



**ANALISIS KADAR NITROGEN TERLARUT HASIL
HIDROLISIS UDANG MENGGUNAKAN
ENZIM PROTEASE USUS AYAM**

SKRIPSI

Oleh

**Anisa Kholifatul Listyani
NIM 141810301004**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Proposal berjudul “Analisis Kadar Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis Udang Menggunakan Enzim Protease Usus Ayam” telah disetujui pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

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

Dr. A.A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si.
NIP 197012251997022001



**ANALISIS KADAR NITROGEN TERLARUT HASIL
HIDROLISIS UDANG MENGGUNAKAN
ENZIM PROTEASE USUS AYAM**

SKRIPSI

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

Oleh

**Anisa Kholifatul Listyani
NIM 141810301004**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua tercinta, Ibunda Endang Kuswinarni, Ibunda Sulistyowati, ayahanda Solehan, dan ayahanda Khoirul Anam yang senantiasa memberikan doa, cinta, kasih sayang, motivasi, dan mendidik hingga saat ini.
2. Kakak dan adik saya tercinta, Rininta Aulia Draftiani, Rikinta Desi Arfitasari, S.P., Rizki Dea Aninda Pratiwi dan Aulya Aini yang senantiasa memberikan semangat dan dukungan kepada saya;
3. Guru-guru di TK Al-Hidayah 81 Ambulu-Jember, MI Miftahul Ulum 29 Ambulu-Jember, SMPN 1 Ambulu, SMAN Ambulu yang telah memberikan ilmu dan bimbingan dengan baik;
4. Drs. Achmad Sjaifullah M.Sc., Ph.D, dan Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si, selaku Dosen Pembimbing, serta I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si, dan Drs.Siswoyo, M.Sc., Ph.D, selaku Dosen Penguji.
5. Almamater tercinta, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”
(Terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 6-8)*)



*) Departemen Agama RI. 2006. Al Qur'an dan Terjemahnya. Bandung: CV Penerbit Diponegoro.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Anisa Kholifatul Listyani

NIM : 141810301004

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis Kadar Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis Udag Menggunakan Enzim Protease Usus Ayam” 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, April 2019

Yang menyatakan,

Anisa Kholifatul Listyani
NIM 141810301004

SKRIPSI

**ANALISIS KADAR NITROGEN TERLARUT HASIL
HIDROLISIS UDANG MENGGUNAKAN
ENZIM PROTEASE USUS AYAM**

Oleh

Anisa Kholifatul Listyani
NIM 141810301004

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. A.A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis Kadar Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis Udang Menggunakan Enzim Protease Usus Ayam” telah disetujui pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

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

Dr. A.A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si
NIP 197012251997022001

Anggota II,

Anggota III,

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

Drs.Siswoyo, M.Sc., Ph.D.
NIP 196605291993031003

Mengesahkan
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Analisis Kadar Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis Udang Menggunakan Enzim Protease Usus Ayam; Anisa Kholifatul Listyani, 141810301004; 2019; 36 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Udang merupakan salah satu hasil laut dan komponen penting bagi sektor perikanan di Indonesia. Kandungan yang ada ada udang putih meliputi karbohidrat 1,4%, lemak 0,8%, air 78,2%, kalium 0,81% dan protein 18,1%. Protein udang yang cukup tinggi ini dapat dimanfaatkan sebagai hidrolisat protein udang. Pembuatan hidrolisat protein udang dapat dilakukan dengan dua metode yaitu, kimia dan enzimatis. Proses hidrolisis menggunakan enzim memiliki kelebihan dibandingkan menggunakan metode secara kimia. Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis adalah enzim protease yang berasal dari usus ayam. Variasi pH dan waktu inkubasi digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh terhadap kadar nitrogen dan protein terlarut yang dihasilkan. Metode yang digunakan untuk menganalisis keduanya yaitu titrasi formol dan bradford. Manfaat penelitian ini adalah diharapkan dapat meningkatkan produk olahan dari hidrolisat protein udang serta memberikan informasi mengenai kandungan enzim protease yang terdapat pada usus ayam. Selain itu diharapkan dapat memberikan informasi terhadap bidang ilmu mengenai pengaruh variasi pH asam terhadap hasil hidrolisis udang dan variasi waktu inkubasi terhadap proses hidrolisisnya terhadap kadar nitrogen terlarut hasil hidrolisis protein udang.

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai November 2018. Tempat penelitian di Laboratorium Kimia Organik dan Kimia Analitik Jurusan Kimia Universitas Jember. Udang yang digunakan pada penelitian ini adalah udang putih yang diperoleh dari tambak “Alam Citra Sarana Intam” Desa Pagar Carang Kecamatan Suboh Kabupaten Situbondo dan usus ayam yang digunakan yaitu

usus halus ayam broiler yang diperoleh dari pemotongan ayam di kelurahan Tegal Besar, Kecamatan Sumbersari Jember. Penelitian yang dilakukan meliputi proses preparasi sampel udang dan usus ayam, proses preparasi sampel homogenat, proses hidrolisis dan analisis hidrolisat protein menggunakan metode tritiasi formol dan metode Bradford.

Hasil dari penelitian adalah variasi pH dan waktu inkubasi yang telah dilakukan memberikan pengaruh terhadap proses hidrolisis. Hal ini ditunjukkan dari kadar nitrogen terlarut dan protein terlarut yang dihasilkan dari penelitian. Kadar nitrogen terlarut dan protein terlarut dalam kontrol pada waktu inkubasi dan pH memiliki nilai yang berbeda-beda. Hal ini juga ditunjukkan untuk kadar nitrogen terlarut dan protein terlarut dalam sampel. Kadar nitrogen dan protein terlarut terbesar dalam kontrol dan sampel terjadi pada pH 2,5 dan waktu inkubasi selama 18 jam.

Kadar nitrogen dan protein terlarut dalam sampel nilainya lebih besar dibandingkan dalam kontrol. Hal ini disebabkan karena dalam sampel terdapat usus ayam yang membantu proses hidrolisis. Usus ayam merupakan salah satu jaringan penghasil enzim protease. Enzim protease yang berperan dalam proses hidrolisis pada penelitian ini adalah *Cathepsin D*. Enzim tersebut memiliki aktivitas optimum pada pH 2-2,5 sehingga pada pH tersebut kadar nitrogen dan protein terlarut yang didapatkan lebih besar dibandingkan variasi pH yang lain, sedangkan enzim protease yang ada di udang bekerja pada pH 2-4 namun aktivitas tertingginya pada pH 3. Hal tersebut membuat pada campuran udang dan usus ayam nilainya lebih rendah dibandingkan kontrol usus ayam yang telah dilakukan oleh Aulia (2017). Beberapa hal lain seperti konsentrasi, inhibitor, aktivitas enzim juga mempengaruhi kadar nitrogen dan protein usus ayam yang lebih besar dibandingkan kontrol udang dan campuran usus ayam dan udang (sampel).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa kadar nitrogen dan protein terlarut hasil hidrolisis udang menggunakan protease usus ayam dipengaruhi oleh kondisi pH dan lama waktu inkubasi saat terjadi proses hidrolisis.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT. atas segala rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Kadar Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis Udang Menggunakan Enzim Protease Usus Ayam”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Orang tua tercinta, Ibunda Endang Kuswinarni, Ibunda Sulistyowati, ayahanda Solehan, dan ayahanda Khoirul Anam yang senantiasa mendukung, memberikan motivasi, kasih sayang, dan mendidik hingga saat ini.
2. Bapak Drs. Sujito, Ph.D selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
3. Bapak Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
4. Bapak Drs. Achmad Sjaifullah M.Sc., Ph.D, dan Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si, selaku Dosen Pembimbing yang telah berkenan untuk membimbing dengan sabar, membrikan nasehat, koreksi, kritik dan saran selama penyusunan skripsi ini.
5. Bapak I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si, dan Drs.Siswoyo, M.Sc., Ph.D, selaku Dosen Penguji yang telah berkenan untuk menguji skripsi ini dan memberikan nasehat, koreksi, kritik dan saran untuk pengembangan diri dan menyempurnakan penyusunan skripsi;
6. Ibu Tanti Haryati S.Si., M.Si selaku dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
7. Dosen-dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah memberikan bekal ilmu kepada penulis selama menyelesaikan studi di Jurusan Kimia;

8. Teknisi laboratorium Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah membantu baik fisik, pikiran, maupun waktu ketika penelitian ini dilakukan;
9. Keluarga besar Majesty, keluarga tempat saling belajar, berjuang, berbagi pengalaman, terimakasih atas semangat, doa, dan bantuan sejak awal bertemu;
10. Rekan kerja dalam penelitian yaitu Hilda Shakra yang senantiasa memberikan bantuan, motivasi dan kerja samanya;
11. Keluarga besar KOS AL FAROBI, vidya, desy, suci yang telah memberikan semangat dan dukungan;
12. Sobi-sobiku siti zulaicha dan hanifa hanun yang telah membantu tenaga, pikiran dari awal hingga akhir penelitian ini terselesaikan;
13. Seseorang yang tersayang yang telah membantu dan memberikan semangat, motivasi serta dukungan;
14. 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, April 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN SAMPUL	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN MOTO	v
HALAMAN PERNYATAAN	vi
HALAMAN PEMBIMBING	vii
HALAMAN PENGESAHAN	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Udang Putih	5
2.2 Protein	7
2.2.1 Struktur Protein	7
2.2.2 Protein Udang	9
2.2.3 Hidrolisis Protein	9
2.3 Enzim Protease Usus Ayam	11
2.4 Nitrogen Terlarut	13
2.5 Analisis Protein	13
2.5.1 Titrasi Formol	14
2.5.2 Metode Bradford	14
2.5.3 Spektrofotometri <i>Visible</i>	15
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan	17
3.2.1 Alat	17
3.2.2 Bahan	17
3.3 Diagram Alir Penelitian	18
3.4 Prosedur Kerja	19

3.4.1 Preparasi Sampel Udang.....	19
3.4.2 Preparasi Sampel Usus Ayam.....	19
3.4.3 Preparasi Sampel Homogenat.....	19
a. Sampel Kontrol.....	19
b. Sampel pH Asam.....	20
3.4.4 Hidrolisis Udang pada Berbagai Kondisi pH Asam dan Variasi Waktu Inkubasi.....	20
a. Sampel Kontrol.....	20
b. Sampel pH Asam.....	20
3.4.5 Penentuan Kadar Nitrogen Terlarut Udang pada Berbagai Kondisi pH dan Waktu Inkubasi Menggunakan Metode Titrasi Formol.....	21
a. Menyiapkan Larutan Blanko.....	21
b. Menyiapkan Larutan Sampel.....	21
3.4.6 Metode Penentuan N-terlarut Menggunakan Titrasi Formol.....	21
3.4.7 Penentuan Kadar Protein Terlarut Udang pada Berbagai Kondisi pH dan Waktu Inkubasi Menggunakan Metode Bradford.....	21
a. Menyiapkan Larutan Induk Bradford.....	21
b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	22
c. Kurva Kalibrasi Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)....	22
d. Penentuan Kadar Protein Menggunakan Metode Bradford.....	22
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Kadar Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis.....	23
4.2 Kadar Nitrogen Protein Hasil Hidrolisis.....	26
4.3 Kadar Nitrogen dan Protein Terlarut pada Usus Ayam.....	32
BAB 5. PENUTUP.....	
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Jenis Enzim Protease Usus Ayam Beserta Aktivitas Spesifiknya	12
2.2 Panjang Gelombang Berbagai Warna Cahaya pada Daerah <i>Visible</i>	16
4.1 Kadar Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis Udang tanpa Penambahan Usus Ayam (Kontrol).....	24
4.2 Kadar Nitrogen Terlarut Hasil Hidrolisis Udang dengan Penambahan Usus Ayam (Sampel)	24
4.3 Kadar Protein Terlarut Hasil Hidrolisis Udang tanpa Penambahan Usus Ayam (Kontrol).....	29
4.4 Kadar Protein Terlarut Hasil Hidrolisis Udang dengan Penambahan Usus Ayam (Sampel)	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Udang Putih (<i>L. vannamei</i>)	6
2.2 Struktur Dasar Asam Amino	7
2.3 Struktur Asam Amino	8
2.4 Reaksi Hidrolisis Menggunakan Protease	9
2.5 Sistem Pencernaan Ayam Secara Umum	12
2.6 Reaksi pada Metode Bradford	15
2.7 Kurva Hukum Lambert-Beer	19
4.1 Kadar Nitrogen Terlarut Kontrol dan Sampel	25
4.2 Panjang Gelombang Maksimum BSA dengan Reagen Bradford	27
4.3 Kurva Kalibrasi Larutan Standar BSA dengan Reagen Bradford pada Panjang Gelombang 584 nm	28
4.4 Kadar Protein Terlarut Kontrol dan Sampel	31
4.5 Kadar Nitrogen Terlarut Kontrol dan Sampel (Aulia, 2017)	32
4.6 Kadar Protein Terlarut Kontrol dan Sampel (Aulia, 2017)	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1.1 Pembuatan Larutan NaOH	39
1.2 Standarisasi Larutan NaOH.....	39
1.3 Pembuatan Larutan Induk BSA	40
1.4 Pembuatan Larutan Standar BSA.....	40
2.1 Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	41
3.1 Data Absorbansi Larutan Standar BSA	44
4.1 Pengaruh pH dan Waktu Inkubasi terhadap Kadar Nitrogen Terlarut.....	45
4.1.1 Hasil Analisis pada Kontrol.....	45
4.1.2 Hasil Analisis pada Sampel	46
4.2 Perhitungan Nitrogen Terlarut menggunakan Metode Titrasi Formol	47
5.1 Pengaruh pH terhadap Kadar Protein Terlarut.....	50
5.1.1 Hasil Analisis pada Kontrol.....	50
5.1.2 Hasil Analisis pada Sampel	51
5.2 Perhitungan Kadar Protein Terlarut dalam Kontrol	52
5.3 Perhitungan Kadar protein Terlarut dalam Sampel.....	53

