

**EKSPLORASI KANDUNGAN PRO-ALBUMIN BEBERAPA JENIS IKAN  
AIR LAUT DAN IKAN AIR PAYAU SERTA APLIKASINYA SEBAGAI  
MAKANAN PENDAMPING AIR SUSU IBU (MP-ASI) BISKUIT**

**EXPLORATION OF THE PRO-ALBUMIN CONTENT OF  
SEVERAL SPECIES OF SEAWATER AND BRACKWATER  
FISH AND THEIR APPLICATION AS A COMPANION FOOD  
FOR MOTHER'S MILK (MP-ASI) BISCUIT**



**NUR FATMA  
L 013 18 1 007**



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**EKSPLORASI KANDUNGAN PRO-ALBUMIN BEBERAPA JENIS IKAN AIR LAUT DAN IKAN AIR PAYAU SERTA APLIKASINYA SEBAGAI MAKANAN PENDAMPING AIR SUSU IBU (MP-ASI) BISKUIT**

**NUR FATMA  
L 013 18 1 007**



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU  
PERIKANAN FAKULTAS ILMU KELAUTAN  
DAN PERIKANAN UNIVERSITAS  
HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**EXPLORATION OF THE PRO-ALBUMIN CONTENT OF SEVERAL  
TYPES OF SEAWATER AND BRACKWATER FISH AND THEIR  
APPLICATION AS A COMPANION FOOD FOR MOTHER'S MILK  
(MP-ASI) BISCUIT**

**NUR FATMA  
L 013 18 1 007**



**STUDY PROGRAM OF FISHERIES SCIENCE  
FACULTY OF MARINE SCIENCE AND  
FISHERIES HASANUDDIN UNIVERSITY  
MAKASSAR  
2024**

**EKSPLORASI KANDUNGAN PRO-ALBUMIN  
BEBERAPA JENIS IKAN AIR LAUT DAN IKAN AIR  
PAYAU SERTA APLIKASINYA SEBAGAI MAKANAN  
PENDAMPING AIR SUSU IBU (MP-ASI) BISKUIT**

Disertasi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai  
gelar doktor Program Doktorai Ilmu Perikanan  
Disusun dan diajukan oleh

**NUR FATMA  
L 013 18 1 007**

kepada

**PROGRAM DOKTORAL ILMU PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN  
PERIKANAN UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**EXPLORATION OF THE PRO-ALBUMIN CONTENT OF SEVERAL  
TYPES OF SEAWATER AND BRACKWATER FISH AND THEIR  
APPLICATION AS A COMPANION FOOD FOR MOTHER'S MILK  
(MP-ASI) BISCUIT**

Dissertation

As one of the requirements for achieving a doctoral  
degree Study Program of Fisheries Science

Prepared and submitted  
by

**NUR FATMA  
L 013 18 1 007**

To

**STUDY PROGRAM OF FISHERIES SCIENCE  
FACULTY OF MARINE SCIENCE AND  
FISHERIES HASANUDDIN UNIVERSITY  
MAKASSAR,  
INDONESIA 2024**

## DISERTASI

EKSPLORASI KANDUNGAN PRO-ALBUMIN BEBERAPA JENIS IKAN AIR LAUT  
DAN IKAN AIR PAYAU SERTA APLIKASINYA SEBAGAI MAKANAN PENDAMPING  
AIR SUSU IBU (MP-ASI) BISKUIT

NUR FATMA  
L013181007

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian  
Studi Program Doktor Program Studi Ilmu Perikanan  
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin  
Pada tanggal 9 Agustus 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui  
Promotor,

Prof. Safruddin, S.Pi, MP, Ph.D  
NIP. 19750511 200312 1 003

Ko-Promotor,

Prof. Dr. dr. Nurpujji Astuti Daud, MPH., Sp.GK(K)  
NIP. 195610201985032001

Ko-Promotor,

Prof. Dr. Mala Nuriimala, S.Pi., M.Si  
NIP. 197309092005012001

Mengetahui,

Ketua Program Studi  
Ilmu Perikanan,

Prof. Dr. Ir. H. Musbir, M.Sc  
NIP. 196508101989111001

Dekan Fakultas  
Ilmu Kelautan dan Perikanan

Prof. Safruddin, S.Pi., MP., Ph.D  
NIP. 197505112003121003

**PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, disertasi dengan judul: "Eksplorasi Pro-Albumin Beberapa Jenis Ikan Air Laut dan Ikan Air Payau serta Aplikasinya Sebagai Makanan Prndamping Air Susu Ibu (MP-ASI) Biskuit" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. Safruddin, S.Pi., MP., Ph.D sebagai Promotor serta Prof. Dr. dr. Nurpudji Astuti Daud, MPH., Sp.GK(K) dan Prof. Dr. Mala Nurimala, S.Pi., M Si sebagai Co-Promotor. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini. Sebagian dari disertasi ini telah dipublikasikan di Jurnal *Egyptian Journal of Chemistry* dengan artikel berjudul "Amino Acid Profiles of Crude Albumin Extracted from Several Marine and Brackish Water Fish in South Sulawesi, Indonesia". Artikel lainnya telah terbit di *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* dengan judul artikel "SDS PAGE Protein Profile of Albumin Extracted by Steaming from Four Marine and Three Brackish-Water Fishes". Salah satu artikel lainnya juga telah dipublikasikan di *AACL Bioflux Journal* dengan judul "The Protein and Albumin Contents in Some Species of Marine and Brackishwater Fish of South Sulawesi, Indonesia". Selain itu, terdapat bagian lain dari disertasi ini yang akan dipublikasikan dilain waktu.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, Agustus 2024



  
Nur Fatma  
NIM. L013181007

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, nikmat dan taufikNYA, sehingga penulis dapat merampungkan penulisan disertasi yang berjudul **“EKSPLOKASI KANDUNGAN PRO-ALBUMIN BEBERAPA JENIS IKAN AIR LAUT DAN IKAN AIR PAYAU SERTA APLIKASINYA SEBAGAI MAKANAN PENDAMPING AIR SUSU IBU (MP-ASI) BISKUIT”**. Hasil penelitian ini diajukan sebagai disertasi dalam rangka menyelesaikan studi Program Doktor Ilmu Perikanan di Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.

Disertasi ini melibatkan banyak pihak yang telah membantu sehingga dapat terselesaikan dengan baik, oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Safruddin, S.Pi., M.P., Ph.D sebagai promotor, kepada Prof. Dr. dr. Nurpudji Astuti Daud, MPH., Sp.GK(K) dan Prof. Dr. Mala Nurilmala, S.Pi., M.Si sebagai Co-promotor yang telah memberikan bantuan, bimbingan dan arahnya selama melaksanakan program doktor di Program Studi Ilmu Perikanan Unhas. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada para penguji Ibu Kasmianti, STP., MP., Ph.D, Ibu Dr. Nursinah Amir, S.Pi., MP, Ibu Prof. Dr. Ir. Meta Mahendradatta, dan Bapak Prof. Dr. Ir. Abubakar Tawali, M.Sc, juga kepada Dekan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Unhas, Kaprodi S3 Ilmu Perikanan, WD 1 FIKP Unhas Prof. Dr. Ir. Siti Aslamyah, MP, dosen dan staff Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin yang telah membantu sehingga penulis dapat menyelesaikan Pendidikan doktor ini dengan baik.

Terimakasih yang tak terhingga untuk ibu Herlinah Jompa, ibu periku, ibu yang berhati baik masyaAllah tabarakallah, jazaakillahu khairan ibu, tidak ada yang bisa saya ucapkan selain terimakasih banyak, melalui perantara ibu atas izin Allah swt, Allah beri jalan untuk saya alhamdulillah bisa menyelesaikan pendidikan doktor saya ini, semoga Allah memberikan balasan yang terbaik untuk ibu dan keluarga, menjaga ibu dan keluarga selalu aamiin.

Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. Ir. Metusalach, M.Sc yang telah memberikan kesempatan kepada penulis melalui beasiswa PMDSU sehingga penulis dapat menempuh pendidikan tinggi di sekolah pascasarjana Universitas Hasanuddin dan juga Kak Indrawati atas bantuannya kepada penulis selama melaksanakan pendidikan di Universitas Hasanuddin. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada seluruh teman-teman yang telah ikut membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan ini, Kak Nur Alam dan keluarga, Nur Faiizah dan keluarga, PMDSU Batch 3, S2 Ilmu Perikanan Unhas angkatan 2017, S3 Ilmu Perikanan angkatan 2018 dan adik-adik PsP Rahmadina dan adik Tuti yang telah membantu penulis, serta semua



yang telah membantu penulis tanpa terkecuali.

