

OPTIMASI KONSENTRASI SUBSTRAT XILAN AMPAS TAHU DENGAN ENDO- β -1,4-D-XILANASE UNTUK MEMPRODUKSI XILOOLIGOSAKARIDA

Anak Agung Istri Ratnadewi*, Wuryanti Handayani, Agung Budi Santoso, Siti Nur Avida

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Jember

E-mail: istri_dewi.fmipa@unej.ac.id

Received June 10 2016

Accepted 30 November 2016

Abstrak

Ampas tahu merupakan limbah samping dari proses pengolahan tahu dan susu kedelai. Ampas tahu berpotensi sebagai sumber xilan. Xilan digunakan sebagai substrat endo- β -1,4-D-xilanase untuk menghasilkan xilooligosakarida. Penelitian ini digunakan xilan ampas yang telah dihilangkan lemak dan protein tanpa penghilangan lignin (X1nD). Xilan ampas tahu tanpa penghilangan lemak dan protein tetapi dilakukan penghilangan lignin (X2D). Enzim yang digunakan adalah endo- β -1,4-D-xilanase dari isolat *Bacillus sp.* asal abdomen rayap. Optimasi variasi konsentrasi substrat bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum dalam menghasilkan xilooligosakarida. Produk hidrolisis yang dihasilkan dianalisis menggunakan metode Miller untuk mengetahui total gula pereduksi. Produk hidrolisis konsentrasi optimum dianalisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui komponen penyusun xilooligosakarida. Substrat X1nD dan X2D optimum pada konsentrasi 6% dan 5% dengan total gula pereduksi sebesar 0,196 mg/mL dan 0,211 mg/mL. Komponen penyusun xilooligosakarida ampas tahu berupa xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), dan xilopentaosa (X5).

Kata kunci: Ampas tahu, endo- β -1,4-D-xilanase, xilan, xilooligosakarida.

Abstract

Okara is a waste byproduct of the processing of tofu and soy milk. Okara potential as a source of xylan. Xylan is used as the substrate endo-1,4- β -D-xylanase to produce xylooligosaccharide. This study used okara xylan had eliminated fat and protein without removal of lignin (X1nD). Okara xylan out without the removal of fat and protein but do removal of lignin (X2D). The enzyme used is endo-1,4- β -D-xylanase of isolates of *Bacillus sp.* From abdominal termites. Optimization of substrate concentration variation aims to determine the optimum concentration in generating xylooligosaccharide. Hydrolysis products were analyzed using Miller method to determine total reducing sugars. The optimum concentration of hydrolysis products were analyzed using Thin Layer Chromatography (TLC) to determine the components of xylooligosaccharide. X1nD and X2D optimum substrate at a concentration of 6% and 5% to the total reducing sugars of 0.196 mg/mL and 0.211 mg/mL. Xylooligosaccharide of okara components of the pulp out the form xylotriose (X3), xyloetraose (X4), and xylopentaose (X5)

Keywords: Okara, endo-1,4- β -D-xylanase, xylan, xylooligosaccharide

Pendahuluan

Ampas tahu merupakan limbah kedelai hasil samping dari pengolahan tahu dan susu kedelai (Li *et al.*, 2012). Komposisi ampas tahu terdiri dari serat kasar, protein, lemak, dan sedikit karbohidrat. Serat kasar ampas tahu mengandung selulosa 5,6%, hemiselulosa 12,1%, dan lignin 11,7% (Quitain *et al.*, 2004). Komponen penyusun utama hemiselulosa yaitu xilan. Hal ini mengindikasikan bahwa ampas tahu berpotensi sebagai sumber xilan.

Xilan merupakan komponen penting dalam biomasa pertanian yaitu yang mengandung hemiselulosa pada dinding sel tanaman (Kumar *et al.*, 2012). Polimer xilan terdiri rantai utama residu D-xilosa dengan ikatan β -1,4 dan memiliki cabang, seperti L-arabinosa, D-glukosa, D-galaktosa, D-manosa, asam D-glukoronik, dan residu asam 4-O-metil glukoronik (Sun *et al.*, 2000). Xilan digunakan sebagai substrat endo- β -1,4-D-xilanase untuk menghasilkan xilooligosakarida. Endo- β -1,4-D-xilanase tergolong sebagai enzim xilanolitik. Endo- β -1,4-D-xilanase memutuskan ikatan glikosida dengan posisi β -1 \rightarrow 4 secara acak pada rantai utama xilan. Endo- β -1,4-D-xilanase mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan *oat* untuk menghasilkan xilooligosakarida dan xilosa.