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Udang merupakan salah satu hasil laut dan komponen penting bagi perikanan di Indonesia. Data ekspor Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) tercatat bahwa volume ekspor udang periode Januari – Juni 2016 naik 8,5% dari 96,685 ton menjadi 107,539 ton. Dari sisi nilainya juga naik sekitar 10,6% dari US\$ 851,199 menjadi US\$ 882,092 (Kementrian Kelautan dan Perikanan, 2016). Kandungan yang ada ada udang putih meliputi karbohidrat 1,4%, lemak 0,8%, air 78,2%, kalium 0,81% dan protein 18,1% (Hadiwiyoto, 1993). Protein sendiri merupakan makromolekul yang tersusun atas dasar asam amino (Katili, 2009). Protein yang terkandung pada udang cukup tinggi sehingga perlu adanya produk olahan protein udang untuk pemanfaatan yang lebih lanjut seperti hidrolisat protein udang. Hidrolisat protein udang ini dapat dimanfaatkan secara luas untuk bahan pangan, pakan maupun non-pangan. Salah satu contoh pemanfaatan hidrolisat protein dalam bahan pangan adalah bumbu masakan atau pembangkit rasa gurih alami (Cordle, 1994).

Hidrolisat protein udang (HPU) merupakan produk olahan protein udang dengan cara hidrolisis kimia maupun biokimia yang menghasilkan polipeptida dengan ukuran yang lebih pendek dan sifat fisiko kimia yang berbeda dari protein semula (Clemente *et al.*, 1999). HPU sama halnya dengan hidrolisat protein ikan yang merupakan olahan protein yang tidak hanya sebagai makanan ternak tapi juga untuk bahan makanan tambahan seperti pengganti susu dan suplemen protein (Skanderby, 1994).

Pembuatan HPU dapat dilakukan dengan dua metode yaitu, kimia dan enzimatis. Metode kimia ini menggunakan asam atau basa dan metode enzimatis ini menggunakan enzim. Metode kimia yang menggunakan asam dan basa ini masing-masing memiliki kekurangan. Penggunaan asam untuk proses hidrolisis ini akan berakibat pada rusaknya asam amino diantaranya triptofan, serin dan treonin (Sumardji, 2009). Selain itu juga produk yang dihasilkan menjadi sangat asam sehingga perlu dinetralkan dengan alkali hingga pH 7 (Johnson dan

Peterson, 1974). Metode kimia yang lain yaitu dengan basa juga memiliki kekurangan diantaranya kelarutan hidrolisat yang rendah dan beberapa asam amino seperti sistein, serin dan treonin dapat hilang selama proses hidrolisis (Kristinnson dan Rasco, 2000). Proses hidrolisis menggunakan enzim memiliki kelebihan antara lain proses hidrolisisnya dapat dikontrol, aktivitas emulsi tinggi, tidak terbentuk humin, tirosin dan triptopan tidak mengalami kerusakan dan mempunyai kapasitas pengikatan air yang tinggi (Clemente *et al.*, 1999). Sehingga pada penelitian ini digunakan enzim untuk proses hidrolisis.

Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis adalah enzim protease yang berasal dari usus ayam. Menurut Ockerman dan Hansen (2000) usus ayam ini merupakan jaringan yang mengandung enzim protease. Kandungan enzim protease yang paling banyak terdapat dalam usus ayam adalah cathepsin D (Jamdar dan Harikumar, 2005). Cathepsin D ini memiliki pH optimum 2,5-2,8 (Iodice, 1966). Proses hidrolisis ini dilakukan pada kondisi asam karena enzim protease optimal pada pH 2,5 (Raju *et al.*, 1997) sehingga pada penelitian ini dilakukan variasi pH asam.

Pengaruh pada proses hidrolisis yang lain adalah waktu inkubasi. Waktu inkubasi optimal untuk Variasi lain yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah waktu inkubasi. Aulia (2017) telah melakukan degradasi autolisis menggunakan protease usus ayam dengan variasi pH dan waktu inkubasi. Penelitian tersebut dilakukan dengan mengukur kadar nitrogen terlarut dan kadar protein terlarut, hasil yang diperoleh nilai kadar nitrogen terlarut dan kadar protein terlarut tertinggi terdapat pada pH 2,5 dan waktu inkubasi 18 jam. Sehingga pada penelitian ini dilakukan waktu inkubasi selama 18 jam namun dengan substrat yang berbeda yaitu substrat udang.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh variasi pH asam dan waktu inkubasi terhadap kadar nitrogen terlarut hasil hidrolisis udang menggunakan protease usus ayam?
2. Bagaimana pengaruh variasi pH asam dan waktu inkubasi terhadap kadar protein terlarut hasil hidrolisis udang menggunakan protease usus ayam?

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Udang yang digunakan adalah udang utuh jenis udang putih (*L. Vannamei*) yang dibeli di tambak “Alam Citra Sarana Intam” Desa Pagar Carang Kecamatan Suboh Kabupaten Situbondo.
2. Usus ayam broiler yang digunakan diperoleh dari tempat pemotongan ayam di daerah kelurahan Tegal Besar.
3. Tidak dilakukan uji aktivitas enzim.

1.4. Tujuan Penelitian

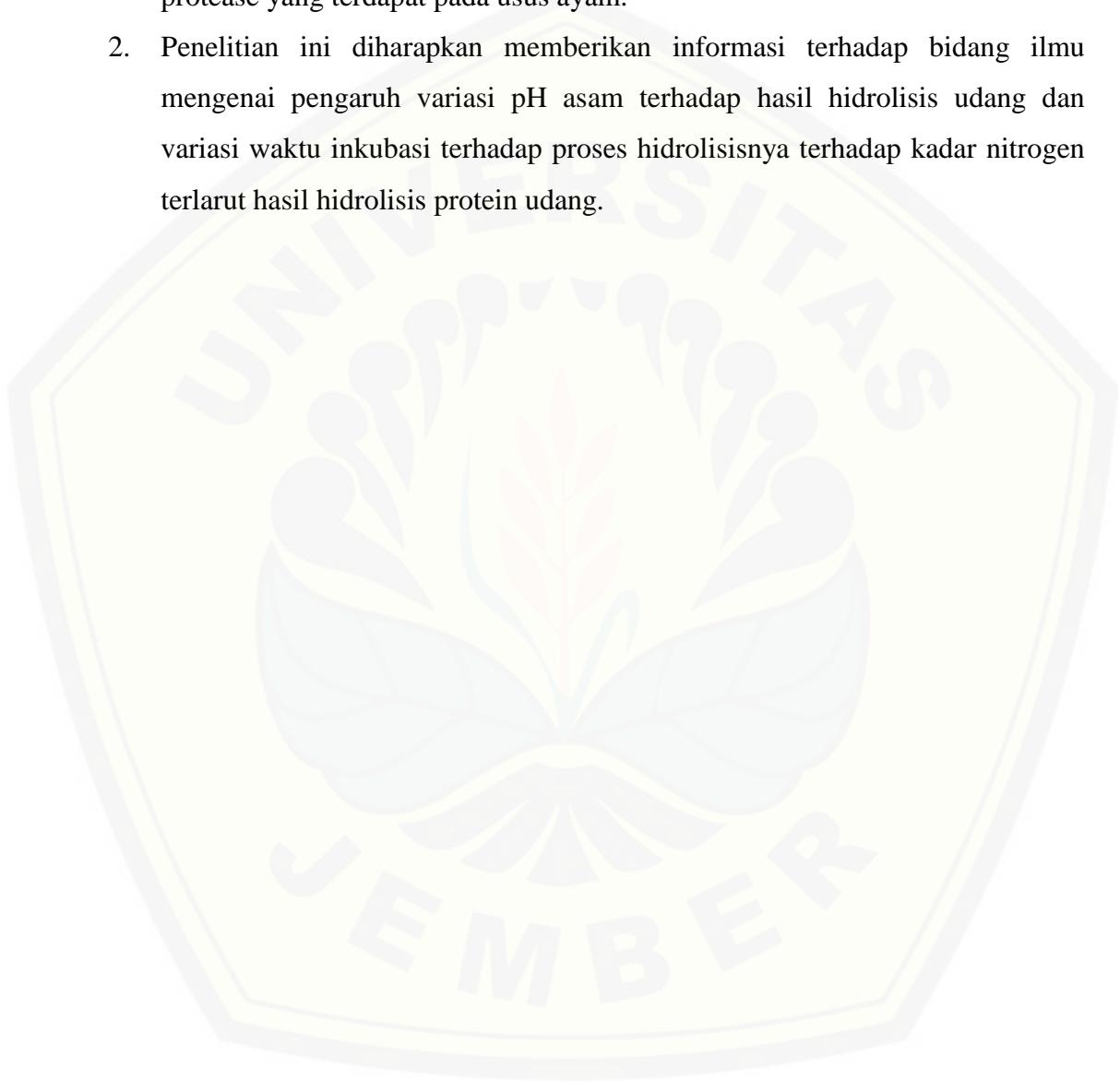
Tujuan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh variasi pH asam dan waktu inkubasi terhadap kadar nitrogen terlarut hasil hidrolisis udang menggunakan protease usus ayam.
2. Mengetahui pengaruh variasi pH asam dan waktu inkubasi terhadap kadar protein terlarut hasil hidrolisis udang menggunakan protease usus ayam.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan produk olahan dari hidrolisat protein udang serta memberikan informasi mengenai kandungan enzim protease yang terdapat pada usus ayam.
2. Penelitian ini diharapkan memberikan informasi terhadap bidang ilmu mengenai pengaruh variasi pH asam terhadap hasil hidrolisis udang dan variasi waktu inkubasi terhadap proses hidrolisisnya terhadap kadar nitrogen terlarut hasil hidrolisis protein udang.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*)

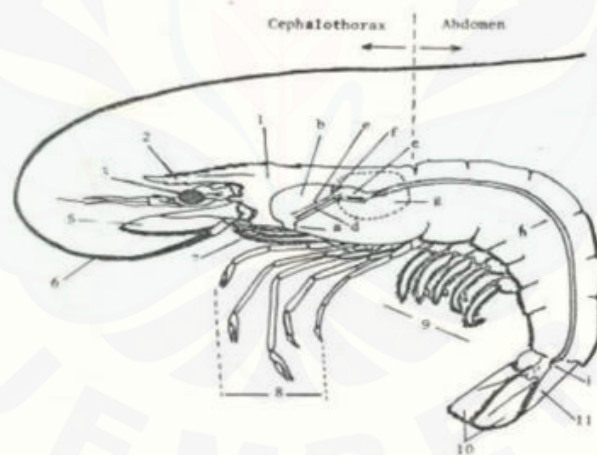
Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu spesies udang yang memiliki nilai ekonomis dan menjadi salah satu komoditas unggulan nasional. Udang vaname memiliki beberapa keunggulan jika dibandingkan dengan udang windu. Keunggulan tersebut diantaranya dapat dipelihara dengan kisaran salinitas yang lebar (0,5-45 ppt), dapat ditebar dengan kepadatan yang tinggi hingga lebih dari 150 ekor/m², lebih resisten terhadap kualitas lingkungan yang rendah serta waktu pemeliharaan lebih pendek yakni sekitar 90-100 hari per siklus (Hudi dan Shahab, 2005). Taksonomi udang putih (*Litopenaeus vannamei*) menurut Haliman dan Dian (2006) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Sub kingdom	: <i>Metazoa</i>
Filum	: <i>Arthropoda</i>
Subfilum	: <i>Crustacea</i>
Kelas	: <i>Malacostraca</i>
Subkelas	: <i>Eumalacostraca</i>
Superordo	: <i>Eucarida</i>
Ordo	: <i>Decapodas</i>
Subordo	: <i>Dendrobrachiata</i>
Familia	: <i>Penaeidae</i>
Sub genus	: <i>Litopenaeus</i>
Spesies	: <i>Litopenaeus vannamei</i>

Menurut Haliman dan Adijaya (2004) udang putih (*L. vannamei*) memiliki tubuh berbuku-buku serta memiliki aktivitas berganti kulit luar (eksoskeleton) secara periodik (*moulting*). Modifikasi sudah terjadi pada tubuh udang sehingga dapat digunakan untuk keperluan makan, bergerak, dan membenamkan diri kedalam lumpur (*burrowing*) serta memiliki organ sensor, seperti pada antenna dan antenula.