Secara pribadi penulis juga mendedikasikan hasil pendidikan ini kepada Suami serta anak-anak penulis, kedua orang tua, kedua Mertua, kakak-kakak, adik-adik dan ponakan-ponakan penulis serta keluarga besar penulis tanpa terkecuali atas doa dan kasih sayangnya kepada penulis sehingga penulis mampu berada pada tahap ini. Penulis juga mengucapkan terimakasih dan cinta kepada suami dan anak-anak penulis atas kesabaran dan pengorbanannya selama penulis menyelesaikan pendidikan di Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa disertasi ini masih terdapat banyak kekurangan dan kelemahan, sehingga membutuhkan perbaikan dikemudian hari. Semoga disertasi ini dapat berkontribusi dalam sektor Kelautan dan Perikanan, aamiin.

Makassar, 13 Juli 2024  
Penulis

## ABSTRAK

**NUR FATMA. L 013 18 1 007. Eksplorasi Kandungan Pro-albumin Beberapa Jenis Ikan Air Laut dan Ikan Air Payau serta Aplikasinya Sebagai Makanan Pendamping Air Susu Ibu (Mp-Asi) Biskuit.** (dibimbing oleh Safruddin, Nurpudji Astuti Daud, dan Mala Nurilmala).

**Latar Belakang.** *Fish Serum albumin* (FSA) adalah albumin serum ikan yang didapatkan dari hasil ekstraksi ikan-ikan yang memiliki kandungan albumin. Kadar albumin di dalam plasma darah mencapai 60% dan memiliki fungsi mempercepat pemulihan jaringan sel tubuh yang rusak serta mengikat obat-obatan serta logam berat yang tidak mudah larut dalam darah. Albumin ikan gabus terbukti mampu meningkatkan kandungan albumin di dalam tubuh. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk (1) Menganalisis kandungan albumin ikan layang *Decapterus ruselli*, Ikan Kembung *Rastrelliger kanagurta*, Ikan Pisang-Pisang Merah *Pterocaesio chrysozona*, Ikan Kurisi *Nemipterus japonicus*, Ikan Sembilang *Paraplotosus albilabris*, Ikan Kakap Putih Lates *calcarifer*, dan Ikan Bandeng *Chanos chanos*. (2) Menganalisis asam amino dan berat molekul ikan Layang, Ikan Kembung Ikan Kurisi dan Ikan Bandeng. (3) Memaksimalkan recovery ekstraksi pro-albumin ikan Bandeng. (4) Membuat Makanan Pendamping Air Susu Ibu (MP-ASI) Biskuit dengan penambahan pro-albumin ikan Bandeng. **Metode.** Penelitian ini menggunakan metode eksperimental tiga kali ulangan untuk analisis kandungan pro-albumin masing-masing jenis ikan dan rancangan acak lengkap dua faktorial suhu dan kadar NaCl pada maksimalisasi recovery hasil ekstraksi pro albumin ikan bandeng. Untuk analisis profil albumin menggunakan metode kromatografi. **Hasil.** Penelitian ini menunjukkan bahwa kadar pro-albumin hasil ekstraksi masing-masing jenis ikan yang diteliti bervariasi antara 1,08-5,04% (bb), tertinggi pada ikan bandeng dan terendah pada ikan pisang-pisang merah. Profil pro-albumin dari empat jenis ikan yang memiliki kadar pro-albumin tertinggi memiliki komposisi asam amino yang beragam dan berat molekul yang bervariasi. Penggunaan NaCl 1,2% dengan suhu pemanasan waterbath 35°C selama 30 menit menghasilkan rendemen pro-albumin tertinggi sebesar 4,69%. Pada pembuatan MP-ASI biskuit dengan komposisi pro-albumin ikan bandeng 5%, tepung daging ikan bandeng 15%, tepung terigu 54%, susu skim 5%, gula 10%, margarin dan telur 5%, serta vanili 1% menghasilkan biskuit yang memiliki kandungan protein yang tinggi dan sesuai dengan standar SNI MP-ASI Biskuit. **Kesimpulan** kadar albumin tertinggi dari jenis ikan yang diteliti yaitu pada ikan Bandeng dan MP-ASI biskuit yang dihasilkan dengan penambahan pro-albumin ikan bandeng menghasilkan biskuit dengan kandungan protein tinggi sesuai SNI MP-ASI Biskuit.

Kata kunci: Albumin ikan, Ekstraksi, Bandeng, Biskuit

## ABSTRACT

**NUR FATMA.** L013181007. Exploration Of The Pro-albumin Content Of Some Types Of Seawater And Bracketwater Fish For Biscuits Formulation In Toddler Children (Under Three Years). (Supervised by Safruddin, **Nurpudji Astuti Daud** and **Mala Nurilmala**).

**Background.** Fish Serum Albumin (FSA) is fish serum albumin obtained from the extraction of fish that contain albumin. Albumin levels in blood plasma reach 60% and have the function of accelerating the recovery of damaged body cell tissue and binding drugs and heavy metals that are not easily dissolved in the blood. Snakehead fish albumin has been proven to increase the albumin content in the body. **Objective.** This study aims to (1) Analyze the albumin content of flying fish *Decapterus russelli*, Mackerel *Rastrelliger kanagurta*, Red Banana Fish *Pterocaesio chrysozona*, Kurisi Fish *Nemipterus japonicus*, Sembilang *Paraplotosus albilabris*, White Snapper *Lates calcarifer*, and Milkfish *Chanos chanos*. (2) Analyzing the amino acids and molecular weight of Flying Fish, Mackerel Fish, Kurisi Fish and Milkfish. (3) Maximizing the recovery of milkfish pro-albumin extraction. (4) Making Complementary Foods for Breast Milk (MP-ASI) Biscuits with the addition of milkfish pro-albumin. **Method.** This research used an experimental method with three replications to analyze the pro-albumin content of each type of fish and a two-factorial complete randomized design of temperature and NaCl levels to maximize the recovery of milkfish pro-albumin extraction results. For albumin profile analysis using the chromatography method. **Results.** This research shows that the pro-albumin levels extracted from each type of fish studied varied between 1.08-5.04% (bb), the highest in milkfish and the lowest in red banana fish. The pro-albumin profiles of the four types of fish that have the highest levels of pro-albumin have diverse amino acid compositions and varying molecular weights. Using 1.2% NaCl with a water bath heating temperature of 35°C for 30 minutes resulted in the highest pro-albumin yield of 4.69%. In making MP-ASI biscuits with the composition of 5% milkfish pro-albumin, 15% milkfish meat flour, 54% wheat flour, 5% skim milk, 10% sugar, 5% margarine and eggs, and 1% vanilla, it produces biscuits that are has a high protein content and complies with the SNI MP-ASI Biscuit standard. **Conclusion.** The conclusion is that the highest albumin levels of the types of fish studied were milkfish and MP-ASI biscuits produced with the addition of milkfish pro-albumin, producing biscuits with high protein content according to SNI MP-ASI Biscuits.

Key words: Fish albumin, Extraction, Milkfish, Biscuits

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN UMUM.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.4. Manfaat Penelitian .....	4
1.5. Hipotesis Penelitian.....	5
1.6. Batasan Penelitian.....	5
1.7. Urgensi Penelitian .....	5
1.8. Kebaruan Penelitian.....	6
1.9. Kerangka Konsep.....	7
<b>BAB II METODE UMUM PENELITIAN .....</b>	<b>8</b>
2.1. Tempat Penelitian.....	8
2.2. Alat dan Bahan Penelitian .....	8
2.3. Prosedur Penelitian .....	9
<b>BAB III KANDUNGAN PROTEIN DAN PRO-ALBUMIN BEBERAPA JENIS IKAN AIR LAUT DAN IKAN AIR PAYAU DI SULAWESI SELATAN .....</b>	<b>20</b>
3.1. Abstrak .....	20
3.2. Abstract .....	20
3.3. Pendahuluan.....	21
3.4. Bahan dan Metode Penelitian.....	22
3.5. Hasil Penelitian.....	25
3.6. Pembahasan.....	32
3.7. Kesimpulan .....	33
<b>BAB IV PROFIL PROTEIN PRO-ALBUMIN EMPAT JENIS IKAN AIR LAUT DAN TIGA JENIS IKAN AIR PAYAU HASIL EKSTRAKSI PENGUKUSAN WATERBATH DENGAN MENGGUNAKAN SDS PAGE .....</b>	<b>34</b>
4.1. Abstrak .....	34
4.2. Abstract .....	34
4.3. Pendahuluan .....	35
4.4. Metode Penelitian.....	37
4.5. Analisis Data .....	39
4.6. Hasil dan Pembahasan .....	39