Penelitian ini menggunakan ampas tahu sebagai substrat endo- β -1,4-D-xilanase. Substrat xilan ampas tahu telah diisolasi dan diuji reaktivitasnya terhadap endo- β -1,4-D-xilanase (Baedho', 2016). Disisi lain, endo- β -1,4-D-xilanase bersumber dari isolat *Basillus sp.* asal abdominal rayab yang telah diisolasi, dimurnikan, dan dikarakterisasi. Hasil karakterisasi diperoleh kondisi hidrolisis optimum pada suhu 40, pH 5 dan waktu inkubasi 15 jam (Ratnadewi *et al.*, 2007).

Tujuan penelitian ini, antara lain: untuk mengetahui aktivitas endo- β -1,4-D-

xilanase dari isolat *Basillus sp.* asal abdominal rayab, konsentrasi substrat optimum untuk menghasilkan xilooligosakarida dan mengetahui komponen penyusun xilooligosakarida. Hasil penelitian diharapkan memberi informasi tentang pemanfaatan ampas tahu dan meningkatkan nilai ekonomis biomassa xilan pada produksi xilooligosakarida yang bermanfaat untuk kesehatan.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA dan Laboratorium CDAST (*Center of Development for Advances Science and Technology*) Universitas Jember.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah xilan ampas tahu, isolat *Basillus sp.* asal abdominal rayab, triptopan, *yeast*, *bacto* agar, natrium klorida, reagen Miller, reagen Bradford, buffer fosfat sitrat pH 5, ammonium sulfat, xilan *oat*, xilosa, etanol 95%, 1-butanol, asam asetat dan asam sulfat.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, kawat *ose*, bunsen, lemari pendingin, neraca analitik, magnetik stirer, anak stirer, *autoclave*, inkubator kering (*shaker*), alat sentrifugasi, spektrofotometer Hitachi U-2900, *dry blok*, laminar, *water bath*, *hairdryer*, oven, pH meter, *stopwatch*, dan kamera digital.

Peremajaan, Inokulasi, dan Produksi Endo- β -1,4-D-xilanase dari Isolat *Basillus sp.* asal Abdominal Rayab

Isolat *Basillus sp.* asal abdominal rayab diremajakan dengan menggoreskan kawat *ose*. Koloni bakteri digoreskan pada media LB padat, selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37⁰C selama 16 jam. Isolat bakteri yang telah diremajakan diinokulasi ke dalam media LB cair inokulum. Media digojok menggunakan

shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 16 jam pada suhu 37⁰C. Inokulan diambil 1% dan dimasukkan ke dalam media LB cair produksi dan diinkubasi pada kondisi yang sama. Campuran bakteri dalam media LB cair produksi diisolasi dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4⁰C selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai ekstrak kasar endo-β-1,4-D-xilanase untuk pengujian selanjutnya.

Pemurnian Endo-β-1,4-D-xilanase

Ekstrak kasar endo-β-1,4-D-xilanase dimurnikan menggunakan metode fraksinasi ammonium sulfat dan dialisis. Fraksinasi ammonium sulfat dilakukan pada fraksi tingkat kejenuhan 50% (b/v), hasil optimasi konsentrasi ammonium sulfat 40-70% (b/v) secara bertingkat. Pellet hasil fraksinasi dilarutkan menggunakan buffer fosfat-sitrat pH 5 setengah dari volume ekstrak kasar. Hasil fraksinasi dimurnikan lebih lanjut dengan metode dialisis. Dialisis dilakukan selama 24 jam pada suhu 4⁰C. Larutan buffer fosfat-sitrat pH 5 diganti secara kontinyu selama 2, 4, 8, dan 12 jam. Masing-masing fraksi ekstrak kasar, hasil fraksinasi dan dialisis akan diuji aktivitas enzim dan kadar protein.