Kordi (2007) juga menjelaskan bahwa ada dua bagian pada kepala udang putih yaitu antena dan antenula. Kepala udang putih juga dilengkapi dengan 3 pasang *maxilliped* dan 5 pasang kaki berjalan (periopoda). *Maxilliped* mengalami modifikasi dan berfungsi sebagai organ untuk makan. Pada ujung peripoda beruas-ruas berbentuk capit (dactylus), dactylus ini ada pada kaki ke-1, ke-2, dan ke-3. Abdomen terdiri dari 6 ruas dan terdapat 5 pasang (pleopoda) kaki renang dan sepasang uropods (ekor) yang membentuk kipas bersama-sama telson (ekor) (Suyanto dan Mujiman, 2003).

Bentuk rostrum udang putih memanjang dan pangkalnya hampir berbentuk segitiga. Warna tubuhnya putih kekuningan terdapat bintik-bintik coklat dan hijau pada ekor. Udang betina dewasa tekstur punggungnya keras, ekor (telson) dan ekor kipas (uropoda) berwarna kebiru-biruan, sedangkan pada udang jantan dewasa memiliki plasma yang simetris. Spesies ini dapat tumbuh mencapai panjang tubuh 23 cm (Wyban dan Sweeney, 1991).



Gambar 2.1. Udang Putih (*L. vannamei*) (Haliman dan Dian, 2006).

Keterangan :

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1. <i>Cephalothorax</i> (bagian kepala) | 2. <i>Rostrum</i> (cucuk kepala) |
| 3. Mata | 4. <i>Antennula</i> (sungut kecil) |
| 5. <i>Prosartema</i> | 6. <i>Antenna</i> (sungut besar) |
| 7. <i>Maxilliped</i> (lat bantu rahang) | 8. <i>Periopod</i> (kaki jalan) |
| 9. <i>Pleopoda</i> (kaki renang) | 10. <i>Telson</i> (ujung ekor) |
| 11. <i>Uropoda</i> (ekor kipas) | |

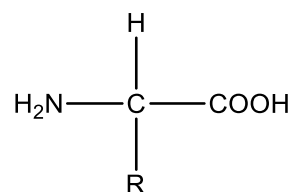
2.2. Protein

Protein berasal dari kata Yunani kuno *proteous*, artinya “yang utama”. Kesimpulan dari asal kata tersebut bahwa protein sangat penting bagi kehidupan. Sel hidup memiliki kandungan protein kira-kira 50% dari berat keringnya dan berfungsi sebagai pembangun struktur, biokatalis, hormon, sumber energi, penyangga racun, pengatur pH dan bahkan sebagai pembawa sifat keturunan dari generasi-generasi (Girindra, 1990).

Protein adalah polimer dari asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Molekul protein mengandung unsur-unsur C, H, O, N, P, S dan terkadang mengandung unsur logam seperti besi dan tembaga (Winarno, 1995). Rantai polipeptida sendiri merupakan polimer dari asam amino yang terikat satu sama lain oleh ikatan peptida (-CO-NH-). Setelah terikat dalam rantai polipeptida, asam amino tersebut dinamakan sebagai residu asam amino. Setiap rantai polipeptida selalu memiliki 2 ujung yang berbeda yaitu ujung karboksil (C-terminal) dan amina (N-terminal).

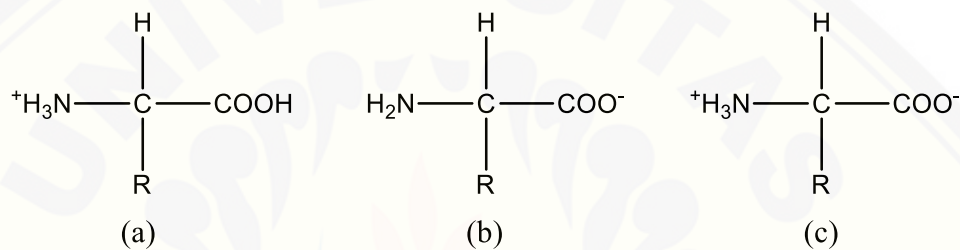
2.3.1. Struktur Protein

Protein tersusun atas unit-unit individual asam-asam amino. Setiap asam amino memiliki gugus amin (NH_2) pada salah satu dari atom karbon pusat dan sisi lainnya merupakan gugus asam (COOH). Di dalam makanan ada 20 jenis asam amino yang berbeda, masing-masing memiliki struktur dasar yang sama, yang membedakan hanyalah gugus R pada salah satu sisinya. Gugus R yang berbeda dapat bervariasi dari atom tunggal hidrogen hingga molekul kompleks yang membuat setiap asam amino unik (Forsythe, 1995). Struktur asam amino dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Struktur dasar asam amino (Forsythe, 1995).

Asam amino dalam larutan dapat menjadi ion amfoter (zwitter ion), yaitu suatu keadaan dimana asam amino dapat membentuk ion negatif dan positif bergantung pada pH larutan. Asam amino dalam larutan pada kondisi pH yang asam akan menyebabkan konsentrasi ion H^+ bertambah sehingga dapat berikatan dengan ion $-COO^-$ membentuk struktur seperti pada gambar 2.4(a). Kondisi yang basa akan menyebabkan konsentrasi OH^- bertambah sehingga dapat berikatan dengan ion H^+ pada gugus $-NH_3^+$ membentuk struktur seperti pada gambar 2.4(b) (Poedjiaji, 1994). Struktur asam amino dalam berbagai kondisi dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 2.3. Struktur asam amino (a) dalam asam, (b) dalam basa, (c) ion amfoter (Poedjiaji, 1994).

Asam-asam amino dalam molekul protein saling dirangkaikan melalui reaksi antara gugus karboksil asam amino yang satu dengan gugus amin dari asam amino yang lain, sehingga terbentuk ikatan yang disebut ikatan peptida. Ikatan peptida ini merupakan ikatan tingkat primer. Dua molekul asam amino yang saling diikatkan dengan cara demikian disebut ikatan peptida, apabila tiga molekul asam amino disebut ikatan tripeptida dan apabila banyak disebut polipeptida (Sediaoetama, 2008).

Asam amino merupakan senyawa penyusun protein, yang membentuk sel tubuh manusia dan hewan. Asam amino dibagi dalam dua kelompok utama, yaitu asam amino esensial dan nonesensial. Asam amino esensial tidak dapat diproduksi oleh tubuh sehingga harus disuplai lewat makanan, sedangkan asam amino nonesensial dapat diproduksi dalam tubuh. Berbagai jenis asam amino menyatu dalam ikatan peptida menghasilkan protein. Asam-asam amino esensial yang dibutuhkan tubuh manusia diantaranya histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, arginin, phenilalanin, treonin, triptofan, dan valin, sedangkan asam-asam amino

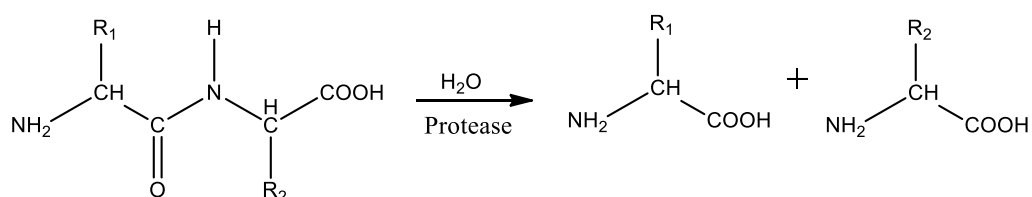
non esensial ialah alanin, asparagin, sistein, asam glutamat, glutamin, asam aspartat, glisin, hidroksiprolin, dan tirosin (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Asam amino yang umumnya terdapat pada udang adalah asam glutamat, asam aspartat, arginin, lisin, leusin, glisin dan alanin. Kandungan asam amino pada udang berbeda tiap musim. Dalam artian bahwa musim turut mempengaruhi akumulasi kadar asam amino dalam tubuh udang (Yanar et al., 2006).

2.3.2. Protein Udang

Protein udang sama halnya dengan protein ikan dimana protein udang merupakan protein hewani berkualitas tinggi. Hal ini disebabkan karena udang memiliki komposisi asam amino yang lengkap dan kandungan nutrisi yang mudah dicerna. Sifat protein udang dipengaruhi oleh kondisi dagingnya yang memiliki karakter lembut, memiliki sedikit jaringan penghubung dan sensitif terhadap panas (Kristinsson dan Rasco, 2000). Menurut Gunalan *et al* (2013) udang putih mentah memiliki kandungan protein sebesar 35,69%.

2.3.3. Hidrolisis Protein

Hidrolisis protein merupakan suatu proses terputus atau pecahnya ikatan peptida menjadi molekul yang lebih pendek atau sederhana (Van Der Den, 2002). Dalam proses hidrolisis, protein akan terpecah secara bertahap menghasilkan molekul peptida sederhana dan asam-asam amino. Hidrolisis protein secara sempurna akan menghasilkan asam amino α dengan konfigurasi L dari rantai awalnya dan berbeda satu sama lain (Nielsen, 1997). Reaksi hidrolisis protein menggunakan protease dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 2.4. Reaksi Hidrolisis Menggunakan Protease (Nielsen, 1997).

Hidrolisis protein dibagi menjadi dua macam, diantaranya :

a. Hidrolisis Non Enzimatis (Asam/Basa)

Hidrolisis secara kimia (non enzimatis) ini ada dua yaitu hidrolisis asam dan hidrolisis basa. Hidrolisis asam protein lebih sering digunakan daripada hidrolisis dalam kondisi basa. Proses dari hidrolisis ini sulit dikendalikan namun metode ini tetap yang disukai untuk hidrolisis protein nabati. Protein nabati terhidrolisis banyak digunakan untuk penyedap rasa (Blenford, 1994). Aplikasi protein nabati terhidrolisis terutama sebagai zat penyedap dalam daging olahan, biskuit, dan campuran sup (Thakar *et al.*, 1991). Hidrolisis asam ini dilakukan dengan menggunakan asam anorganik kuat seperti HCl dan H₂SO₄, namun hidrolisis menggunakan asam ini memiliki kelemahan yaitu produk yang dihasilkan menjadi sangat asam sehingga perlu dinetralkan dengan alkali hingga pH 7. Kelemahan yang lain adalah hidrolisat protein yang dihasilkan mengandung sejumlah garam dan terdapat kehilangan beberapa asam-asam amino (Johnson dan Peterson, 1974). Asam amino yang dapat rusak selama proses hidrolisis diantaranya triptofan, serin dan treonin (Sumardji, 2009).