4.7. Kesimpulan.....	46
<b>BAB V PROFIL ASAM AMINO DARI EKSTRAKSI PRO-ALBUMIN EMPAT JENIS IKAN AIR LAUT DAN IKAN AIR PAYAU DI SULAWESI SELATAN INDONESIA .....</b>	<b>47</b>
5.1. Abstrak.....	47
5.2. Abstract .....	47
5.3. Pendahuluan .....	48
5.4. Metode Penelitian.....	48
5.5. Hasil dan Pembahasan .....	49
5.6. Kesimpulan.....	54
<b>BAB VI MAKSIMALISASI HASIL EKSTRAKSI PRO-ALBUMIN IKAN BANDENG MENGGUNAKAN SUHU DAN KONSENTRASI PELARUT NaCl YANG BERVARIASI.....</b>	<b>55</b>
6.1. Abstrak.....	55
6.2. Abstract.....	55
6.3. Pendahuluan .....	55
6.4. Bahan dan Metode Penelitian .....	56
6.5. Analisis Data.....	57
6.6. Hasil dan Pembahasan .....	57
6.7. Kesimpulan.....	59
<b>BAB VII FORMULASI MAKANAN PENDAMPING ASI (MP-ASI) BISKUIT BEBASIS PRO-ALBUMIN IKAN BANDENG .....</b>	<b>60</b>
7.1. Abstrak.....	60
7.2. Abstract.....	60
7.3. Pendahuluan .....	62
7.4. Bahan dan Metode Penelitian .....	62
7.5. Analisis Asam Amino dan Asam Lemak Biskuit Pro-Albumin Ikan.....	63
7.6. Analisis Data.....	64
7.7. Hasil dan Pembahasan .....	64
7.8. Kesimpulan.....	75
<b>BAB VIII PEMBAHASAN UMUM .....</b>	<b>76</b>
<b>BAB IX KESIMPULAN DAN REKOMENDASI .....</b>	<b>78</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>80</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>95</b>

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
<b>Tabel 2.1.</b> Kombinasi perlakuan konsentrasi pelarut NaCl dan Suhu .....	15
<b>Tabel 2.2.</b> Formula MP-ASI Biskuit yang mengandung pro-albumin ikan..	17
<b>Tabel 4.1.</b> Berat molekul (kD) hasil analisis photocapt elektropherogram ekstrak pro-albumin tujuh jenis ikan yang diteliti .....	43
<b>Tabel 4.2.</b> Berat molekul protein standar dalam tangga penanda berat molekul standar Nacalai Tesque .....	44
<b>Tabel 5.1.</b> Profil asam amino empat jenis ikan yang diteliti (gr) .....	50
<b>Tabel 5.2.</b> Profil asam amino empat jenis ikan yang diteliti (%) .....	51
<b>Tabel 6.1.</b> Perlakuan konsentrasi pelarut NaCl dan suhu pemanasan .....	57
<b>Tabel 6.2.</b> Rata-rata rendemen ekstrak pro-albumin ikan bandeng dengan tiga kali ulangan (gr) .....	58
<b>Tabel 7.1</b> Proporsi bahan pembuatan MP-ASI Biskuit yang mengandung pro-albumin ikan .....	62
<b>Tabel 7.2.</b> Hasil analisis proksimat bahan biskuit pro-albumin ikan bandeng .....	65
<b>Tabel 7.3.</b> Hasil analisis proksimat MP-ASI Biskuit yang mengandung pro-albumin ikan bandeng .....	66
<b>Tabel 7.4.</b> Analisis kandungan gizi MP-ASI Biskuit pro-albumin ikan/100 gr dengan aplikasi nutrisurvey dan angka kecukupan gizi .....	66
<b>Tabel 7.5.</b> Komposisi asam amino MPA-ASI Biskuit beberapa jenis ikan air laut dan ikan air payau yang diteliti .....	69
<b>Tabel 7.6.</b> Kebutuhan asam amino untuk setiap usia .....	71
<b>Tabel 7.7.</b> Komposisi hasil pengujian asam lemak MP-ASI Biskuit ber pro-albumin ikan bandeng.....	72

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
<b>Gambar 1.9.</b> Kerangka konsep penelitian .....	7
<b>Gambar 3.1.</b> Kandungan protein total daging ikan air laut dan ikan air payau yang diteliti .....	25
<b>Gambar 3.2.</b> Kandungan protein total ekstrak daging ikan air laut dan ikan air payau yang diteliti .....	27
<b>Gambar 3.3.</b> Kandungan total protein ekstrak daging (% berat daging) ikan yang digunakan dalam penelitian .....	28
<b>Gambar 3.4.</b> Kandungan pro-albumin ikan air laut dan ikan air payau yang diteliti .....	29
<b>Gambar 3.5.</b> Total kandungan pro-albumin (% protein daging) ikan yang digunakan dalam penelitian .....	30
<b>Gambar 3.6.</b> Proporsi (%) pro-albumin terhadap total protein hasil ekstrak daging ikan yang diteliti .....	31
<b>Gambar 4.1.</b> Elektropherogram hasil ekstrak daging ikan empat jenis ikan air laut dan tiga jenis ikan air payau yang diteliti .....	40
<b>Gambar 4.2.</b> Analisis photocapt elektropherogram pro-albumin empat jenis ikan air laut dan tiga jenis ikan air payau yang diteliti .....	42
<b>Gambar 7.1.</b> MP-ASI Biskuit ber pro-albumin ikan bandeng .....	65

## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

- Lampiran 1.** Pengumpulan sampel ikan air laut di PPI Paotere Makassar
- Lampiran 2.** Pengumpulan sampel ikan air payau di tambak pendidikan unhas kabupaten Barru
- Lampiran 3.** Sampel ikan air laut dan ikan air payau yang telah diberi penanganan dan siap di bawa ke Laboratorium
- Lampiran 4.** Jenis-jenis ikan yang dijadikan sampel dalam penelitian
- Lampiran 5.** Pengukuran berat ikan yang dijadikan sampel dalam penelitian
- Lampiran 6.** Penimbangan hasil fillet sampel dalam penelitian
- Lampiran 7.** Hasil fillet ikan air laut dan ikan air payau
- Lampiran 8.** Proses fillet sampel ikan air laut dan ikan air payau
- Lampiran 9.** Proses ekstraksi ikan air laut dan ikan air payau
- Lampiran 10.** Sampel ikan air laut dan ikan air payau yang siap diekstraksi
- Lampiran 11.** Hasil ekstraksi ikan air laut dan ikan air payau
- Lampiran 12.** Proses waterbath sampel ikan air laut dan ikan air payau
- Lampiran 13.** Sampel ikan air laut dan ikan air payau yang siap dianalisis
- Lampiran 14.** Analisis sds page sampel ikan air laut dan ikan air payau



## **BAB I PENDAHULUAN UMUM**

### **1.1. Latar Belakang**

Di negara-negara Asia ekstrak ikan merupakan obat yang populer digunakan oleh masyarakat. Protein ikan memiliki daya cerna yang tinggi sehingga jumlah yang diserap oleh tubuh juga akan tinggi, selain itu protein ikan memiliki kandungan asam-asam amino esensial dan susunannya hampir mendekati asam amino yang diperlukan tubuh, oleh sebab itu protein ikan dikatakan sebagai protein yang lengkap dan bermutu tinggi (Muchtadi, 2010). Masyarakat lokal percaya bahwa ekstrak protein ikan, khususnya ekstrak ikan gabus (*Channa striata*) memiliki khasiat farmakologi yang bermanfaat untuk kesejahteraan dan kesehatan manusia (Shafri dan Manan, 2012). Selain itu sejak dahulu ikan gabus dipercaya oleh paramedis dapat mempercepat penyembuhan luka sehingga dianjurkan untuk dikonsumsi pasien operasi *pasca* melahirkan dikarenakan ikan gabus mengandung protein yang tinggi (albumin) (Sumarno, 2012).

Penggunaan ikan gabus untuk pengobatan secara tradisional telah dilakukan di beberapa daerah. Di Sulawesi Selatan, ikan gabus sering dikonsumsi oleh perempuan yang baru melahirkan. Dengan mengonsumsi ikan gabus, diharapkan perempuan yang melahirkan cepat sembuh dan menghasilkan ASI (air susu ibu) yang banyak untuk kebutuhan bayinya. Di daerah Tanah Toraja dan Enrekang, ikan gabus diberikan sejak dulu kepada anak-anak karena dipercaya dapat meningkatkan kekebalan tubuh anak-anak (Ghufran, 2010).

