )

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 25 Oktober 2012

Kepala  
Balai Benih Ikan - Lumajang



Dedy Wahyu Djatmiko, SPi  
NIP. 19720724 199901 1 001

## E.2 Surat keterangan identifikasi *Azolla pinnata*

**HERBARIUM JEMBERIENSE (JR)  
JURUSAN BIOLOGI-FMIPA UNIVERSITAS JEMBER  
JEMBER, INDONESIA**

---

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh :

Nama/NIM : Meirinda Hermiastuti /081810301047  
Jur./Fak./PT : Kimia/FMIPA/Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut adalah :

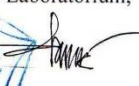
1. *Azolla pinnata* R.Br.

(Family – Azollaceae ; Vernacular name – mata lele, kayu apu dadak)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 24 Juli 2012

Ka. Laboratorium,

  
Dra. Dwi Setyati, MSi  
NIP 196404171991032001

### E.3 Sertifikat Hasil Uji LC-MS Sampel Pellet



LABORATORIUM PENGUJI  
BALAI PENGKAJIAN BIOTEKNOLOGI  
BADAN PENGKAJIAN DAN PENERAPAN TEKNOLOGI  
Gd. 630 Kawasan Puspiptek Serpong 15314  
Tel : 021-756-3120, 021-756-0562 ext 1548  
Fax : 021-756-0208  
E-mail : lab\_biotekbppt@yahoo.com

F405.10-2.1 : Ed 3 : Rev 0

### SERTIFIKAT HASIL UJI

Nama pelanggan : Ika Oktavianawati, MSc Halaman : 1 dari 1  
Alamat pelanggan : Jurusan Kimia, FMIPA Tanggal penerimaan : 6 Maret 2013  
Univerrrsitas Negeri Jember Tanggal Pengujian : 25 Maret 2013  
Jl. Kalimantan III/25 Jember - 68121 Tanggal sertifikat : 1 April 2013  
Jawa Timur No. Sertifikat : 035-SHU-04-2013  
Jenis bahan uji : Hidrolisat

No. Urut	Kode Sampel Pelanggan	Parameter	Satuan	Hasil	Intensitas	Metode
1	1	Isoleucine / Leucine	Kualitatif	Positif	4070000	LC_MS
		Lysine	Kualitatif	Positif	598000	
		Methionine	Kualitatif	Positif	491000	
		Phenylalanine	Kualitatif	Positif	129000	
		Threonine	Kualitatif	Positif	12300000	
		Tryptophan	Kualitatif	Positif	93400	
		Valine	Kualitatif	Positif	340000	
		Arginine	Kualitatif	Positif	611000	
		Histidine	Kualitatif	Positif	212000	
		Alanine	Kualitatif	Negatif	0	
		Asparagine	Kualitatif	Negatif	0	
		Aspartate	Kualitatif	Positif	42100	
		Cysteine	Kualitatif	Negatif	0	
		Glutamate	Kualitatif	Negatif	0	
		Glutamine	Kualitatif	Positif	499000	
		Glycine	Kualitatif	Negatif	0	
Proline	Kualitatif	Positif	121000			
Serine	Kualitatif	Negatif	0			
Tyrosine	Kualitatif	Positif	420000			

Manajer Teknis  
Laboratorium Kimia Analitik

  
  
Drs. Niki B. Nugroho, M. Si

Hasil yang terdapat pada sertifikat ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji.  
Sertifikat ini sah bila telah dibubuhi cap Balai Pengkajian Bioteknologi – BPPT dan ditandatangani oleh pejabat yang berwenang.

## E.4 Sertifikat Hasil Uji LC-MS Sampel A. *Pinnata*



LABORATORIUM PENGUJI  
BALAI PENGKAJIAN BIOTEKNOLOGI  
BADAN PENGKAJIAN DAN PENERAPAN TEKNOLOGI  
Gd. 630 Kawasan Puspiptek Serpong 15314  
Tel : 021-756-3120, 021-756-0562 ext 1548  
Fax : 021-756-0208  
E-mail : lab\_biotechbppt@yahoo.com

F405 10-2.1 : Ed 3 : Rev 0

### SERTIFIKAT HASIL UJI

Nama pelanggan : Ika Oktavianawati, MSc Halaman : 1 dari 1  
Alamat pelanggan : Jurusan Kimia, FMIPA Tanggal penerimaan : 10 Maret 2013  
Universitas Negeri Jember Tanggal Pengujian : 15 Maret 2013  
Jl. Kalimantan III/25 Jember - 68121 Tanggal sertifikat : 18 April 2013  
Jawa Timur No. Sertifikat : 053-SHU-04-2013  
Jenis bahan uji : Hidrolisat