Penentuan Aktivitas Endo-β-1,4-D-xilanase

Satu unit endo-β-1,4-D-xilanase didefinisikan sebagai kemampuan enzim untuk menghasilkan 1 μmol produk (gula pereduksi) dari substrat dalam 1 waktu menit pada kondisi optimum (Wrolstad et al., 2005). Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas enzim harus di buat kurva standar xilosa. Aktivitas enzim dapat ditentukan melalui persamaan 1, dengan konsentrasi sampel [S] (mg/mL), konsentrasi kontrol [k] (mg/mL), faktor pengenceran f_p , volume total V_{total} (μL), volume enzim V_{enzim} (μL), waktu hidrolisis substrat oleh enzim (waktu

inkubasi) t (menit) dan berat molekul xilosa (g/mol) BM.

$$\text{Aktivitas} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{([S]-[k]) \times f_p \times \left(\frac{V_{total}}{V_{enzim}} \right)}{t \times BM} \quad (1)$$

Larutan ekstrak kasar endo-β-1,4-D-xilanase ditambahkan substrat xilan oat 0,8% dalam *micro tube*, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 40⁰C. Campuran ditambahkan reagen Miller dan dipanaskan pada suhu 100⁰C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada air es selama 20 menit. Sampel dan kontrol diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Komposisi kontrol adalah enzim inaktif, substrat xilan oat 0,8%, dan reagen Miller yang diperlakukan seperti prosedur sampel. Perbandingan larutan ekstrak kasar endo-β-1,4-D-xilanase: substrat xilan oat: reagen Miller adalah 1: 1: 6 (v/v).

Penentuan Kadar Protein

Kadar protein endo-β-1,4-D-xilanase diukur berdasarkan metode Bradford. Pertama dibuat kurva standar *Bovine Sweum Albumin* (BSA). Kadar protein dapat ditentukan melalui persamaan 2, dengan nilai absorbansi pada λ_{595} nm Abs , nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA C , faktor pengenceran f_p dan nilai kemiringan (*gradient*) dari persamaan kurva standar m .

$$\text{Kadar protein} \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{Abs \pm C \times f_p}{m} \quad (2)$$

Sebanyak 100 μL larutan protein dimasukkan dalam *micro tube* dan ditambahkan 1000 μL reagen kerja Bradford. Campuran dihomogenkan dengan vortek dan didiamkan 2 menit. Campuran diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Pengukuran juga dilakukan menggunakan kontrol

protein inaktif berisi buffer fosfat-sitrat pH 5 dan reagen kerja Bradford.

Optimasi Kondisi Hidrolisis Endo-β-1,4-D-xilanase terhadap Substrat Xilan Ampas Tahu (Variasi Konsentrasi Substrat)

Optimasi ini bertujuan untuk menghasilkan konsentrasi optimum dalam menghasilkan xilooligosakarida. Pertama dilakukan optimasi variasi konsensentrasi substrat yaitu 1-15% dengan rentang 1% pada suhu, pH dan waktu inkubasi konstan.

Enzim dilambahkan substrat xilan ampas tahu dengan perbandingan 1:1 (v/v), kemudian diinkubasi pada suhu 40⁰C selama 16 Jam. Campuran dipanaskan pada suhu 100⁰C selama 1 menit untuk menghentikan reaksi enzimatis. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4⁰C selama 10 menit. Produk hidrolisis dideteksi menggunakan spektrofotometer visible untuk mengetahui total gula pereduksi produk hidrolisis. Pengujian dilakukan dengan menambahkan reagen Miller seperti pada tahap pengujian uji aktifitas enzim. Perhitungan total gula pereduksi dengan membandingkan standar xilosa sesuai persamaan 3, dengan *Abs* adalah nilai absorbansi pada λ₅₅₀ nm.

$$\text{Total Gula Pereduksi} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Abs} \pm C \times f_p}{m} \quad (3)$$

Deteksi Produk Hidrolisis Endo-β-1,4-D-xilanase terhadap Substrat Xilan Ampas Tahu

Produk hidrolisis yang diperoleh kemudian dideteksi komponen penyusun xilooligosakarida yang terbentuk secara kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatoplat yang akan digunakan sebelumnya diberi tanda nomor serta garis batas atas dan batas bawah sebagai lokasi penotolan sampel hidrolisat lalu dipanaskan dalam oven selama 30 menit.

40 μL hidrolisat ditotolkan pada kromatoplat dan dicelupkan dalam wadah yang telah berisi fasa gerak n-butanol, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan 2:1:1 (Ratnadewi et al., 2007).