Dahulu pasien berkadar albumin rendah diberi infus *Human Serum albumin* (HSA) untuk menaikkan kadar albuminnya, namun infus HSA biayanya mahal (Rp. 1,4 juta setiap pemberian) dan minimal harus diberikan tiga kali infus HSA (Taslim, 2007). Oleh karenanya pasien kurang mampu disarankan untuk mengonsumsi air kukusan ikan gabus. Setelah pemberian ekstrak ikan gabus, hampir semua pasien berkadar albumin rendah albuminnya naik lebih cepat dibandingkan pemberian albumin lewat infus. Bahkan pasien berkadar albumin rendah yang diikuti komplikasi penyakit seperti Hepatitis, TBC (infeksi paru-paru), Neprotis syndrome, Tonsilitas, Typus, Diabetes, Patah tulang, Gastritis, Gizi buruk, Sepsis, Stroke, ITP (Idiopatik Trombosit Tupenia Purpura), HIV, Thalasemia Minor, Autis, bisa lebih baik dengan pemberian albumin sari ikan gabus (Taslim, 2007).

Hasil penelitian Suprayitno (2003), pada pasien *pasca* operasi dengan kadar albumin rendah (1,8 g/100ml) di Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar Malang menunjukkan kadar albumin darah pasien tersebut

menjadi normal (3,5 - 5,5 g/100 ml) setelah diberi ekstrak ikan gabus dengan bobot 2 kg per hari dari hasil pengukusan. Mustafa *et al.*, (2012) mengemukakan bahwa ekstrak ikan gabus memiliki potensi meningkatkan serum albumin *pasca* operasi karena memiliki kapasitas antioksidan yang bereaksi dan menekan produksi radikal bebas. Pasien *hipoalbuminaemia* yang diberikan suplemen *Fish Serum albumin* (FSA) ikan gabus dengan uji klinis menunjukkan peningkatan kandungan albumin mereka (Kusumawardhani, dkk., 2006). Ekstrak dari hasil pengukusan ikan gabus yang diminumkan kepada pasien *pasca* operasi mampu menyembuhkan luka operasinya (Ghufran, 2010; Baie dan Sheikh, 2000; Gam, dkk., 2006).

Ekstrak ikan gabus yang mengandung albumin tinggi digunakan untuk merawat luka karena di dalam tubuh albumin berperan penting pada proses pembentukan jaringan sel baru (Putri *et al.*, 2016). Selain itu, anak-anak di bawah usia lima tahun yang mengonsumsi biskuit yang diperkaya dengan albumin ikan gabus memiliki tingkat albumin yang lebih tinggi dibandingkan dengan anak-anak yang hanya diberi biskuit susu (Sari dkk., 2014). Albumin yang merupakan protein sederhana berperan penting dalam pertumbuhan dan pemeliharaan sel selama masa tumbuh kembang anak. Kurangnya kadar albumin di dalam tubuh anak akan menghambat perkembangan sel di otak dan bisa menghambat kecerdasannya. Selain itu, kekurangan asupan protein akan menyebabkan pertumbuhan pada anak-anak akan terhambat dan apabila tidak ditangani secara khusus maka akan memunculkan masalah gizi buruk dan atau bahkan stunting.

Di Indonesia prevalensi balita stunting menduduki peringkat kedua se-Asia Tenggara. Hal ini berdasarkan data yang dikeluarkan oleh *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2021, dengan rata-rata nilai prevalensi global balita stunting di Indonesia sebesar 24,4%. Masalah gizi buruk yang berkelanjutan tidak hanya menyebabkan stunting tapi juga dapat menyebabkan kematian. Berdasarkan data dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, diperkirakan penyebab terbesar kematian balita di Indonesia adalah akibat gizi buruk. Sebanyak 170.000 anak atau 60% dari jumlah kematian balita di Indonesia setiap tahunnya adalah akibat gizi buruk.

Makanan tambahan (*food supplement*) memiliki kandungan nutrisi seperti vitamin, mineral dan asam amino. Makanan tambahan bisa berbentuk pil, kapsul, tablet, bubuk atau cairan yang fungsinya sebagai pelengkap kekurangan zat gizi yang dibutuhkan untuk menjaga agar vitalitas tubuh tetap prima (Yuliarti, 2009). Menurut Olivia (2004), makanan kesehatan atau disebut juga *dietary supplement*, atau *nutraceutical* adalah produk kesehatan yang mengandung satu atau lebih zat yang bersifat nutrisi atau obat termasuk vitamin, mineral, dan asam-asam amino.

Firlianty *et al.*, (2014), mengemukakan bahwa salah satu diversifikasi ikan gabus adalah dalam bentuk bubuk, baik dengan cara pengeringan vakum maupun produk pengeringan baku. Tawali dkk., (2012), telah melakukan penelitian mengenai produk konsentrat protein ikan gabus yang dapat dijadikan sebagai *food supplement* dan terbukti mampu mempercepat penyembuhan penyakit infeksi, serta meningkatkan daya tahan tubuh dan status gizi pasien. Namun, untuk memperoleh albumin dari ekstrak ikan mekanisme pembuatannya harus diperhatikan karena proses yang baik juga akan menghasilkan ekstrak ikan yang baik pula (Suprayitno, 2003).

Beralihnya penggunaan HSA ke albumin ikan gabus selain karena HSA memiliki harga yang sangat mahal juga dikarenakan kehalalan HSA yang masih pro dan kontra. HSA diperoleh dengan mengekstrak serum darah manusia. Hal ini menyebabkan terdapat dua hukum yang berbeda pada penggunaan HSA dalam perspektif Islam (Kashim *et al.*, 2017). Selain itu maraknya pemanfaatan ekstrak ikan gabus untuk dimanfaatkan albuminnya, memunculkan kekhawatiran akan keberlanjutan stoknya di alam. Berbagai upaya budidaya ikan gabus pun mulai dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut. Namun diyakini ikan gabus alam jauh lebih baik dibandingkan dengan ikan gabus budidaya. Hasil penelitian Chasanah *et al.*, (2015), untuk mengetahui perbandingan komposisi kimia dan kadar albumin dari ikan gabus alam dan ikan gabus budidaya menjelaskan bahwa protein ikan gabus alam dan ikan gabus budidaya memiliki kadar yang tidak berbeda tetapi kadar albumin ikan gabus alam lebih tinggi daripada ikan gabus budidaya, kandungan asam amino ikan gabus alam dan ikan gabus budidaya memiliki kemiripan, tetapi kuantitas asam amino ikan budidaya lebih tinggi dari ikan gabus alam.

Kenampakan tubuh dan bau amis dari ikan gabus membuat sebagian masyarakat kurang berkenan untuk mengonsumsinya langsung. Akan tetapi dengan kemajuan teknologi dan ilmu pengetahuan, kini masyarakat dapat memperoleh manfaat albumin ikan gabus karena telah banyak inovasi hasil olahan albumin ikan gabus yang diciptakan baik itu dalam bentuk cair, serbuk, kapsul dan lain-lain. Oleh karenanya berdasarkan uraian tersebut di atas dan mengingat sumberdaya ikan yang dimiliki Indonesia begitu beragam maka muncul pemikiran untuk melakukan eksplorasi menggunakan jenis ikan air laut dan ikan air payau yang diduga memiliki kandungan albumin tinggi, sehingga akan ditemukan alternatif sumber albumin ikan selain ikan gabus yang diharapkan memiliki khasiat seperti albumin ikan gabus.

Pemilihan jenis ikan didasarkan pada jenis ikan air laut yang memiliki populasi di alam melimpah, mudah didapatkan dan memiliki nilai ekonomis yang terjangkau, adapun ikan air payau dipilih berdasarkan jenis ikan yang kadang menjadi hama di tambak udang. Selain itu

diharapkan pula untuk menemukan metode ekstraksi yang mampu memaksimalkan hasil ekstrak albumin, serta menghasilkan produk biskuit yang mengandung albumin ikan yang sesuai dengan Standar Nasional Indonesia Makanan Pendamping Air Susu Ibu- Biskuit (SNI MP-ASI-Biskuit).

## 1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Berapa kandungan pro-albumin pada setiap jenis ikan air laut dan ikan air payau yang diteliti?
- 2) Bagaimana profil berat molekul protein dan asam amino dalam pro-albumin pada setiap jenis ikan air laut dan ikan air payau yang diteliti?
- 3) Bagaimana cara memaksimalkan recovery pro-albumin ikan?
- 4) Bagaimana kesesuaian produk pro-albumin ikan yang dihasilkan agar sesuai dengan SNI MP-ASI Biskuit?