Penggunaan basa terutama natrium hidroksida untuk menghidrolisis protein ini tidak cukup baik karena dapat mempengaruhi nilai nutrisi hidrolisat. Selain itu hasil hidrolisatnya memiliki sifat fungsional dan kelarutan yang rendah. Kelarutan hidrolisat yang rendah ini berkaitan dengan hasil hidrolisis yang berupa molekul polipeptida yang cukup besar. Beberapa asam amino seperti sistein, serin dan treonin dapat hilang selama proses hidrolisis (Kristinnson and Rasco, 2000).

b. Hidrolisis Enzimatis

Enzim merupakan salah satu bentuk protein yang berfungsi sebagai katalis biologis. Aktivitas enzim yang dilakukan dalam proses katalisis adalah dengan cara menurunkan energi aktivasi reaksi secara selektif (Winarno, 1983). Pengubahan energi aktivasi dilakukan dengan cara menurunkan hambatan energi (energy barrier) sehingga reaksi dapat berjalan dengan lebih cepat (Rehm dan Reed, 1995). Perubahan tersebut difasilitasi oleh enzim melalui pembentukan keadaan transisi yang melibatkan distribusi muatan antara enzim dengan substrat ketika terbentuk ikatan kompleks enzim-substrat. Dengan adanya

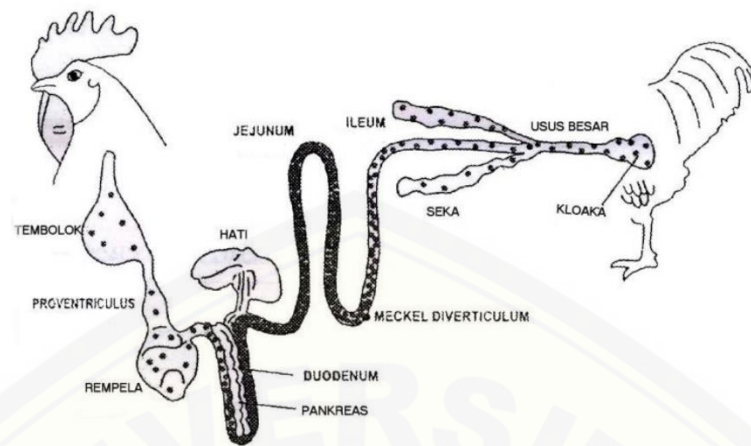
enzim maka dapat terjadi perubahan energi reaktan menjadi bentuk energi lain secara efisien (Dewi, 2002).

Hidrolisis secara enzimatik ini dilakukan dengan mengkondisikan pH dan suhu dari enzim. Metode ini secara teoritis merupakan metode yang efisien karena hidrolisis menggunakan enzim menghasilkan peptida-peptida yang mudah dipecah (Johnson dan Peterson, 1974). Keuntungan yang lain dari hidrolisis menggunakan enzim ini adalah peptida dengan rantai pendek dan asam amino bebas yang dihasilkan lebih bervariasi dan tingkat kehilangan asam amino esensial rendah (Giyatmi, 2001).

2.3. Enzim Protease Usus Ayam

Enzim protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein (Ward *et al.*, 2009). Protease merupakan enzim hidrolase yang berperan dalam reaksi pemecahan ikatan peptida pada molekul protein, menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, melalui reaksi hidrolisis pada ikatan peptide. Enzim ini mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat (Rao dkk., 1998).

Ayam broiler umumnya dijual berupa daging karena lebih mudah dalam pengolahannya. Proses penyembelihan ayam broiler ini menghasilkan limbah berupa cair dan padat. Limbah cair yang dihasilkan dari penyembelihan ayam broiler ini adalah darah ayam, air bekas cucian ayam dan lemak sedangkan limbah padat berupa bulu ayam dan usus (Erlita, 2011). Pencernaan ayam broiler dimulai dari paruh, kerongkongan, tembolok, proventrikulus, gizzard, usus halus yang terdiri dari duodenum, jejunum dan ileum, seka, usus besar, dan yang terakhir kloaka. Pencernaan tambahan pada ayam salah satunya adalah hati (Suprijatna *et al.*, 2008). Secara umum sistem pencernaan dari ayam dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 2.5. Sistem Pencernaan Ayam Secara Umum (Gauthier, 2002).

Aktivitas enzim merupakan banyaknya mol substrat yang diubah oleh enzim per satuan waktu (Holme dan Peck, 1998). Konsentrasi enzim dalam suatu medium dapat digambarkan dengan aktivitas enzim. Beberapa aktivitas yang berkaitan dengan enzim diantaranya : unit aktivitas enzim aktivitas spesifik dan angka pergantian (*turnover number*). Menurut perjanjian internasional, satu unit aktivitas enzim merupakan jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 μmol (10^{-6} mol) substrat per menit pada suhu 25 °C dalam kondisi optimumnya. Aktivitas spesifik adalah jumlah unit aktivitas enzim per miligram protein. Sedangkan angka pergantian (*turnover number*) adalah angka yang menunjukkan jumlah molekul substrat yang diubah menjadi produk per satuan waktu oleh satu molekul enzim (Wirahadikusumah, 1989). Jamdar dan Harikumar (2005) menunjukkan macam-macam protease dalam usus ayam. Berikut ini merupakan jenis enzim protease beserta aktivitasnya.

Tabel 2.1 Jenis enzim protease usus ayam beserta aktivitas spesifiknya.

Enzim	Aktivitas spesifik (nmol/mg protein/h)			
	Hati	Limfa	Otot Rangka	Usus
Cathepsin B	31,5 ± 0,30	22,1 ± 0,37	1,9 ± 0,11	69,5 ± 0,78 (48%)
Cathepsin D	2230 ± 60,00	2260 ± 24,00	73 ± 2,00	4700 ± 37,00 (53%)
Cathepsin H	110 ± 3,90	93,2 ± 1,23	17,2 ± 0,54	310 ± 4,68 (39%)
Cathepsin L	631,5 ± 30,25	412,0 ± 35,00	83,6 ± 14,50	843,9 ± 61,00 (27%)

Sumber : Jamdar dan Harikumar, 2005

2.4. Nitrogen Terlarut

Nitrogen merupakan bahan dasar penyusun protein yang diserap oleh tumbuhan air dalam bentuk amonia atau nitrat. Ketersediaan nitrogen mempengaruhi variasi spesies, kelimpahan serta kandungan nutrisi hewan dan tumbuhan akuatik (Horne dan Goldman, 1994).

Nitrogen terlarut adalah hasil pemecahan protein menjadi bentuk sederhana seperti peptida dan oligopeptida hingga terbentuk asam-asam amino bebas yang terlarut dalam air, sedangkan protein terlarut adalah konsentrasi nitrogen protein yang larut dalam air dan tidak mengendap apabila dikenai gaya sentrifugal sedang yaitu 3000–5000 g (Binsan et al., 2008).

2.5. Analisis Protein

Analisis protein dilakukan umumnya untuk mengukur kadar protein dalam suatu bahan makanan. Berbagai metode yang digunakan untuk menganalisa kandungan protein, diantaranya yaitu Kjeldahl, Bradford, Biuret dan Lowry. Dari keempat metode tersebut, Bradford merupakan metode yang paling cepat dan banyak digunakan (Sudarmadji, 1989).

Analisis protein dapat dilakukan secara langsung melalui penggunaan bahan kimia yang spesifik terhadap protein dan metode pengikatan warna. Contoh pereaksi yang spesifik terhadap protein adalah pereaksi Lowry, Biuret, dan bradford. Prinsip metode pengikatan warna yaitu penentuan konsentrasi protein berdasarkan kompleks warna yang terbentuk. Analisis protein juga dapat dilakukan dengan cara tidak langsung yaitu melalui metode perhitungan jumlah nitrogen terkandung dalam sampel. Contohnya seperti metode formol, kjehdal, dan dumas. Jumlah N yang dihitung sebanding dengan kadar protein dalam sampel (Rhee, 2005).

2.4.1. Titrasi Formol

Titrasi formol digunakan untuk mengukur laju hidrolisis protein oleh enzim. Prinsip dari metode ini adalah penetralan larutan protein dengan basa berupa NaOH. Proses selanjutnya adalah ditambahkan formaldehida sehingga terbentuk gugus methilol akibat formaldehida telah memblokir gugus-gugus asam amino hasil hidrolisis. Adanya gugus dimethylol membuat reaksi antara NaOH dengan gugus asam dari asam amino tidak terganggu, sehingga konsentrasi protein dapat ditentukan. Titrasi formol kurang tepat untuk menentukan kadar protein dan lebih tepat digunakan untuk menunjukkan proses hidrolisis protein (Estiasih, 2012). Kadar protein yang diukur menggunakan metode titrasi formol dapat dihitung menggunakan persamaan berikut ini.

$$\%N = \frac{V_2 - V_1}{\text{berat sampel}} \times N \text{ NaOH} \times 14,008 \times 100 \% \quad (2.1)$$

Keterangan :

%N	=	Persentase Nitrogen
V_2N_2	=	Volume titrasi sampel
V_1N_1	=	Volume titrasi blanko
N NaOH	=	Normalitas NaOH

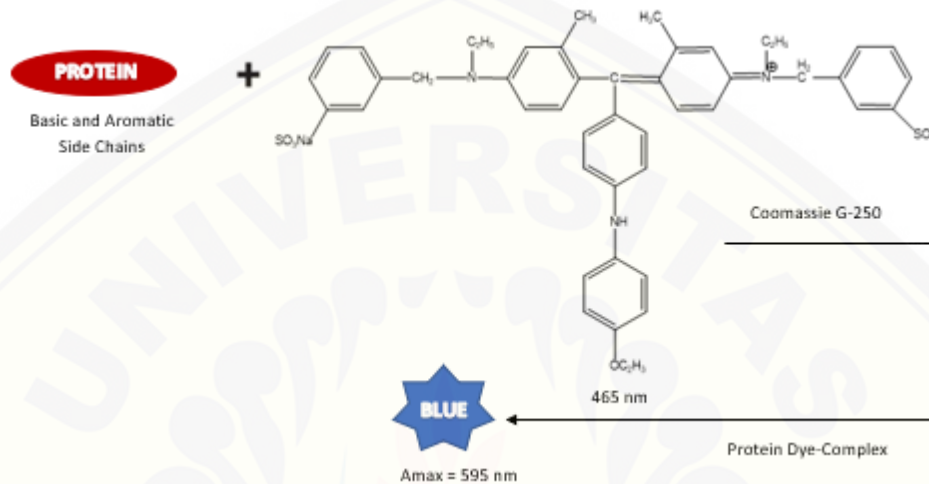
(Sudarmadji *et al.*, 1997).

2.4.2. Metode Bradford

Metode Bradford adalah suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total secara kolorimetri dalam larutan menggunakan pewarna *Coomassie Brilliant Blue G250* (CBBG) (Carprette, 2005). Reagen CBBG bebas berwarna merah kecoklatan (λ_{maks} 465 nm), sedangkan dalam suasana basa reagen CBBG akan berbentuk anion yang akan mengikat protein membentuk warna biru (λ_{maks} 595 nm). Jumlah CBBG yang terikat pada protein proporsional dengan muatan positif yang ditemukan pada protein (Stoscheck 1990).

Berat molekul peptida atau protein harus lebih dari 3000 Da untuk menghasilkan warna biru dengan reagen Bradford ini. Asam amino bebas, peptida dan protein yang memiliki berat molekul kecil tidak akan menghasilkan warna

biru ketika beraksi dengan reagen ini. Jumlah absorbansi sebanding dengan kadar protein dalam larutan, hal ini disebabkan karena banyaknya ligan yang berikatan dengan molekul protein sebanding dengan muatan positif protein (Pierce, 2005). Gambar 2.6 Menunjukkan reaksi yang terjadi antara protein dengan reagen *Coomassie Brilliant Blue G250 (CBBG)*.



Gambar 2.6. Reaksi pada Metode Bradford (Carprette, 2005).

2.4.3. Spektrofotometri *Visible*

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur trasmittansi atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Panjang gelombang UV atau *visible* bergantung pada mudahnya promosi elektron-elektron. Molekul yang memerlukan energi yang besar untuk promosi maka akan menyerap panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi lebih sedikit untuk promosi akan menyerap cahaya dalam daerah sinar tampak karena elektronnya lebih mudah untuk dipromosikan daripada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang UV (Khopkar, 2003).

Prinsip dasar dari analisis spektrofotometri sinar tampak (*visible*) didasarkan pada penyerapan sinar tampak oleh suatu larutan berwarna. Metode ini disebut juga metode kolorimetri karena hanya dapat mengukur larutan berwarna. Larutan yang tidak berwarna dapat diukur dengan metode ini apabila direaksikan terlebih dahulu menggunakan pereaksi berwarna (Hendayana, 1994). Panjang gelombang dari berbagai cahaya pada daerah *visible* dapat dilihat pada gambar berikut ini.