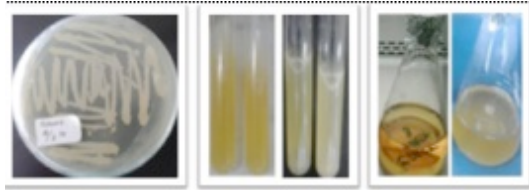
Hasil Penelitian dan Pembahasan

Aktivitas Endo-β-1,4-D-xilanase Murni

Endo-β-1,4-D-xilanase berhasil diproduksi dari isolat *Bacillus sp.* pensекреksi endo-β-1,4-D-xilanase melalui tahap isolasi (peremajaan, inokulasi, produksi) dan pemurnian (fraksinasi ammonium sulfat dan dialisis). Peremajaan isolat *Bacillus sp.* untuk mengaktifkan dan memberikan nutrisi saat proses pertumbuhan bakteri didalam media LB padat. Inokulasi bertujuan untuk menumbuhkan bakteri pensекреksi endo-β-1,4-D-xilanase dengan inducer xilan oat 0,5%. Proses produksi untuk mengembangbiakkan koloni bakteri pensекреksi endo-β-1,4-D-xilanase dalam media LB cair produksi tanpa xilan oat. Hasil peremajaan, inokulasi dan produksi ditunjukkan pada Gambar 1.

Adanya warna kuning keruh pada media LB padat, media LB cair inokulum, dan media LB cair produksi menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus sp.* Pensекреksi endo-β-1,4-D-xilanase berhasil diproduksi. Isolasi dilakukan menggunakan sentrifugasi. Prinsip dasar sentrifugasi adalah pengendapan berdasarkan gaya sentrifugal. Senyawa dengan berat molekul yang lebih besar akan mengendap terlebih dahulu pada kecepatan yang sama (Skoog et al., 2004). Supernatan mengandung endo-β-1,4-D-xilane. Pelet mengandung protein berukuran besar dan sisa inti sel bakteri. Supernatan memiliki warna kuning kecoklatan sebagai ekstrak kasar endo-β-1,4-D-xilanase. Ekstrak kasar endo-β-1,4-D-xilanase selanjutnya dimurnikan secara parsial dan diuji aktivitas enzim serta

kadar proteinya untuk mengetahui aktivitas spesifik.



Gambar 1. Hasil peremajaan, inokulasi dan produksi bakteri *Basillus sp.* pensekresi endo-β-1,4-D-xilanase

Aktivitas enzim dinyatakan dengan satuan U/mL, sedangkan kadar protein dinyatakan dengan mg/mL. Pengujian aktivitas enzim bertujuan untuk mengetahui kemampuan endo-β-1,4-D-xilanase menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan sedikit xilosa. Produk hidrolisis ditambahkan dengan reagen Miller yang mengandung asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Produk hidrolisis akan bereaksi dengan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) berwarna kuning

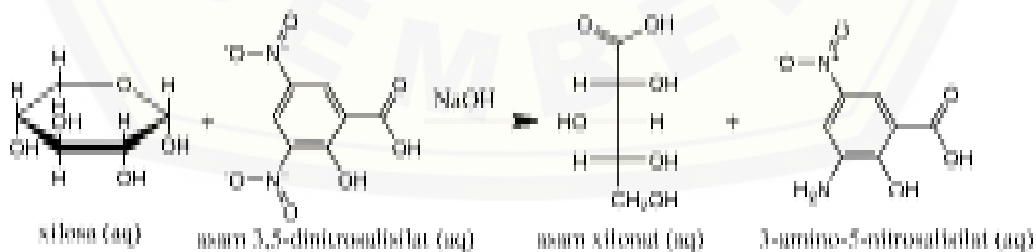
dan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat (ANS) berwarna coklat. Reaksi kimia yang terjadi saat pengujian aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 2.

Kadar protein dideteksi menggunakan metode Bradford. *Coomassie G-250* dalam reagen kerja Bradford akan berikatan dengan protein. *Coomassie G-250* yang bermuatan negatif akan berikatan dengan muatan positif protein. Ikatan kimia tersebut akan mengubah warna larutan protein (kemerahan) menjadi warna kebiruan (Bradford, 1976). Aktivitas enzim dan kadar protein ekstrak kasar endo-β-1,4-D-xilanase, hasil fraksinasi dan dialisis ditunjukkan pada Tabel 1. Peningkatan aktivitas spesifik yang terjadi pada ekstrak kasar endo-β-1,4-D-xilanase, hasil fraksinasi 50%, dan dialisis menunjukkan bahwa kemurnian endo-β-1,4-D-xilanase semakin meningkat.