## 1.3. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kandungan pro-albumin beberapa jenis ikan air laut dan ikan air payau yang berpotensi dijadikan alternatif sumber pro-albumin selain ikan gabus, serta penelitian ini juga diharapkan mampu menghasilkan produk berupa MP-ASI biskuit yang bermanfaat untuk pemenuhan kebutuhan nutrisi anak.

## 1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1) Menganalisis kadar pro-albumin pada empat jenis ikan air laut yaitu ikan layang (*Decapterus ruselli*), ikan kembung (*Rastrelliger kanagurta*), ikan pisang-pisang merah (*Pterocaesio chrysozona*), ikan kurisi (*Nemipterus japonicus*), dan tiga ikan air payau yaitu ikan sembilang (*Paraplotosus albilabris*), ikan kakap putih (*Lates calcalifer*) dan ikan bandeng (*Chanos chanos*).
- 2) Menganalisis asam-asam amino penyusun pro-albumin empat jenis ikan air laut dan ikan air payau yang memiliki kandungan pro-albumin tertinggi.
- 3) Menganalisis berat molekul pro-albumin ikan air laut dan ikan air payau yang diteliti.
- 4) Merancang metode maksimalisasi *recovery fish serum pro-albumin* dari jenis ikan yang diteliti yang memiliki kandungan pro-albumin tertinggi.
- 5) Menciptakan produk biskuit pro-albumin ikan dari jenis ikan yang memiliki kandungan pro-albumin tertinggi yang sesuai dengan standar SNI MP-ASI Biskuit.

### 1.5. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Beberapa jenis ikan air laut dan ikan air payau memiliki kandungan pro-albumin yang lebih tinggi dari ikan gabus.
- 2) Maksimalisasi recovery pro-albumin ikan menghasilkan rendemen yang tinggi.
- 3) MP-ASI Biskuit pro-albumin ikan yang diformulasikan menggunakan bahan baku pro-albumin ikan yang sesuai dengan SNI MP-ASI Biskuit.

### 1.6. Batasan Penelitian

Banyak faktor yang mempengaruhi kandungan pro-albumin pada ikan, diantaranya jenis ikan, lingkungan atau tempat tinggal ikan, makanan, umur, berat, jenis kelamin. Agar dalam penelitian ini fokus masalahnya lebih jelas dan mudah untuk diidentifikasi faktor apa saja yang tidak termasuk dalam ruang lingkup penelitian, maka peneliti membatasi pemilihan jenis ikan hanya pada jenis-jenis ikan yang hidup di air laut dan ikan air payau yang memiliki sumberdaya di alam masih melimpah, mudah didapatkan, memiliki nilai ekonomis yang tidak terlalu tinggi atau murah, serta pada ikan air payau dipilih jenis ikan yang kadang menjadi hama pada tambak udang.

### 1.7. Urgensi Penelitian

Albumin di dalam tubuh memiliki peran yang sangat penting dikarenakan jumlahnya hampir mencapai 60% di dalam serum darah dan memiliki banyak fungsi penting. Kekurangan akan kadar albumin dalam tubuh dikarenakan sesuatu hal seperti adanya luka bakar, pasien pasca operasi dan pasca melahirkan ataupun malnutrisi mengharuskan adanya penambahan albumin dari luar tubuh. Selama ini untuk memenuhi kekurangan akan kandungan albumin di dalam tubuh pasien diberikan infus albumin dari *Human Serum albumin* (HSA), namun karena harganya yang relatif mahal sehingga tidak semua kalangan masyarakat mampu menjangkaunya, selain itu kehalalan dari HSA masih diragukan, oleh karena itu diperlukan adanya alternatif pengganti HSA yang murah, mudah didapatkan dan kehalalannya jelas. Sehingga alternatif yang diberikan yaitu dengan mengkonsumsi air rebusan ikan gabus, namun karena kenampakan dari ikan gabus dan baunya yang amis menjadikannya banyak yang tidak menyukai untuk mengkonsumsinya secara langsung, sehingga terciptalah inovasi berbagai produk dari ekstraksi albumin ikan gabus. Dikarenakan permintaan akan albumin ikan gabus semakin banyak hal ini menimbulkan kekhawatiran mengenai jaminan ketersediaan albumin ikan dalam jangka panjang. Melihat sumberdaya ikan yang dimiliki begitu beragam sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengeksplorasi

kandungan pro-albumin pada beberapa jenis ikan air laut dan ikan air payau serta menganalisis profil pro-albuminnya, selain itu melakukan maksimalisasi *recovery* ekstraksi dari ikan air laut dan ikan air payau yang memiliki kandungan pro-albumin tertinggi yang akan dijadikan sebagai bahan baku pembuatan biskuit berpro-albumin ikan.

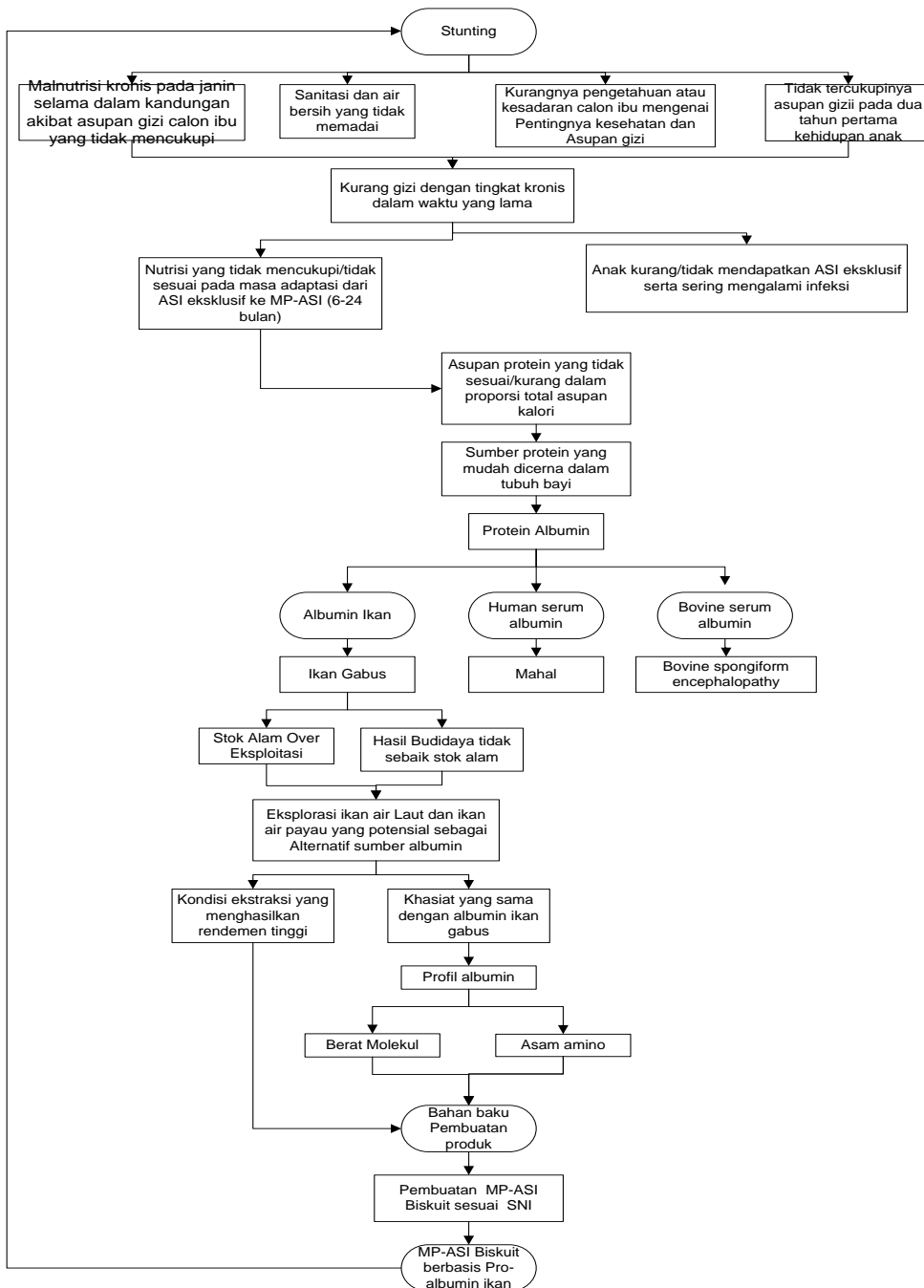
### **1.8. Kebaruan Penelitian (*Novelty*)**

Kebaruan dalam penelitian ini adalah mengetahui:

- 1) Jenis ikan air laut (ikan layang, ikan kembung, ikan pisang-pisang merah dan ikan kurisi) atau ikan air payau (ikan sembilang, ikan kakap putih dan ikan bandeng) yang memiliki kandungan pro-albumin tinggi.
- 2) Metode ekstraksi dengan kombinasi NaCl dan suhu untuk memaksimalkan *recovery* pro-albumin pada suatu jenis ikan.
- 3) MP-ASI Biskuit yang mengandung pro-albumin ikan yang sesuai SNI.