Tabel 2.2 Panjang Gelombang Berbagai Warna Cahaya pada Daerah *Visible*

λ (nm)	Warna yang teradsorbsi	Warna tertransmisi (komplementer)
400-435	Violet	Hijau – Kuning
435-480	Biru	Kuning
480-490	Biru – Hijau	Oranye
490-500	Hijau – Biru	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning – Hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Oranye	Hijau – Biru
610-750	Merah	Biru – Hijau

Sumber: Day dan Underwood, 2002

Apabila dua buah atom saling berikatan dan membentuk molekul maka akan terjadi tumpang tindih dua orbital dari kedua atom yang masing-masing mengandung satu elektron dan kemudian terbentuk orbital molekul (Gandjar, 1991). Hukum kuantitatif yang terkait dikenal dengan hukum Lambert-Beer. Menurut hukum Lambert-Beer :

$$T = I_t/I_o = 10^{-\epsilon c \cdot b} \quad (2.2)$$

$$A = \text{Log } 1/T = \epsilon c \cdot b \quad (2.3)$$

Keterangan :

T = Transmittan

I_o = Intensitas sinar yang datang

I_t = Intensitas sinar yang diteruskan

ϵ = Absorpsivitas Molar ($\text{Lt. Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

c = Konsentrasi (mol. Lt^{-1})

b = Tebal Larutan (cm)

A = Absorban

(Mulja dan Suharman, 1995).

Absorpsivitas molar (ϵ) merupakan suatu konstanta yang memiliki nilai spesifik untuk jenis zat dan panjang gelombang tertentu. Sedangkan tebal media (sel) dalam prakteknya tetap. Absorbansi suatu spesies yang terukur dapat ditentukan konsentrasinya dengan membandingkannya dengan konsentrasi larutan standar.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada bulan April - November 2018.

3.2. Alat dan bahan

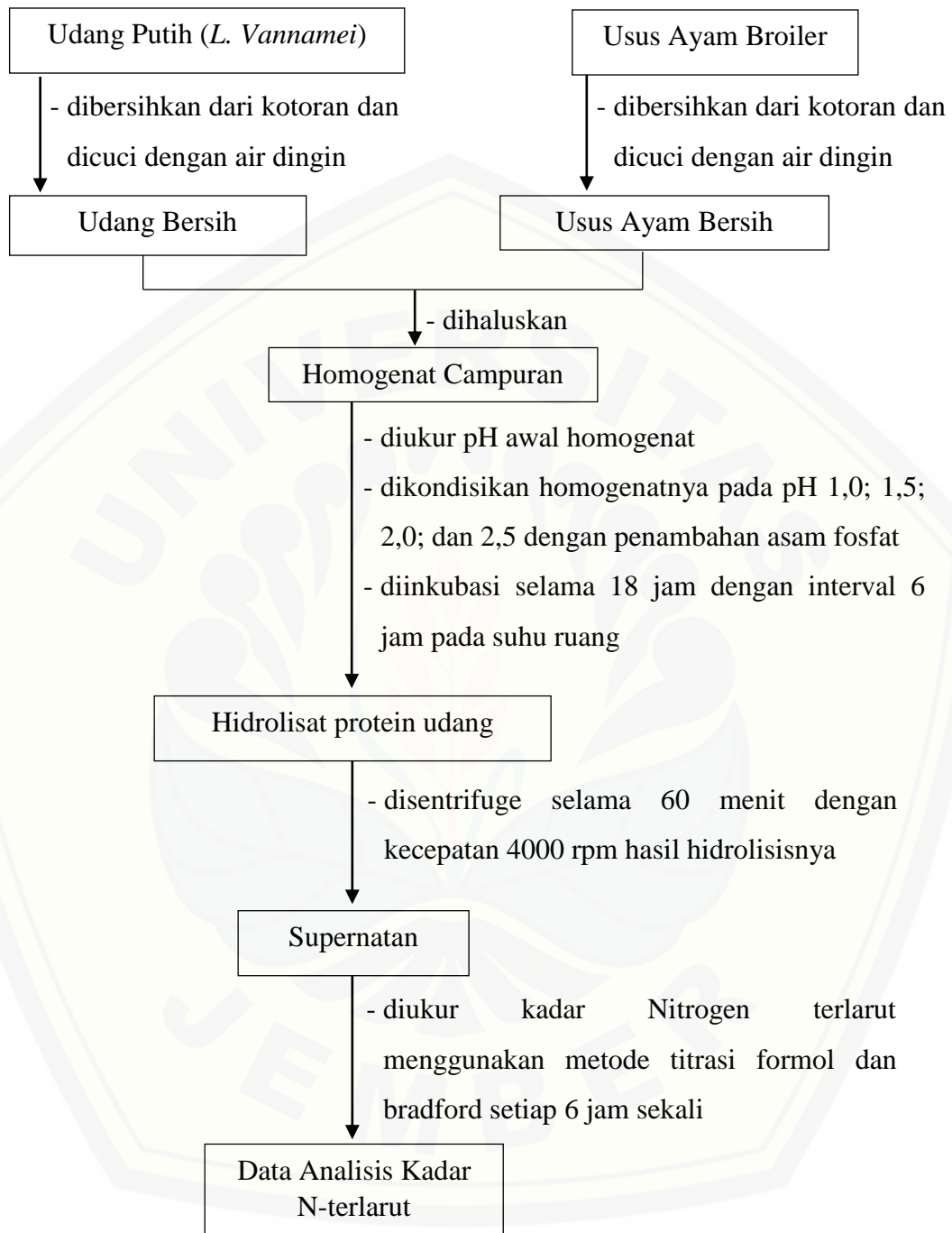
3.2.1. Alat

Blender, kaca arloji, gelas ukur 50 mL dan 10 mL, gelas beaker 150 mL dan 100 mL, Erlenmeyer 250 mL dan 100 mL, labu ukur 100 mL dan 250 mL, pipet mohr 10 mL, biuret 50 mL dan statif, pipet tetes, botol semprot, batang pengaduk, pH meter, neraca digital analitik, pisau, loyang, stopwatch, *ice box*, lemari pendingin, kain kasa, spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2. Bahan

Usus ayam broiler, Udang putih, Asam fosfat *food grade*, Akuades, Natrium oksalat, K-phtalat Merck, Asam Fosfat 85% Merck, Etanol 95% Merck, fenoltalein 1%, NaOH *Pa*, formaldehida 40%, aluminium foil, pereaksi Comassive Brilliant Blue (CBB), Bovine Serum Albumin (BSA).

3.3. Diagram Alir Penelitian



3.4. Prosedur Kerja

3.4.1. Preparasi Sampel Udang

Udang putih yang dibeli di tambak “Alam Citra Sarana Intam” dikondisikan pada kondisi dingin dengan cara diletakkan pada *ice box*, lalu diukur massa udang putih kotor tersebut. Udang putih utuh selanjutnya dibersihkan dengan cara menghilangkan kotoran kemudian dicuci bersih menggunakan air dingin yang mengalir sehingga diperoleh udang putih bersih. Udang putih yang telah bersih kemudian ditimbang sebanyak 250 gram dan diblender hingga menjadi bubur.

3.4.2. Preparasi Sampel Usus Ayam

Usus ayam broiler yang dibeli di tempat pemotongan ayam di Kelurahan Tegal Besar Jember dan dikondisikan pada kondisi dingin dengan cara diletakkan pada *ice box*, lalu diukur massa usus ayam kotor tersebut. Usus ayam broiler kotor selanjutnya dibersihkan dari kotoran kemudian dicuci bersih menggunakan air dingin yang mengalir sehingga diperoleh usus ayam broiler bersih. Usus ayam broiler yang telah bersih kemudian ditimbang sebanyak 250 gram dan diblender hingga menjadi bubur.

3.4.3. Preparasi Sampel Homogenat

a. Sampel Kontrol

Udang putih yang telah menjadi bubur kemudian diambil sebanyak 250 gram, selanjutnya diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 1000 mL. Homogenat tersebut kemudian dibagi ke dalam 4 *chamber* inkubasi diantaranya, pH 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 dengan masing-masing volume sebanyak 250 mL. Diukur massa homogenat dalam masing-masing *chamber* dan diukur pH awal homogenat tersebut.

b. Sampel pH Asam

Udang putih dan usus ayam broiler yang telah menjadi bubur kemudian diambil masing-masing 250 gram sehingga didapatkan massa total 500 gram. Bubur tersebut kemudian diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 1000 mL. Homogenat yang dihasilkan kemudian dibagi kedalam 4 *chamber* inkubasi diantaranya, pH 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 dengan masing-masing volume sebanyak 250 mL. Diukur massa homogenat dalam masing-masing *chamber* dan diukur pH awal homogenat tersebut.

3.4.4. Hidrolisis Udang pada Berbagai Kondisi pH Asam dan Variasi Waktu Inkubasi

a. Sampel Kontrol

Homogenat udang putih pada 4 *chamber* terlebih dahulu diukur pH awal kemudian ditambahkan asam fosfat untuk mengkondisikan pada pH 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5. Homogenat yang telah dikondisikan pH kemudian diambil tiga sampel dengan masing-masing volume 5 mL sebagai sampel waktu inkubasi 0 jam, selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 60 menit untuk diambil supernatan. Hal yang sama dilakukan untuk semua pH dan dilakukan setiap 6 jam sekali. Hasil supernatan yang didapat kemudian diukur kadar nitrogen terlarut menggunakan metode titrasi formol dan metode Bradford.

b. Sampel pH Asam

Homogenat udang putih dan usus ayam broiler pada 4 *chamber* terlebih dahulu diukur pH awal kemudian ditambahkan asam fosfat untuk mengkondisikan pada pH 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5. Homogenat yang telah dikondisikan pH kemudian diambil tiga sampel dengan masing-masing volume 5 mL sebagai sampel waktu inkubasi 0 jam, selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 60 menit untuk diambil supernatan. Hal yang sama dilakukan untuk semua pH dan dilakukan setiap 6 jam sekali. Hasil supernatan yang didapat kemudian diukur kadar nitrogen terlarut menggunakan metode titrasi formol dan metode Bradford.

3.4.5. Penentuan Kadar Nitrogen Terlarut Udang pada Berbagai Kondisi pH dan Waktu Inkubasi Menggunakan Metode Titrasi Formol (Sudarmadji, 1997).

a. Menyiapkan larutan blanko

Sebanyak 10 mL akuades ditambahkan 0,2 mL Na-oksalat 1:3 (b/v), 3 tetes indikator phenolphthalien 1%, dan 2 mL formaldehida 40%, kemudian dititrasi dengan NaOH 0,01 N hingga berubah warna menjadi merah jambu.

b. Menyiapkan larutan sampel

Sebanyak 0,1 mL sampel (hasil hidrolisis udang) kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer, dan ditambahkan 10 mL akuades, 0,2 mL larutan Na-oksalat, 3 tetes indikator phenolphthalien 1%, kemudian dititrasi dengan NaOH 0,01 N hingga berubah warna menjadi merah jambu, titrasi dihentikan sebentar dan dilanjutkan dengan penambahan 2 mL formaldehida 40% kemudian dititrasi kembali dengan NaOH 0,01 N hingga warna larutan berubah menjadi merah jambu yang konstan.

3.4.6. Metode Penentuan Kadar N-terlarut Menggunakan Titrasi Formol

$$\%N = \frac{V_2.N_2 - V_1.N_1}{\text{berat sampel}} \times N \text{ NaOH} \times 14,008 \times 100 \% \dots\dots\dots (3.1)$$

Keterangan :

%N	=	Persentase Nitrogen
V_2N_2	=	Volume titrasi sampel
V_1N_1	=	Volume titrasi blanko
N NaOH	=	Normalitas NaOH

3.4.7. Penentuan Kadar Protein Terlarut Udang pada Berbagai Kondisi pH dan Waktu Inkubasi Menggunakan Metode Bradford

a. Menyiapkan larutan induk Bradford (Purwanto, 2014)

Sebanyak 10 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB) dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dalam campuran (5 mL etanol 95% dan 10 mL asam fosfat 85%) kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas. Larutan yang sudah dibuat kemudian dikocok agar homogen.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan induk 1000 ppm dibuat dari 0,1 gram BSA dan ditambahkan 100 mL akuades. Larutan standart 0,5 mg/mL di scanning pada panjang gelombang 525 – 625 nm. Setelah proses scanning ini maka akan didapatkan panjang gelombang maksimum yang akan digunakan untuk pengukuran kadar sampel.

c. Kurva Kalibrasi Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Bollag *et al.*, 1996)

Larutan BSA dibuat dari 0,1 gram BSA dan ditambahkan 100 mL akuades sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk 1000 ppm. Larutan induk kemudian diencerkan pada beberapa konsentrasi yang berbeda yaitu 0,1 mg/mL - 1,0 mg/mL dengan interval 0,1 mg/mL. Sebanyak 0,1 mL dari masing-masing konsentrasi ditambahkan dengan 3 mL reagen Bradford dalam kuvet lalu dihomogenkan. Campuran didiamkan selama 10 menit dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang hasil scanning untuk dibuat grafik *linier* antara konsentrasi BSA (sumbu x) dengan absorbansi (sumbu y).

d. Penentuan Kadar Protein Menggunakan Metode Bradford

Larutan sampel sebanyak 0,1 mL diencerkan ke dalam labu ukur 10 mL, dilanjutkan dengan mengambil sampel yang telah diencerkan sebanyak 0,1 mL kemudian ditambahkan 3 mL reagen Bradford, dikocok hingga homogen dan selanjutnya diinkubasi selama 10 menit. Ukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang hasil scanning. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam kurva standar BSA untuk menentukan konsentrasi protein yang terkandung dalam sampel enzim (Bradford, 1976). Pengukuran kadar protein dilakukan dengan perhitungan menggunakan persamaan *linier* ($y = mx + C$).