No. Urut	Kode Sampel Pelanggan	Parameter	Satuan	Hasil	Intensitas	Metode
1	2	Isoleucine / Leucine	Kualitatif	Positif	1700000	LC_MS
		Lysine	Kualitatif	Positif	369000	
		Methionine	Kualitatif	Positif	258000	
		Phenylalanine	Kualitatif	Positif	92500	
		Threonine	Kualitatif	Positif	13300000	
		Tryptophan	Kualitatif	Positif	35100	
		Valine	Kualitatif	Positif	119000	
		Arginine	Kualitatif	Positif	421000	
		Histidine	Kualitatif	Positif	177000	
		Alanine	Kualitatif	Negatif	0	
		Asparagine	Kualitatif	Positif	81100	
		Aspartate	Kualitatif	Negatif	0	
		Cysteine	Kualitatif	Negatif	0	
		Glutamate	Kualitatif	Positif	115000	
		Glutamine	Kualitatif	Positif	363000	
		Glycine	Kualitatif	Negatif	0	
Proline	Kualitatif	Positif	37900			
Serine	Kualitatif	Negatif	0			
Tyrosine	Kualitatif	Positif	422000			

Manajer Teknis  
Laboratorium Kimia Analitik



Dr. Noki B. Nugroho, M. Si

Hasil yang terdapat pada sertifikat ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji.  
Sertifikat ini sah bila telah dibubuhi cap Balai Pengkajian Bioteknologi – BPPT dan ditandatangani oleh pejabat yang berwenang.

## E.5 Sertifikat Hasil Uji LC-MS Sampel Probiotik



LABORATORIUM PENGUJI  
BALAI PENGKAJIAN BIOTEKNOLOGI  
BADAN PENGKAJIAN DAN PENERAPAN TEKNOLOGI  
Gd. 630 Kawasan Puspiptek Serpong 15314  
Tel : 021-756-3120, 021-756-0562 ext 1548  
Fax : 021-756-0208  
E-mail : lab\_biotekbppt@yahoo.com

F405.10-2.1 ; Ed 3 ; Rev 0

### SERTIFIKAT HASIL UJI

Nama pelanggan : Ika Oktavianawati, MSc Halaman : 1 dari 1  
Alamat pelanggan : Jurusan Kimia, FMIPA Tanggal penerimaan : 10 Maret 2013  
Universitas Negeri Jember Tanggal Pengujian : 15 Maret 2013  
Jl. Kalimantan III/25 Jember - 68121 Tanggal sertifikat : 18 April 2013  
Jawa Timur No. Sertifikat : 054-SHU-04-2013  
Jenis bahan uji : Hidrolisat

No. Urut	Kode Sampel Pelanggan	Parameter	Satuan	Hasil	Intensitas	Metode
1	3	Isoleucine / Leucine	Kualitatif	Positif	1540000	LC_MS
		Lysine	Kualitatif	Positif	288000	
		Methionine	Kualitatif	Positif	254000	
		Phenylalanine	Kualitatif	Positif	145000	
		Threonine	Kualitatif	Positif	11000000	
		Tryptophan	Kualitatif	Negatif	0	
		Valine	Kualitatif	Positif	74600	
		Arginine	Kualitatif	Positif	455000	
		Histidine	Kualitatif	Positif	157000	
		Alanine	Kualitatif	Negatif	0	
		Asparagine	Kualitatif	Positif	93300	
		Aspartate	Kualitatif	Negatif	0	
		Cysteine	Kualitatif	Negatif	0	
		Glutamate	Kualitatif	Positif	166000	
		Glutamine	Kualitatif	Positif	226000	
		Glycine	Kualitatif	Negatif	0	
Proline	Kualitatif	Positif	112000			
Serine	Kualitatif	Negatif	0			
Tyrosine	Kualitatif	Positif	151000			

Manajer Teknis  
Laboratorium Kimia Analitik



Dr. Nuki B. Nugroho, M. Si

Hasil yang terdapat pada sertifikat ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji.  
Sertifikat ini sah bila telah dibubuhi cap Balai Pengkajian Bioteknologi – BPPT dan ditandatangani oleh pejabat yang berwenang.