## 1.9. Kerangka Konsep Penelitian

Kerangka konsep dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.1



Gambar 1.1 Kerangka Konsep Penelitian

## **BAB II METODE UMUM PENELITIAN**

### **2.1. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dari tahun 2018 - 2023. Pengambilan sampel untuk penelitian ini dilakukan di Pangkalan Pendaratan Ikan Paotere (PPI Paotere) Makassar untuk jenis ikan air laut, dan untuk sampel ikan air payau didapatkan dari tambak pendidikan Unhas budidaya ikan Kabupaten Barru. Preparasi sampel dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan.

Pengujian sampel dilakukan di empat laboratorium, yaitu (1) analisis kandungan protein dan pro-albumin dilaksanakan di Laboratorium Kimia Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. (2) Analisis berat molekul dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. (3) Analisis asam amino dilaksanakan di Laboratorium Jasa dan Pengujian, Kalibrasi dan Sertifikasi Institut Pertanian Bogor. (4) Analisis asam amino dan asam lemak biskuit pro-albumin dilaksanakan di Laboratorium Saraswanti Indo Genetech (SIG).

### **2.2. Alat dan Bahan Penelitian**

Alat-alat yang digunakan yaitu *coolbox*, pisau, blender, timbangan analitik, wadah/baskom, *sentrifuge*, mikropipet, *waterbath*, HPLC, desikator, oven, cawan porselen, EZ-Fasttm GC-FID hydrolyzed amino acids, analysis kit dan kit SDS-PAGE serta alat-alat laboratorium lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ikan air laut dan ikan air payau. Berat masing-masing ikan antara 150 – 900 gram per ekor. Ikan air laut yang dipilih adalah ikan layang (*Decapterus ruselli*) ikan kembung (*Rastrelliger kanagurta*), ikan pisang-pisang merah (*Pterocaesio chrysozona*), ikan kurisi (*Nemipterus japonicus*), sedangkan untuk jenis ikan air payau yang dipilih yaitu ikan bandeng (*Chanos chanos*), ikan sembilang (*Paraplotosus albirablis*) dan ikan kakap putih (*Lates calcarifer*). Bahan untuk analisis yaitu aquadest, kertas saring, *Bovine Serum Albumin*, asam triloasetat, asetonitril, coomassie brilliant blue, gel SDS, HCL, reagent lowry, tissue, sarung tangan dan masker.



### 2.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam tiga tahapan yaitu:

Tahap Pertama: (1) Analisis kandungan dan sifat-sifat pro-albumin ikan air laut dan ikan air payau. Tahap Kedua: (2) Hasil dari tahapan penelitian pertama akan diketahui jenis ikan yang memiliki kandungan pro-albumin tertinggi, selanjutnya jenis ikan tersebut digunakan dalam percobaan maksimisasi *recovery* hasil ekstraksi pro-albumin. Tahap Ketiga: (3) Pembuatan MP-ASI biskuit pro-albumin ikan yang sesuai dengan standar SNI.

Secara sistematis, tahapan preparasi dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

#### 1. Pemilihan Jenis Ikan Sampel

Ikan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua kelompok yaitu ikan air laut dan ikan air payau. Ikan laut terdiri dari empat jenis yaitu ikan Layang, ikan Kembung, ikan Pisang-Pisang Merah, dan ikan Kurisi. Ikan air payau dipilih tiga jenis yaitu ikan Sembilang, ikan Bandeng dan ikan Kakap Putih. Pemilihan sampel ikan air laut berdasarkan jenis ikan yang keberadaannya di alam melimpah dan mudah didapatkan. Pada ikan air payau pemilihan jenis ikan didasarkan pada ikan budidaya yang mudah didapatkan, serta ikan yang terkadang menjadi hama bagi petambak udang. Rata-rata berat masing-masing jenis ikan untuk sampel jenis ikan air laut yaitu antara 150-400 gram, sedangkan jenis ikan air payau antara 700-900 gram per ekor.

#### 2. Teknik Sampling

Jenis ikan laut yang dipilih diambil dari pangkalan pendaratan ikan Paotere (PPI Paotere) Makassar Sulawesi Selatan, dan ikan-ikan air payau didapatkan dari tambak pendidikan Unhas budidaya ikan Kabupaten Barru Sulawesi Selatan. Pengambilan sampel dilakukan secara acak. Sampel yang telah didapatkan selanjutnya dimasukkan ke dalam box *styrofoam* lalu diberi es curah (halus) yang cukup agar tidak mengalami kerusakan selama pengangkutan dan kemudian dibawa ke Laboratorium.

#### 3. Penyiapan dan Ekstraksi Sampel

Ikan-ikan yang telah didapatkan ditimbang per ekornya untuk mengetahui berat dari masing-masing ikan, kemudian dibersihkan, dibuang isi perutnya, lalu di fillet. Daging ikan yang sudah difillet dipisahkan kulitnya kemudian dihaluskan dengan blender. Lalu sebanyak

100 g daging ikan yang telah dihaluskan ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur (beaker glass), ditambahkan aquadest 400 ml lalu dihomogenkan dengan homogenizer. Selanjutnya dilakukan pemanasan dengan *waterbath* pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 30 menit. Ekstrak ikan kemudian disaring dengan kertas saring. Hasil saringan ekstrak ikan selanjutnya diukur volumenya dan dimasukkan ke dalam botol kaca lalu disimpan di dalam lemari pendingin hingga dilakukan analisis.

#### **4. Analisis Kandungan dan Sifat-Sifat Pro-albumin Ikan Air Laut dan Ikan Air Payau**

Analisis kandungan dan sifat-sifat pro-albumin hasil ekstraksi ikan air laut dan ikan air payau yang dihasilkan dilakukan menggunakan metode berikut ini:

##### **4.1 Analisis Kadar Protein (Metode Kjeldahl) (AOAC, 2005)**

Tahapan yang dilakukan dalam analisis protein terdiri dari tiga, yaitu destruksi, destilasi dan titrasi.

###### **4.1.1 Tahap Destruksi**

Daging ikan yang telah dihaluskan ditimbang seberat 1 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Setengah tablet Kjeldahl atau selenium dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl yang berfungsi untuk mempercepat reaksi tersebut dan ditambahkan 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tabung yang berisi larutan tersebut dimasukkan ke dalam alat pemanas dengan suhu 4100C. Proses destruksi dilakukan sampai larutan berwarna hijau bening.

###### **4.1.2 Tahap Destilasi**

Sampel yang telah didestruksi dilarutkan ke dalam labu destilasi 100 ml menggunakan akuades. Air bilasan juga dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambah larutan NaOH 40% sebanyak 10 ml, kemudian didestilasi. Cairan yang keluar dari tabung kondensor ditampung di dalam Erlenmeyer 125 ml berisi larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dan 3 tetes indicator (cairan methyl red dan bromocresol green) yang ada di bawah kondensor. Destilasi dilakukan sampai larutan dalam Erlenmeyer mengalami perubahan warna dari merah muda menjadi biru.

### 4.1.3 Tahap Titration

Titration dilakukan dengan menggunakan HCL 0,1 N sampai warna larutan pada Erlenmeyer berubah menjadi merah muda kembali.

Perhitungan kadar protein:

$$\text{Nitrogen (\%)} = \frac{(\text{ml HCL sampel} - \text{ml HCL blanko}) \times \text{N HCL} \times 14 \text{ FP} \times 100\%}{\text{mg sampel fillet}}$$

Kadar Protein (%) = % nitrogen x factor konversi

keterangan:

N HCL = 0,1 N

FK = faktor konversi = 5,6 (Mariotti *et al.*, 2008)

Fp = faktor pengenceran.