DAFTAR PUSTAKA

- Aulia, E., A. Sjaifullah, dan Wuri Handayani. (2017). *Dissolved Nitrogen And Protein Content From The Autolytic Degradation Of Chicken Intestine Proteases. Jurnal ILMU DASAR*, 5.
- Barret, J. A., H, Kirschke. (1981). Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. *Method in Enzimology*. 80 : 535-561.
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Faithong, N., Tanaka, M., and Kishimura, H. (2008). *Composition, Antioxidative and Oxidative Stability of Mungoong, a Shrimp Extract Paste, from the Cephalothorax of White Shrimp. Journal of Food Lipids*, 15(1): 97–118.
- Blenford, D. E. (1994). *Protein hydrolysates: Functionalities and uses in nutritional products. International Food Ingredients*, 45(3).
- Bollag, D. M., Rozicky, M. D., dan Edelsein. S. J. (1996). *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 28(1): 140–140.
- Bradford, M. M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, 7.
- Carpette. (2005). *An Introduction to Practical Biochemistry*, 100-101, Mc Graw HillBook Company, Great Britany.
- Clemente, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Pedroche, J., and Millán, F. (1999). *Production of Extensive Chickpea (Cicer arietinum L.) Protein Hydrolysates with Reduced Antigenic Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3776–3781.
- Conner, G.E., (1998). Cathepsin D. In: Barret, A., J., Rawling, N., Woessner, J.F., (Eds). *Handbook of Proteolytic enzymes*. New York: Academic Press.

- Cordle, C.T. (1994). *Control of Food Allergies Using Protein Hydrolysates*. *Food Technol.* 48(10): 72-76.
- Day, R. A. dan A. L. Underwood. (2002). *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga.
- Dewi GC. (2002). *Studi Penggunaan Enzim Papain pada Produksi Hidrolisat Protein Ikan*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Eakpetch, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., dan Kijroongrojana, K. (2008). *Autolysis of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Meat: Characterization and the Effects of Protein Additives*. *Journal of Food Science*, 73(2), S95–S103.
- Erlita, D. C. (2011). *Pengolahan Limbah Pemotongan Ayam dan Dampaknya Terhadap Masyarakat Sekitar*. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Estiasih, T., Wijayanti, N., Purwantiningrum, I., Becti, W., Nurcholis, M., Heppy, F., Maligan, J.M., dan Sarita, I. 2012. *Modul Praktikum Biokimia dan Analisis Pangan*. Malang: Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.
- Fessenden, R.J, dan Fessenden, J.S. (1994). *Kimia Organik Jilid I, edisi ketiga*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Forsythe, W.A. (1995). *Nutrition and You with Readings*. USA: Contemporary Publishing Company of Raleigh, Inc. 101-102.
- Gandjar, I. G. (1991). *Kimia Analisis Instrumental*. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada.
- Gauthier R. (2002). *Intestinal health, the key to productivity (The case of organic acid)*. Puerto Vallarta (CA): Jefe Nutrition.
- Girindra, Aisjah. (1990). *Biokimia 1*. Cetakan ke-2. Jakarta: PT Gramedia.

- Giyatmi. (2001). *Prospek Hidrolisat Protein Ikan Seabgai Pemer kaya Nutrisi Makanan*. Bogor : IPB.
- Hadiwiyoto. (1993). *Teknologi Hasil Perikanan*. Jilid 1. Yogyakarta: Liberty
- Haliman R. W dan D. S. Adijaya. (2004). *Udang Vannamei*. Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
- Haliman. R.W dan Dian A.S. (2006). *Budidaya Udang Vanamei*. Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
- Hayati, E.K. (2007). *Buku Ajar Dasar-dasar Analisis Spektroskopi*. Malang : KJM UIN Malang.
- Hendayana, S. (1994). *Kimia Analisis Instrumen*. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Holme, D.J. dan Hazel Peck. (1998). *Analytical Biochemistry, 3rd edition*. Pearson Education : England.
- Horne, A.J., dan Goldman, C.R. (1994). *Limnology*. Second Edition. McGraw-Hill Inc. New York.
- Hudi, L., dan A. Shahab. 2005. *Optimasi produktivitas budidaya udang vaname (Litopenaeus vanamei) dengan menggunakan metode respon surface dan non linear programming*. Prosiding Seminar Nasional manajemen Teknologi II. 28.1-28.9.
- Iodice, A.A., V, Leong., dan I, M, Weinstock. (1966). *Separation of Cathepsin A and D of Skeletal Muscle*. New York : Institute of Muscle Disease.
- Jamdar, S. N., dan Harikumar, P. (2005). *Autolytic degradation of chicken intestinal proteins*. *Bioresource Technology*, 96(11): 1276–1284.

Johnson A H, Peterson M S. (1974). *Encyclopedia of Food Technology*. Volume II. Westport: The AVI Publ.Co.Inc.

Katili, A. S. (2009). *Struktur Dan Fungsi Protein Kolagen*. Ilmu Pelangi 2(5).

Kementerian Kelautan Perikanan (KKP). (2016). *Data Ekspor Udang 5 Tahun Terakhir*. <http://kkp.go.id/index.php>. Diakses pada tanggal 11 Desember 2017.

Khee, C. R. (2001). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Son 5, Inc.

Khopkar. (2003). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.

Kordi, K. M. Ghufuran. (2007). *Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan*. Jakarta: PT Rineka Cipta.

Kristinsson, H. G., dan Rasco, B. A. (2000). *Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1): 43–81.

Lehninger , Albert. (1982). *Dasar Dasar Biokimia*. Jakarta : Penerbit Erlangga.

Lehninger, Albert L. (1993). *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid I. Jakarta: Erlangga.

Mulja dan Suharman. (1995). *Analisis Instrumental*. Surabaya: Universitas Airlangga.

Nielsen. (1997). *Food Protein And Their Application*. New York: Marcel Dekker Inc. University of Madison.

Nielsen, J. E., *et al.* (1999). Electrostatics in the active site of an α -amylase. *Eur. J. Biochem.* 246: 816-824.

- Ockerman, H.W. dan C.L. Hansen. (2000). *Animal By-Product Processing and Utilization*. CRC Press. Washington.
- Pellet, P.L dan V.R Young. (1980). *Nutritional Evaluation of Protein Food*. The United Nations University, Tokyo.
- Pierce. (2005). Protein Assay Technical Handbook. www.piercenet.com/path95n. Diakses tanggal 28 Desember 2017.
- Prasetyo, M, N., Sari, N., dan Budiyati, S. (2012). *Pembuatan Kecap dari Ikan Gabus Secara Hidrolisis Enzimatis menggunakan Sari Nanas*. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 1(1)
- Purwanto, M, G, M. (2014). *Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible*. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 7(2).
- Poedjiadi, A. (1994). *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta : UI-Press.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, T. (2006). *Dasar-Dasar Biokimia Edisi Revisi*. Jakarta : UI-Press.
- Raju, A. A., Rose, C., dan Muralidhara Rao, N. (1997). *Enzymatic hydrolysis of tannery fleshings using chicken intestine proteases*. *Animal Feed Science and Technology*, 66(1-4): 139-147.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., dan Deshpande, V. V. (1998). *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.*, 62, 39.
- Rehm, H.J dan G. Reed.(1995). *Biotechnology Volume 9 Enzymes, biomass, food and feed*. VCH. New York.
- Rhee, K.C. (2005). *Determination of Total Nitrogen*. Dalam *Buku Handbook of Food Analytical Chemistry*. Editor: Ronald E. Wrolstad. New Jersey: John Wiley and Sons Inc.

- Rohman, A, dan Gandjar I. G. (2010). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Belajar.
- Sediaoetama AD. (2008). *Ilmu Gizi untuk Mahasiswa dan Profesi di Indonesia. Jilid I*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Shurtleff, W., dan A. Aoyagi. (1979). *The Book of Tempeh*. Herper & Row, Publisher. New York.
- Skanderby, M. (1994). *Protein hydrolysates: their functionality and applications*, Food Technol. Int.Eur. 10:141.
- Stoscheck, C. M. (1990). *Quantitation of protein*. In *Methods in Enzymology* (Vol. 182, pp. 50–68). Elsevier.
- Sudarmadji, S. (1989). *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sudarmadji S, B. Haryono, Suhardi. (1997). *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian, edisi ke-4*. Yogyakarta: Liberty.
- Sumardjo, D. (2009). *Pengantar Kimia*. Jakarta: EGC.
- Suprijatna, E.,U. Atmomarsono, and R. Kartasudjana. (2008). *Ilmu Dasar Ternak Unggas. Cetakan ke-2*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Suyanto Rachmatun S. Dra dan Mujiman Ahmad. (2003). *Budidaya Udang Windu*. Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
- Thakar, P. N., Patel, J. R., dan Joshi, N. S. (1991). *Protein hydrolysates: a review*, *Indian J. Dairy Sci.*, 44(9), 557.

Van der Ven, C. (2002). *Biochemical and Functional Characterisation of Casein and Whey Protein Hydrolysates*.

Ward OP, Rao MB, Kulkarni A (2009) *Proteases, Production*. In: *Schaechter M (ed) Encyclopedia of microbiology*. Elsevier, USA, pp 495–511

Winarno, F.G. (1995). *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

Winarno. (1983). *Buku Seri Teknologi Pangan*. Direktorat Pengembangan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Institut Pertanian Bogor.

Wirahadikusumah, M. (1989). *Biokimia (Protein, Enzim, Asam Nukleat)*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

Wyban, J.A. dan Sweeney, J. N. (1991). *Intensive Shrimp Production Technology*. USA: The Oceanic Institute. Hawaii.

Yanar, Y., dan Çelik, M. (2006). *Seasonal amino acid profiles and mineral contents of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844) and speckled shrimp (*Metapenaeus monoceros* Fabricus, 1789) from the Eastern Mediterranean*. *Food Chemistry*, 94(1), 33–36.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Preparasi Larutan

1.1 Pembuatan Larutan NaOH

Mr NaOH = 40,00 g/mol

a. Larutan NaOH 0,1 N sebanyak 500 mL

N = Molaritas NaOH . a

$$Massa NaOH = 1 \text{ mol/N} \cdot \frac{40,00 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,1 \text{ N} \cdot 1000 \text{ mL}}{500 \text{ mL}} = 2,0 \text{ gram}$$

Jadi, padatan NaOH yang dibutuhkan sebanyak 2,0 gram dan kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volume 500 mL.

b. Larutan NaOH 0,01 N sebanyak 1000 mL

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$V1 = \frac{N2 \cdot V2}{N1}$$

$$V1 = \frac{0,01 \text{ N} \cdot 1000 \text{ mL}}{0,1 \text{ N}} = 100 \text{ mL}$$

Jadi, larutan NaOH 0,1 N sebanyak 100 mL dilarutkan dengan akuades hingga volume 1000 mL.

1.2 Standarisasi Larutan NaOH

a. Standarisasi Larutan 0,1 N NaOH

Tabel 1.1 Hasil Standarisasi 0,1 N NaOH

	Massa K-phtalat	Volume Titran (NaOH)
U1	0,5011	24,6
U2	0,5015	24,6
U3	0,5008	24,7
U	0,5011	24,6

$$N \text{ NaOH} = \frac{0,5011 \text{ gram}}{204,2 \text{ g/mol} \cdot \frac{24,6}{1000} \text{ ml}} \cdot 1 \text{ mol/N} = 0,0996 \text{ N}$$

b. Standarisasi Larutan 0,01 N NaOH

Tabel 1.2 Hasil Standarisasi 0,01 N NaOH

	Massa K-phtalat	Volume Titran (NaOH)
U1	0,0515	25,6
U2	0,0511	25,8
U3	0,0516	25,6
U	0,0514	25,7

$$N \text{ NaOH} = \frac{0,0514 \text{ gram}}{204,2 \text{ g/mol} \cdot \frac{25,7}{1000} \text{ ml}} \cdot 1 \text{ mol/N} = 0,0098 \text{ N}$$

1.3 Pembuatan Larutan Induk BSA

Larutan induk BSA dibuat dengan melarutkan 100 mg padatan BSA menggunakan akuades hingga volumenya 100 mL, sehingga diperoleh larutan induk BSA dengan konsentrasi 1 mg/mL.