Tabel 1. Aktivitas dan kadar protein endo-β-1,4-D-xilanase pada ekstrak kasar, hasil fraksinasi 50% dan dialisis

Sampel	Volume (mL)	A. (Unit/mL)	A.T. (Unit)	K.P. (mg/mL)	P.T. (mg)	A.S. (Unit/mg)	F.K.
Ekstrak Kasar	95	0,272	25,884	0,083	7,904	3,275	1
Fraksi 50%	45	0,199	8,947	0,046	2,088	4,285	1,308
Dialisis	43	0,236	10,129	0,031	1,329	7,623	2,328

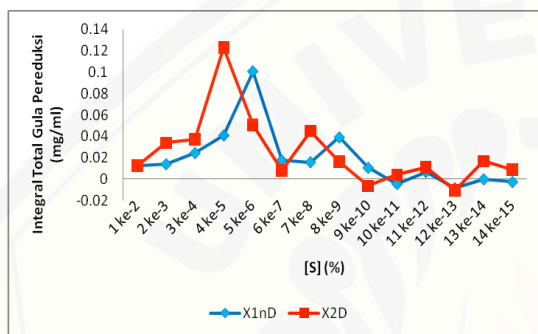
V: volume, A: aktivitas, AT: aktivitas total, KP: kadar protein, KPT: kadar protein total, AS: aktivitas spesifik, FK : faktor kemurnian.



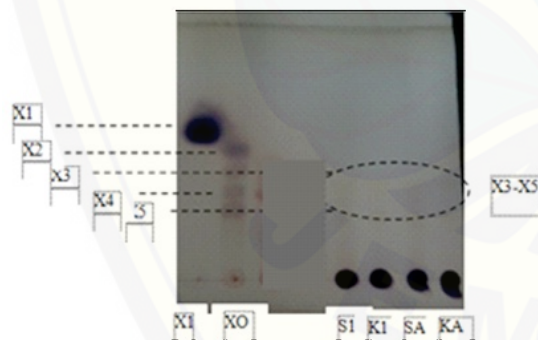
Gambar 2. Reaksi kimia pada uji aktivitas enzim (Baum et al., 2003)

Xilooligosakarida Produk Hidrolisis Endo-β-1,4-D-xilanase Terhadap Substrat Xilan Ampas Tahu (Konsentrasi substrat optimum)

Produk hidrolisis yang dihasilkan memiliki total gula pereduksi yang berbeda. Total gula pereduksi merupakan jumlah gula pereduksi hasil hidrolisis endo-β-1,4-D-xilanase terhadap xilan ampas tahu. Total gula pereduksi hasil variasi substrat dalam hidrolisis endo-β-1,4-D-xilanase terhadap substrat xilan ampas tahu (X1nD) dan (X2D) ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva integral total gula pereduksi dalam berbagai variasi [S]



Gambar 4. Kromatogram produk hidrolisis terhadap X1nD dan X2D (X1: Xilosa, XO: Xilooligosakarida, S1: Hasil hidrolisis [E] (0,236 U/mL) terhadap [S] optimum (6%) X1nD, K1: Kontrol substrat optimum X1nD, SA: Hasil hidrolisis [E] optimum (0,236 U/mL) terhadap [S] optimum (5%) X2D, KA: Kontrol enzim optimum X2D).

Gambar 3 menunjukkan bahwa profil peningkatan total gula pereduksi (X1nD) hampir sama dengan (X2D). Keduanya memiliki peningkatan total gula pereduksi sebanding dengan peningkatan konsentrasi substrat. Peluang interaksi antara substrat (S) dengan enzim (E) membentuk kompleks enzim substrat (ES) lebih sering terjadi, sehingga xilan akan lebih banyak terhidrolisis. Peningkatan kadar total gula pereduksi substrat xilan ampas tahu (X1nD) dan (X2D) meningkat mulai dari konsentrasi 1-5% dan 1-6%. Peningkatan secara signifikan (X1nD) dan (X2D) terjadi pada konsentrasi 6% dan 5% dan kadar total gula pereduksi sebesar 0,196 mg/mL dan 0,211 mg/mL.