## 4.2. Analisis Kadar Pro-albumin (Metode Lowry)

Pengujian kandungan pro-albumin dilakukan dengan metode Lowry. Prosedur kerja uji kadar protein pro-albumin dengan Metode Lowry menurut Muchtadi (1989), yaitu sebagai berikut:

4.2.1. Pertama – tama dibuat pereaksi yaitu sebagai berikut:

- a. Natrium karbonat 2 % dalam larutan NaOH 0,1 N. (Pereaksi 1).
- b. Tembaga sulfat 0,5 % dalam larutan Na. K tartrat 1 % (dibuat hanya pada waktu akan digunakan). (Pereaksi 2).
- c. Campuran 50 ml pereaksi 1 dengan 1 ml pereaksi 2 (dibuat hanya pada waktu akan digunakan, karena hanya stabil selama 1 hari). (Pereaksi 3)
- d. Pereaksi Folin Ciocalteu (pereaksi fenol) (pereaksi 4), dilarutkan dengan air 1:1 sebelum digunakan. Pereaksi ini dibuat dengan cara: dimasukkan 100 g natrium tungstat, 25 g natrium melibdat, 500 ml aquadest, 50 ml asam fosfat 85 % dan 100 ml HCL pekat ke dalam labu 2 liter. Campuran ini kemudian direfluks dengan hati-hati selama 10 jam dengan menggunakan kondenser. Sesudah didinginkan ditambahkan ke dalam labu 150 g litium sulfat, 50 ml aquadest dan beberapa tetes Br<sub>2</sub> (brom), pendidihan dilanjutkan lagi selama 10 menit dengan tanpa kondensor. Ini akan membantu menghilangkan kelebihan brom. Sesudah pendinginan volume larutan dijadikan 100 ml dan disaring jika perlu. Filtrat tidak boleh ada warna kehijauan, jika ada maka pendidihan harus dilakukan lagi. Ini merupakan "stock reagent", larutkan dengan air 1:1 sebelum digunakan.

- e. Larutan protein standar 0,25 mg/ml (larutan biovine serum pro-albumin).
- 4.2.2. Setelah larutan standar telah siap, maka tahap selanjutnya yaitu pembuatan kurva standar dengan cara sebagai berikut:
- a. Dimasukkan ke dalam tabung reaksi : 0 (blanko); 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 ml protein standar. Tambah air sampai volume total masing-masing pereaksi 4 ml ke dalam masing-masing tabung reaksi, tambahkan 5,5 ml pereaksi (3), campur merata dan biarkan selama 10-15 menit pada suhu kamar.
  - b. Ditambahkan 0,5 ml pereaksi (4) ke dalam masing-masing tabung reaksi, kocok merata dengan cepat sesudah penambahan.
  - c. Dibiarkan selama lebih kurang 30 menit sampai warna biru terbentuk.
  - d. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.
  - e. Dibuat kurva standar dari hasil absorbansinya.
- 4.2.3. Setelah kurva larutan standar tersedia, selanjutnya dipipet sampel 0,5 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian diperlakukan seperti cara kerja penetapan larutan standar.
- 4.2.4. Pengukuran absorbans dilakukan pada panjang gelombang 650 nm dan hasil dari absorbans sampel kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi yang telah di buat dengan excel.

### **4.3. Analisis Asam Amino (AOAC, 2005)**

Komposisi asam amino ditentukan dengan menggunakan HPLC. Sebelum digunakan, perangkat HPLC dibilas dahulu dengan eluen yang akan digunakan selama 2 – 3 jam. Syringe yang akan digunakan dibilas dengan akuades. Analisis asam amino dengan menggunakan HPLC terdiri atas 4 tahap, yaitu: pembuatan hidrolisat protein, pengeringan, derivatisasi dan injeksi serta analisis asam amino.

#### **4.3.1. Pembuatan Hidrolisat Protein**

Sampel ditimbang sebanyak 30 mg dan dihancurkan. Sampel yang telah hancur dihidrolisis asam menggunakan HCL 6 N sebanyak 1 ml yang kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 24 jam. Pemanasan dalam oven dilakukan untuk menghilangkan gas atau udara yang ada pada sampel agar tidak mengganggu kromatogram yang dihasilkan. Selain itu, pemanasan dilakukan untuk mempercepat reaksi hidrolisis.

#### 4.3.2. Pengeringan

Sampel yang telah dihidrolisis pada suhu kamar dipindahkan ke dalam labu evaporator 50 ml, dibilas dengan 2 ml HCL 0,01 N dan cairan bilasan dimasukkan ke dalam labu evaporator. Proses ini diulangi hingga 2-3 kali. Sampel kemudian dikeringkan menggunakan rotary evaporator selama 15-30 menit untuk mengubah sistein menjadi sistin. Sampel yang sudah kering ditambah dengan 5 ml HCL 0,01 N kemudian disaring dengan kertas saring milipore.

#### 4.3.3. Derivatisasi

Larutan derivatisasi sebanyak 30  $\mu$ L ditambahkan pada hasil pengeringan. Larutan derivatisasi dibuat dari larutan buffer kalium dengan sampel 1:1 kemudian dicampurkan dengan larutan Ortoftalaldehida (OPA) dengan perbandingan 5:1 dengan sampel, selanjutnya campuran tersebut disaring menggunakan kertas saring Whatman.

#### 4.3.4. Injeksi sampel

Hasil saringan sebanyak 5  $\mu$ L diinjeksikan ke dalam HPLC. Pemisahan semua asam amino ditunggu sampai selesai. Waktu yang diperlukan sekitar 25 menit. Perhitungan konsentrasi asam amino yang ada pada bahan dilakukan dengan pembuatan kromatogram standar dengan menggunakan asam amino standar yang mengalami perlakuan yang sama dengan sampel.

Kandungan asam amino dalam bahan dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{asam amino (\%)} = (\text{Luas area sampel} \times C \times Fp \times BM \times 100\%) / (\text{Luas area standar} \times \text{bobot sampel})$$

keterangan:

C = Konsentrasi standar asam amino (0,5  $\mu$ mol/mL)

FP = factor pengenceran (10 ml)

BM = Bobot molekul dari masing-masing asam amino (g/mol).

Kondisi alat HPLC saat berlangsung analisis asam amino sebagai berikut:

Temperatur	: 27°C (suhu ruang)
Jenis kolom HPLC	: Ultra teechspere (Colom C-18)
Kecepatan alir eluen	: 1 ml/menit
Tekanan	: 3000 psi
Fase gerak	: Buffer Na-Asetat dan methanol 95%
Detektor	: Fluoresensi

Panjang gelombang : 350-450 nm.

#### 4.4. Analisis Berat Molekul Pro-albumin Ikan

Bahan dan alat untuk analisis berat molekul pro-albumin ikan yaitu elektroforesis Verikal Elektroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra Cell), PowerPac™ Power Supply, Heat Block/Water Bath, Mikropipet Set + Tips, Microtube 1.5 ml, Gloves, Shaker, APS 10%, ddH<sub>2</sub>O/aquades, Laemmli sample buffer, β-mercaptoethanol, Acrylamide/Bis, Running Buffer Tris-Glycine-SDS, SDS, Tris-HCL, Coomasie Brilliant Blue Staining Solution, Coomasie Destaining Solution, TEMED, Sampel Protein, Marker Protein dan Membran PVDF.

Prosedur kerja:

##### 4.4.1. *Sample Assesment*

Dibuat sampel buffer dengan cara mencampur Laemmli sample buffer yang sudah ditambahkan β-mercaptoetanol (50 μl β-mercaptoetanol + 950 μl Laemmli sample buffer). Dicampurkan sampel buffer 500 uL dengan sampel 500 uL (ratio 1 : 1). Selanjutnya, protein yang sudah ditambahkan Laemmli sample buffer dipanaskan dalam water bath 85°C selama 5 menit.

##### 4.4.2. Pembuatan Gel SDS-PAGE

Disiapkan alat yang akan digunakan untuk mencetak gel seperti *spacer plate*, *short plate*, dan *casting gel system*. Dirakit alat untuk membuat gel, dengan memasukkan *spacer dan short plate* pada *casting gel* secara merata untuk menghindari kebocoran. Mula-mula dibuat larutan gel pemisah (*separating gel*) 12% sebagai berikut: dimasukkan 6 mL stock 30% akrilamide/Bis ke dalam tabung/ botol 50 ML. Lalu ditambahkan 3,75 mL 1.5M tris pH 8.8 kemudian dikocok perlahan menggunakan *shaker*. Selanjutnya ditambahkan aquabides 5,03 mL, lalu dikocok perlahan kembali.