1.4 Pembuatan Larutan Standar BSA

Tabel 1.3 Volume Larutan Induk BSA untuk pembuatan larutan standar

Konsentrasi Larutan Standar (mg/mL)	Volume Larutan Induk BSA (mL)
0,10	0,5
0,20	1,0
0,30	1,5
0,40	2,0
0,50	2,5
0,60	3,0
0,70	3,5
0,80	4,0
0,90	4,5
1,00	5,0

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 0,1 \text{ mg/mL} \times 5 \text{ mL} &= 1 \text{ mg/mL} \times V_2 \\ V_2 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Lampiran 2. Scanning Panjang Gelombang untuk Analisis Metode Bradford

Tabel 2.1 Data penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi			Rata-rata
	U1	U2	U3	
525	0,005	0,002	0,011	0,006
526	0,006	0,004	0,019	0,010
527	0,009	0,007	0,022	0,013
528	0,011	0,014	0,028	0,018
529	0,022	0,024	0,046	0,031
530	0,033	0,036	0,060	0,043
531	0,047	0,045	0,069	0,054
532	0,062	0,056	0,079	0,066
533	0,076	0,068	0,086	0,077
534	0,087	0,079	0,103	0,090
535	0,101	0,090	0,115	0,102
536	0,117	0,103	0,137	0,119
537	0,129	0,115	0,155	0,133
538	0,144	0,137	0,184	0,155
539	0,160	0,148	0,206	0,171
540	0,175	0,160	0,229	0,188
541	0,193	0,171	0,241	0,202
542	0,206	0,183	0,256	0,215
543	0,220	0,193	0,264	0,226
544	0,237	0,203	0,279	0,240
545	0,252	0,234	0,286	0,257
546	0,269	0,249	0,294	0,271
547	0,282	0,252	0,302	0,279
548	0,297	0,271	0,323	0,297
549	0,313	0,294	0,347	0,318
550	0,327	0,302	0,361	0,330
551	0,341	0,322	0,374	0,346
552	0,356	0,333	0,389	0,359
553	0,371	0,368	0,393	0,377
554	0,382	0,376	0,416	0,391
555	0,397	0,380	0,422	0,400
556	0,408	0,397	0,429	0,411
557	0,420	0,402	0,437	0,420
558	0,433	0,414	0,459	0,435
559	0,443	0,420	0,461	0,441
560	0,456	0,429	0,474	0,453
561	0,466	0,447	0,482	0,465
562	0,476	0,461	0,490	0,476
563	0,485	0,473	0,497	0,485
564	0,494	0,482	0,511	0,496
565	0,503	0,493	0,520	0,505
566	0,512	0,501	0,535	0,516
567	0,519	0,516	0,547	0,527
568	0,524	0,523	0,556	0,534
569	0,533	0,529	0,561	0,541
570	0,539	0,535	0,573	0,549

571	0,545	0,539	0,584	0,556
572	0,550	0,546	0,590	0,562
573	0,554	0,552	0,597	0,568
574	0,560	0,558	0,613	0,577
575	0,564	0,561	0,625	0,583
576	0,567	0,563	0,630	0,587
577	0,572	0,569	0,639	0,593
578	0,574	0,572	0,641	0,596
579	0,577	0,575	0,652	0,601
580	0,579	0,577	0,658	0,605
581	0,580	0,579	0,667	0,609
582	0,582	0,580	0,674	0,612
583	0,584	0,581	0,679	0,615
584	0,588	0,584	0,682	0,618
585	0,586	0,581	0,680	0,616
586	0,585	0,579	0,677	0,614
587	0,585	0,576	0,671	0,611
588	0,584	0,576	0,653	0,604
589	0,584	0,576	0,649	0,603
590	0,583	0,575	0,645	0,601
591	0,583	0,574	0,634	0,597
592	0,581	0,574	0,630	0,595
593	0,579	0,571	0,627	0,589
594	0,576	0,569	0,621	0,589
595	0,574	0,569	0,618	0,587
596	0,572	0,563	0,610	0,582
597	0,572	0,560	0,607	0,580
598	0,568	0,557	0,595	0,573
599	0,566	0,549	0,591	0,569
600	0,564	0,546	0,587	0,566
601	0,560	0,541	0,584	0,562
602	0,559	0,538	0,581	0,559
603	0,553	0,530	0,580	0,554
604	0,551	0,528	0,576	0,552
605	0,546	0,525	0,575	0,549
606	0,540	0,524	0,572	0,545
607	0,538	0,524	0,569	0,544
608	0,533	0,523	0,564	0,540
609	0,529	0,520	0,560	0,536
610	0,525	0,517	0,556	0,533
611	0,519	0,516	0,541	0,525
612	0,517	0,513	0,536	0,522
613	0,512	0,508	0,530	0,517
614	0,509	0,503	0,527	0,513
615	0,499	0,496	0,522	0,506
616	0,494	0,491	0,513	0,499
617	0,490	0,487	0,509	0,495
618	0,485	0,484	0,504	0,491
619	0,480	0,478	0,498	0,485
620	0,478	0,470	0,492	0,480

621	0,470	0,465	0,485	0,473
622	0,467	0,460	0,473	0,467
623	0,461	0,457	0,470	0,463
624	0,456	0,453	0,463	0,457
625	0,447	0,443	0,465	0,452

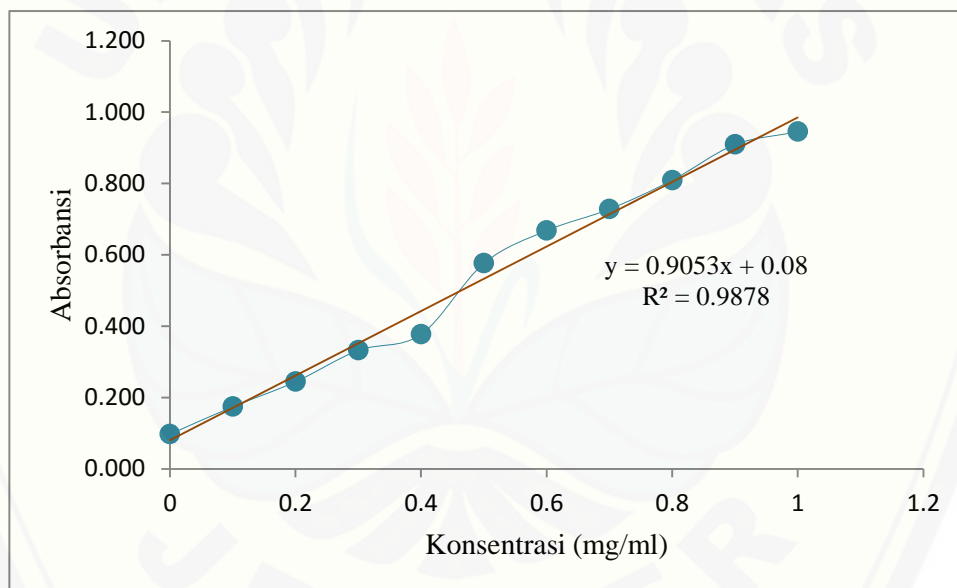


Lampiran 3. Kurva Kalibrasi Standar BSA

Tabel 3.1 Data absorbansi larutan standar BSA

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi			Rata-rata
	U1	U2	U3	
0,00	0,103	0,097	0,092	0,097
0,10	0,180	0,171	0,170	0,174
0,20	0,255	0,240	0,238	0,244
0,30	0,332	0,319	0,344	0,332
0,40	0,369	0,374	0,389	0,377
0,50	0,578	0,565	0,586	0,576
0,60	0,655	0,688	0,662	0,668
0,70	0,746	0,701	0,736	0,728
0,80	0,781	0,811	0,834	0,809
0,90	0,906	0,898	0,922	0,909
1,00	0,967	0,931	0,936	0,945

Gambar 3.1 Kurva Kalibrasi Larutan Standar BSA



Lampiran 4. Data Hasil Analisis Nitrogen Terlarut Menggunakan Metode Titration Formol

4.1 Pengaruh pH dan Waktu Inkubasi terhadap Kadar Nitrogen Terlarut

4.1.1 Hasil Analisis pada Kontrol

Tabel 4.1 Data Hasil Analisis Kadar N-Terlarut pada Kontrol

pH	Waktu Inkubasi (Jam)	Volume Titran NaOH (mL)									Kadar N-Terlarut (%)				SD
		U1			U2			U3			U1	U2	U3	U	
		U _{1.1}	U _{1.2}	U ₁	U _{2.1}	U _{2.2}	U ₂	U _{3.1}	U _{3.2}	U ₃					
1	0	1,25	1,20	1,23	1,20	1,30	1,25	1,25	1,20	1,23	1,16	1,24	1,16	1,19	0,04
	6	1,30	1,25	1,28	1,30	1,25	1,28	1,35	1,30	1,33	1,36	1,36	1,55	1,42	0,11
	12	1,40	1,45	1,43	1,35	1,45	1,40	1,40	1,50	1,45	1,94	1,82	2,02	1,93	0,10
	18	1,55	1,60	1,58	1,60	1,55	1,58	1,55	1,55	1,55	2,52	2,52	2,40	2,48	0,07
1,5	0	1,25	1,20	1,23	1,20	1,30	1,25	1,25	1,20	1,23	1,16	1,24	1,16	1,19	0,04
	6	1,35	1,40	1,38	1,40	1,40	1,40	1,35	1,40	1,38	1,75	1,82	1,75	1,77	0,04
	12	1,60	1,55	1,58	1,50	1,55	1,53	1,50	1,60	1,55	2,52	2,33	2,40	2,42	0,10
	18	1,65	1,70	1,68	1,65	1,65	1,65	1,60	1,70	1,65	2,91	2,79	2,79	2,83	0,07
2	0	1,25	1,20	1,23	1,20	1,30	1,25	1,25	1,20	1,23	1,16	1,24	1,16	1,19	0,04
	6	1,60	1,70	1,65	1,60	1,60	1,60	1,65	1,60	1,63	2,79	2,60	2,71	2,55	0,04
	12	1,70	1,60	1,65	1,65	1,75	1,70	1,65	1,65	1,65	2,79	2,99	2,79	2,87	0,07
	18	1,80	1,75	1,88	1,80	1,80	1,80	1,70	1,80	1,85	3,68	3,37	3,57	3,15	0,16
2,5	0	1,25	1,20	1,23	1,20	1,30	1,25	1,25	1,20	1,23	1,16	1,24	1,16	1,19	0,04
	6	1,70	1,70	1,70	1,75	1,65	1,70	1,70	1,75	1,73	2,99	2,99	3,10	3,02	0,07
	12	1,80	1,75	1,78	1,85	1,85	1,85	1,85	1,80	1,83	3,30	3,57	3,49	3,45	0,14
	18	1,90	2,00	1,95	1,95	2,05	2,00	2,00	1,95	1,98	3,96	4,15	4,07	4,06	0,10

4.1.2 Hasil Analisis pada Sampel

Tabel 4.2 Data Hasil Analisis Kadar N-Terlarut pada Sampel

pH	Waktu Inkubasi (Jam)	Volume Titrasi NaOH (mL)									Kadar N-Terlarut (%)				SD
		U1			U2			U3			U1	U2	U3	U	
		U _{1.1}	U _{1.2}	U ₁	U _{2.1}	U _{2.2}	U ₂	U _{3.1}	U _{3.2}	U ₃					
1	0	1,30	1,25	1,28	1,30	1,30	1,30	1,35	1,30	1,33	1,36	1,43	1,55	1,45	0,10
	6	1,40	1,40	1,40	1,40	1,45	1,43	1,35	1,45	1,40	1,82	1,94	1,82	1,86	0,07
	12	1,60	1,65	1,63	1,55	1,60	1,58	1,60	1,60	1,60	2,71	2,52	2,60	2,61	0,10
	18	1,75	1,70	1,73	1,65	1,75	1,70	1,70	1,70	1,70	3,10	2,99	2,99	3,02	0,07
1,5	0	1,30	1,25	1,28	1,30	1,30	1,30	1,35	1,30	1,33	1,36	1,43	1,55	1,45	0,10
	6	1,50	1,50	1,50	1,50	1,45	1,48	1,50	1,40	1,45	2,21	2,13	2,02	2,12	0,10
	12	1,65	1,75	1,70	1,65	1,65	1,65	1,70	1,70	1,70	2,99	2,79	2,99	2,92	0,11
	18	1,80	1,80	1,80	1,80	1,85	1,83	1,90	1,85	1,88	3,37	3,49	3,68	3,52	0,16
2	0	1,30	1,25	1,28	1,30	1,30	1,30	1,35	1,30	1,33	1,36	1,43	1,55	1,45	0,10
	6	1,65	1,65	1,65	1,75	1,75	1,75	1,75	1,65	1,70	2,79	3,18	2,99	2,99	0,19
	12	1,85	1,80	1,83	1,85	1,85	1,85	1,80	1,70	1,85	3,37	3,30	3,10	3,54	0,14
	18	1,90	1,90	1,90	1,90	1,95	1,93	1,90	1,90	1,90	3,76	3,88	3,70	3,80	0,07
2,5	0	1,30	1,25	1,28	1,30	1,30	1,30	1,35	1,30	1,33	1,36	1,43	1,55	1,45	0,10
	6	1,80	1,80	1,80	1,75	1,85	1,80	1,85	1,90	1,88	3,37	3,37	3,68	3,48	0,18
	12	2,00	2,05	2,03	2,00	2,00	2,00	1,95	2,05	2,00	4,27	4,15	4,15	4,19	0,07
	18	2,20	2,20	2,20	2,20	2,10	2,15	2,10	2,15	2,13	4,92	4,73	4,65	4,77	0,14