Kromatogram Xilooligosakarida Hasil Hidrolisis Endo-β-1,4-D-xilanase Terhadap Xilan Ampas Tahu

Kromatogram Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggambarkan profil komponen penyusun produk hidrolisis. Produk hidrolisis yang terpisah akan dihidrasi oleh asam sulfat menjadi senyawa fulfural. Senyawa fulfural yang terbentuk akan berinteraksi dengan α-naftol membentuk senyawa yang berwarna ungu. Kromatogram hasil hidrolisis konsentrasi substrat optimum dan konsentrasi enzim optimum ditunjukkan pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan adanya spot xilooligosakarida hasil hidrolisis endo-β-1,4-D-xilanase terhadap xilan ampas tahu (X1nD) dan (X2D). Standar xilosa terelusi sempurna dan memiliki Rf paling tinggi dibandingkan dengan standar xilooligosakarida dan sampel. Xilosa memiliki Rf paling besar dan tidak ada spot di area penolatan. Pemisahan xilooligosakarida ditunjukkan adanya beberapa spot berupa xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), dan xilopentaosa (X5). S1 dan SA mengandung xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4) dan xilopentosa(X5), jika

dibandingkan dengan standar xilooligosakarida. Kontrol juga memiliki spot xilooligosakarida. Hal ini, disebabkan karena kontrol juga memiliki total gula pereduksi, namun nilainya lebih kecil dari total gula pereduksi sampel.

Kesimpulan

Konsentrasi substrat ampas tahu yang telah dihilangkan lemak dan protein tanpa penghilangan lignin (X1nD) optimum pada konsentrasi 6% dengan total gula pereduksi sebesar 0,196 mg/mL. Konsentrasi substrat ampas tahu tanpa penghilangan lemak dan protein tetapi dilakukan penghilangan lignin (X2D) optimum pada konsentrasi 5% dengan

total gula pereduksi sebesar 0,196 mg/mL dan 0,211 mg/mL. Komponen penyusun xilooligosakarida hasil hidrolisis kedua substrat dengan endo- β -1,4-D-xilanase, menghasilkan xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4) dan xilopentaosa (X5).

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Agung Budi Santoso S.Si., M.Si dan Yudi Aris Sulistiyo, S.Si.,M.Si atas masukan dan saran dalam penelitian ini. Pihak laboratorium CDAST (*Center of Development for Advances Science and Technology*) Universitas Jember sebagai tempat penelitian.

Daftar Pustaka

- Baum, S. J., Bowen, W.R., and Poulter, S. R. (1981). *Laboratory Exercises in Organic and Biological Chemistry*, 2nd ed., Macmillan Publishing Co., Inc. New York.
- Li, B., Lu, F., Nan, H., and Liu, Y. (2012). Isolations and Structural Characterisation of Okara Polysaccharides. *Molecules.*, 17, 753-761.
- Quitain, A.T., Ora, K., Katoh, S., and Moriyoshi, T. (2004). Environmentally Benign Pressurized Fluid Technologies for Recovery of Useful Compounds from Okara. *Research Institute for Solvothermal Technology*, 247, 1-8.
- Kumar, G. P., Pushpa, A., and Prabha, H. (2012). A Review on Xylooligosaccharides *International Research Journal of Pharmacy.*, 3, 71-74.
- Sun, R.C., Tomkison, J., and Liang, S.F. (2000). Comparative Study of Hemicelluloses from Rice Straw by Alkali and Hydrogen Peroxide Treatments. *Carbohydrate Polymers.* 42, 111-112
- Baedho', W. (2016). Deteksi Kandungan Xilan Dari Ampas Kedelai Dan Reaktivitasnya Terhadap Endo- β -1,4-D-xilanase. Tidak Diterbitkan. *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Jember, Jember
- Ratnadewi, A.A.I., Handayani, W., and Puspitaningsih, N.N.T. (2007). Produksi dan Karakterisasi Enzim β -Endoxilanase dari Bakteri Sistem Intestinal Rayap. *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol. 8(2): 110-117.
- Wrolstad, Acree, Decker, Penner, Reid, Schwartz, Shoemaker, Smith, and Sporns. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry Water, Protein, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*. A John Wiley and Sons, Inc., Canada.

Skoog, West, Holler, and Crouch. (2004). *Fundamental of Analytical Chemistry*. 8th Ed., Cengage Learning. Canada

Bollang, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. (1996). *Protein Methods*. 2nd Ed., John Wiley and Sons, Inc. New York

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dry Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