4.2 Perhitungan Nitrogen Terlarut Menggunakan Metode Titrasi Formol

$$\begin{aligned}\text{Blanko} &= \frac{U_1 + U_2 + U_3}{3} \\ &= \frac{0,95 \text{ ml} + 0,95 \text{ ml} + 0,90 \text{ ml}}{3} = 0,93 \text{ ml}\end{aligned}$$

1. Kontrol pH 1

a. Waktu inkubasi 0 jam

$$U_1 = \frac{1,25 \text{ mL} + 1,20 \text{ mL}}{2} = 1,23 \text{ mL}$$

$$\% \text{ N} = \frac{1,23 \text{ mL} - 0,93 \text{ mL}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100\% = 1,16\%$$

$$U_2 = \frac{1,20 \text{ mL} + 1,30 \text{ mL}}{2} = 1,25 \text{ mL}$$

$$\% \text{ N} = \frac{1,25 \text{ mL} - 0,93 \text{ mL}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100\% = 1,24\%$$

$$U_3 = \frac{1,25 \text{ mL} + 1,20 \text{ mL}}{2} = 1,23 \text{ mL}$$

$$\% \text{ N} = \frac{1,23 \text{ mL} - 0,93 \text{ mL}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100\% = 1,16\%$$

$$\Sigma \% \text{ N} = \frac{1,16\% + 1,24\% + 1,16\%}{3} = 1,19\%$$

b. Waktu inkubasi 6 jam

$$U_1 = \frac{1,30 \text{ mL} + 1,25 \text{ mL}}{2} = 1,28 \text{ mL}$$

$$\% \text{ N} = \frac{1,28 \text{ mL} - 0,93 \text{ mL}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100\% = 1,36\%$$

$$U_2 = \frac{1,30 \text{ mL} + 1,25 \text{ mL}}{2} = 1,28 \text{ mL}$$

$$\% N = \frac{1,28 \text{ mL} - 0,93 \text{ mL}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100\% = 1,36\%$$

$$U_3 = \frac{1,35 \text{ mL} + 1,30 \text{ mL}}{2} = 1,33 \text{ mL}$$

$$\% N = \frac{1,33 \text{ mL} - 0,93 \text{ mL}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100\% = 1,35\%$$

$$\Sigma \% N = \frac{1,36\% + 1,36\% + 1,35\%}{3} = 1,36\%$$

2. Sampel pH 1

a. Waktu inkubasi 0 jam

$$U_1 = \frac{1,30 \text{ mL} + 1,25 \text{ mL}}{2} = 1,28 \text{ mL}$$

$$\%N = \frac{1,28 \text{ ml} - 0,33 \text{ ml}}{0,50 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100 \% = 1,36\%$$

$$U_2 = \frac{1,30 \text{ mL} + 1,30 \text{ mL}}{2} = 1,30 \text{ mL}$$

$$\%N = \frac{1,30 \text{ ml} - 0,33 \text{ ml}}{0,50 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100 \% = 1,43\%$$

$$U_3 = \frac{1,35 \text{ mL} + 1,30 \text{ mL}}{2} = 1,33 \text{ mL}$$

$$\%N = \frac{1,33 \text{ ml} - 0,33 \text{ ml}}{0,50 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100 \% = 1,55\%$$

$$\Sigma \% N = \frac{1,36\% + 1,43\% + 1,55\%}{3} = 1,45\%$$

b. Waktu inkubasi 6 jam

$$U_1 = \frac{1,40 \text{ mL} + 1,40 \text{ mL}}{2} = 1,40 \text{ mL}$$

$$\%N = \frac{1,40 \text{ ml} - 0,93 \text{ ml}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100 \% = 1,82\%$$

$$U_2 = \frac{1,40 \text{ mL} + 1,45 \text{ mL}}{2} = 1,43 \text{ mL}$$

$$\%N = \frac{1,43 \text{ ml} - 0,93 \text{ ml}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100 \% = 1,94\%$$

$$U_3 = \frac{1,35 \text{ mL} + 1,45 \text{ mL}}{2} = 1,40 \text{ mL}$$

$$\%N = \frac{1,40 \text{ ml} - 0,93 \text{ ml}}{3,54 \text{ gram}} \times 0,0098 \text{ N} \times 14,008 \times 100 \% = 1,82\%$$

$$\Sigma \% N = \frac{1,82\% + 1,94\% + 1,82\%}{3} = 1,86\%$$

Lampiran 5. Data Hasil Analisis Kadar Protein Terlarut dengan Metode Bradford

5.1 Pengaruh pH terhadap Kadar Protein Terlarut

5.1.1 Hasil Analisis Pada Kontrol

Tabel 5.1 Hasil Analisis Kadar Protein Terlarut pada Sampel Kontrol

pH	Waktu Inkubasi (Jam)	Konsentrasi Protein (mg/mL)				FP	Konsentrasi Protein Sebenarnya (mg/mL)				SD
		U1	U2	U3	U		U1	U2	U3	U	
1	0	-0,003	0,003	0,013	0,004	100 X	-0,3	0,3	1,3	0,4	0,008
	6	0,010	0,011	0,017	0,013		1,0	1,1	1,7	1,3	0,004
	12	0,021	0,024	0,030	0,025		2,1	2,4	3,0	2,5	0,004
	18	0,053	0,059	0,063	0,058		5,3	5,9	6,3	5,8	0,005
1,5	0	-0,003	0,003	0,013	0,004	-0,3	0,3	1,3	0,4	0,008	
	6	0,017	0,021	0,024	0,021	1,7	2,1	2,4	2,1	0,004	
	12	0,036	0,063	0,051	0,050	3,6	6,3	5,1	5,0	0,013	
	18	0,067	0,073	0,077	0,073	6,7	7,3	7,7	7,3	0,005	
2	0	-0,003	0,003	0,013	0,004	-0,3	0,3	1,3	0,4	0,008	
	6	0,029	0,031	0,039	0,033	2,9	3,1	3,9	3,3	0,005	
	12	0,078	0,083	0,092	0,084	7,8	8,3	9,2	8,4	0,007	
	18	0,099	0,108	0,112	0,106	9,9	10,8	11,2	10,6	0,006	
2,5	0	-0,003	0,003	0,013	0,004	-0,3	0,3	1,3	0,4	0,008	
	6	0,036	0,042	0,049	0,042	3,6	4,2	4,9	4,2	0,006	
	12	0,106	0,109	0,113	0,109	10,6	10,9	11,3	10,9	0,003	
	18	0,136	0,149	0,152	0,146	13,6	14,9	15,2	14,6	0,009	

5.1.2 Hasil Analisis Pada Sampel

Tabel 5.2 Hasil Analisis Kadar Protein Terlarut pada Sampel

pH	Waktu Inkubasi (Jam)	Konsentrasi Protein (mg/mL)				FP	Konsentrasi Protein Sebenarnya (mg/mL)				SD
		U1	U2	U3	U		U1	U2	U3	U	
1	0	0,004	0,006	0,014	0,008	100 X	0,4	0,6	1,4	0,8	0,005
	6	0,012	0,025	0,040	0,025		1,2	2,5	4,0	2,6	0,014
	12	0,032	0,039	0,055	0,042		3,2	3,9	5,5	4,2	0,012
	18	0,070	0,078	0,087	0,078		7,0	7,8	8,7	7,8	0,009
1,5	0	0,004	0,006	0,014	0,008		0,4	0,6	1,4	0,8	0,005
	6	0,022	0,038	0,041	0,034		2,2	3,8	4,1	3,4	0,010
	12	0,044	0,067	0,077	0,063		4,4	6,7	7,7	6,3	0,017
	18	0,093	0,096	0,105	0,098		9,3	9,6	10,5	9,8	0,006
2	0	0,004	0,006	0,014	0,008		0,4	0,6	1,4	0,8	0,005
	6	0,034	0,043	0,051	0,043		3,4	4,3	5,1	4,3	0,008
	12	0,103	0,107	0,113	0,108		10,3	10,7	11,3	10,8	0,005
	18	0,145	0,148	0,147	0,147		14,5	14,8	14,7	14,7	0,002
2,5	0	0,004	0,006	0,014	0,008		0,4	0,6	1,4	0,8	0,005
	6	0,052	0,055	0,064	0,057		5,2	5,5	6,4	5,7	0,008
	12	0,146	0,154	0,173	0,158		14,6	15,4	17,3	15,8	0,014
	18	0,189	0,208	0,210	0,202		18,9	20,8	21,0	20,2	0,012

5.2 Perhitungan Kadar Protein Terlarut dalam Kontrol

Persamaan Kurva Kalibrasi $y = 0,9053x + 0,08$

1. Kontrol pH 1

a. Waktu inkubasi 0 jam

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U1} : y &= 0,077 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,077 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,077 - 0,08}{0,9053} \\
 &= -0,003
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U2} : y &= 0,083 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,083 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,083 - 0,08}{0,9053} \\
 &= 0,003
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U3} : y &= 0,092 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,092 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,092 - 0,08}{0,9053} \\
 &= 0,013
 \end{aligned}$$

$$\mathbf{U} = \frac{\mathbf{U1} + \mathbf{U2} + \mathbf{U3}}{3} = \frac{(-0,003 + 0,003 + 0,013)\text{mg}}{3} = 0,004 \text{ mg/mL}$$

b. Waktu inkubasi 6 jam

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U1} : y &= 0,089 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,089 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,089 - 0,08}{0,9053}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= 0,010 \\
 \mathbf{U2 : y} &= 0,090 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,090 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,090 - 0,08}{0,9053}
 \end{aligned}$$

$$= 0,011$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U3 : y} &= 0,095 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,095 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,095 - 0,08}{0,9053}
 \end{aligned}$$

$$= 0,017$$

$$U = \frac{U1 + U2 + U3}{3} = \frac{(0,009 + 0,011 + 0,017)\text{mg}}{3} = 0,013 \text{ mg/mL}$$

5.3 Perhitungan Kadar Protein Terlarut dalam Sampel

Persamaan Kurva Kalibrasi $y = 0,9053x + 0,08$

1. Sampel pH 1

a. Waktu inkubasi 0 jam

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U1 : y} &= 0,084 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,084 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,084 - 0,08}{0,9053}
 \end{aligned}$$

$$= 0,004$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U2 : y} &= 0,085 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,085 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,084 - 0,08}{0,9053}
 \end{aligned}$$

$$= 0,006$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U3 : y} &= 0,093 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,093 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,093 - 0,08}{0,9053} \\
 &= 0,014
 \end{aligned}$$

$$U = \frac{U1 + U2 + U3}{3} = \frac{(0,004 + 0,006 + 0,014)\text{mg}}{3} = 0,008 \text{ mg/mL}$$

b. Waktu inkubasi 6 jam

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U1 : y} &= 0,091 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,091 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,091 - 0,08}{0,9053} \\
 &= 0,012
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U2 : y} &= 0,103 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,103 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,103 - 0,08}{0,9053} \\
 &= 0,025
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{U3 : y} &= 0,116 \\
 y &= 0,9053x + 0,08 \\
 0,116 &= 0,9053x + 0,08 \\
 x &= \frac{0,116 - 0,08}{0,9053} \\
 &= 0,040
 \end{aligned}$$

$$U = \frac{U1 + U2 + U3}{3} = \frac{(0,012 + 0,025 + 0,040)\text{mg}}{3} = 0,025 \text{ mg/mL}$$