Ditambahkan 150 uL 10% SDS (sodium dodesil sulfat), dikocok menggunakan *shaker* kembali. Lalu dimasukkan 75 uL 10% APS (Amonium persulfat) ditambahkan Temed 7.5 uL, dan dikocok kembali. Segera dituangkan kedalam cetakan, ditunggu hingga ± 30 menit. Dibuat larutan untuk *stacking gel* 4%, sebagai berikut: dimasukkan 0.99 mL 30% Akrilamide/bis ke dalam tabung. Ditambahkan 1.89 mL 0.5M tris pH 6.8, dikocok perlahan menggunakan *shaker*. Selanjutnya ditambahkan aquabides 4.5 mL, dikocok perlahan kembali. Lalu ditambahkan 75 uL 10% SDS (sodium dodesil sulfat), dan dikocok kembali menggunakan *shaker*. Selanjutnya dimasukkan 40 uL 10% APS (Amonium persulfat) ditambahkan Temed 7.5 uL, lalu dikocok

menggunakan *shaker* kembali. Campuran tersebut segera dituangkan di atas *separating gel* dipasang *comb*, dan tunggu hingga gel memadat. Setelah gel membeku, gel siap digunakan untuk proses SDS-PAGE.

#### 4.4.3. Running SDS-PAGE

Dimasukkan gel ke dalam *chamber* yang terdapat pada mini protean tetra cell, ditambahkan *running buffer* kemudian *comb* dibuka. Sample protein dan marker dimasukkan ke dalam sumur/well. Setelah marker protein dan sample protein dimasukkan, *chamber* mini protean tetra cell ditutup. Dihubungkan kabel mini protean tetra cell dengan power supply. Dilakukan *running gel* pada 100-120 V, selama 60-90 menit. Setelah selesai, power supply dimatikan lalu kaca yang mengandung gel diangkat kemudian gel dikeluarkan menggunakan pembuka gel yang sudah disediakan. Untuk verifikasi hasil SDS-PAGE dapat dilakukan dengan proses pewarnaan dengan coomasie blue atau menggunakan coomassie Bio-Safe. Setelah proses pewarnaan dilakukan langkah *destaining*/pencucian gel. Untuk penggunaan coomasie blue digunakan larutan *destaining* dengan komposisi: Methanol 100 mL, Asam asetat glasial 100 mL, Aquades 800 mL. Untuk penggunaan coomasie bio safe bisa menggunakan aquades. Setelah itu visualisasi bisa dilakukan langsung tanpa menggunakan *imaging system*.

### 5. Maksimalisasi Hasil Ekstraksi Pro-albumin Ikan

Tahapan kedua dalam penelitian ini yaitu maksimalisasi hasil ekstraksi pro-albumin. Metode yang digunakan dalam maksimalisasi hasil ekstraksi pro-albumin yaitu metode eksperimental. Penelitian dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan 2 faktor yaitu konsentrasi NaCl dalam pelarut (F) dan suhu ekstraksi (M). Faktor pertama (F) terdiri atas 7 taraf konsentrasi NaCl yaitu F1=0%, F2=0,2%, F3= 0,4%, F4=0,6%, F5= 0,8%, F6= 1,0% dan F7=1,2%. Faktor kedua (M) terdiri atas 7 taraf yaitu M1=30°C, M2=35°C, M3=40°C, M4=45°C, M5=50°C, M6=55°C dan M7=60°C. Berdasarkan dua faktor tersebut, maka terdapat 49 kombinasi perlakuan seperti pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Pelarut NaCl dan Suhu

No.	Perlakuan	Keterangan
1.	F1M1	Konsentrasi pelarut NaCl 0% dan suhu 30 <sup>0</sup> C
2.	F1M2	Konsentrasi pelarut NaCl 0% dan suhu 35 <sup>0</sup> C
3.	F1M3	Konsentrasi pelarut NaCl 0% dan suhu 40 <sup>0</sup> C
4.	F1M4	Konsentrasi pelarut NaCl 0% dan suhu 45 <sup>0</sup> C

5.	F1M5	Konsentrasi pelarut NaCl 0% dan suhu 50 <sup>0</sup> C
6.	F1M6	Konsentrasi pelarut NaCl 0% dan suhu 55 <sup>0</sup> C
7.	F1M7	Konsentrasi pelarut NaCl 0% dan suhu 60 <sup>0</sup> C
<b>8.</b>	<b>F2M1</b>	<b>Konsentrasi pelarut NaCl 0,2% dan suhu 30<sup>0</sup>C</b>
9.	F2M2	Konsentrasi pelarut NaCl 0,2% dan suhu 35 <sup>0</sup> C
10.	F2M3	Konsentrasi pelarut NaCl 0,2% dan suhu 40 <sup>0</sup> C
11.	F2M4	Konsentrasi pelarut NaCl 0,2% dan suhu 45 <sup>0</sup> C
12.	F2M5	Konsentrasi pelarut NaCl 0,2% dan suhu 50 <sup>0</sup> C
13.	F2M6	Konsentrasi pelarut NaCl 0,2% dan suhu 55 <sup>0</sup> C
14.	F2M7	Konsentrasi pelarut NaCl 0,2% dan suhu 60 <sup>0</sup> C
<b>15.</b>	<b>F3M1</b>	<b>Konsentrasi pelarut NaCl 0,4% dan suhu 30<sup>0</sup>C</b>
16.	F3M2	Konsentrasi pelarut NaCl 0,4% dan suhu 35 <sup>0</sup> C
17.	F3M3	Konsentrasi pelarut NaCl 0,4% dan suhu 40 <sup>0</sup> C
18.	F3M4	Konsentrasi pelarut NaCl 0,4% dan suhu 45 <sup>0</sup> C
19.	F3M5	Konsentrasi pelarut NaCl 0,4% dan suhu 50 <sup>0</sup> C
20.	F3M6	Konsentrasi pelarut NaCl 0,4% dan suhu 55 <sup>0</sup> C
21.	F3M7	Konsentrasi pelarut NaCl 0,4% dan suhu 60 <sup>0</sup> C
<b>22.</b>	<b>F4M1</b>	<b>Konsentrasi pelarut NaCl 0,6% dan suhu 30<sup>0</sup>C</b>
23.	F4M2	Konsentrasi pelarut NaCl 0,6% dan suhu 35 <sup>0</sup> C
24.	F4M3	Konsentrasi pelarut NaCl 0,6% dan suhu 40 <sup>0</sup> C
25.	F4M4	Konsentrasi pelarut NaCl 0,6% dan suhu 45 <sup>0</sup> C
26.	F4M5	Konsentrasi pelarut NaCl 0,6% dan suhu 50 <sup>0</sup> C
27.	F4M6	Konsentrasi pelarut NaCl 0,6% dan suhu 55 <sup>0</sup> C
28.	F4M7	Konsentrasi pelarut NaCl 0,6% dan suhu 60 <sup>0</sup> C
<b>29.</b>	<b>F5M1</b>	<b>Konsentrasi pelarut NaCl 0,8% dan suhu 30<sup>0</sup>C</b>
30.	F5M2	Konsentrasi pelarut NaCl 0,8% dan suhu 35 <sup>0</sup> C
31.	F5M3	Konsentrasi pelarut NaCl 0,8% dan suhu 50 <sup>0</sup> C
32.	F5M4	Konsentrasi pelarut NaCl 0,8% dan suhu 55 <sup>0</sup> C
33.	F5M5	Konsentrasi pelarut NaCl 0,8% dan suhu 60 <sup>0</sup> C
34.	F5M6	Konsentrasi pelarut NaCl 0,8% dan suhu 65 <sup>0</sup> C
35.	F5M7	Konsentrasi pelarut NaCl 0,8% dan suhu 70 <sup>0</sup> C
<b>36.</b>	<b>F6M1</b>	<b>Konsentrasi pelarut NaCl 1,0% dan suhu 30<sup>0</sup>C</b>
37.	F6M2	Konsentrasi pelarut NaCl 1,0% dan suhu 35 <sup>0</sup> C
38.	F6M3	Konsentrasi pelarut NaCl 1,0% dan suhu 40 <sup>0</sup> C
39.	F6M4	Konsentrasi pelarut NaCl 1,0% dan suhu 45 <sup>0</sup> C
40.	F6M5	Konsentrasi pelarut NaCl 1,0% dan suhu 50 <sup>0</sup> C
41.	F6M6	Konsentrasi pelarut NaCl 1,0% dan suhu 55 <sup>0</sup> C



42.	F6M7	Konsentrasi pelarut NaCl 1,0% dan suhu 60 <sup>0</sup> C
<b>43.</b>	<b>F7M1</b>	<b>Konsentrasi pelarut NaCl 1,2% dan suhu 30<sup>0</sup>C</b>
44.	F7M2	Konsentrasi pelarut NaCl 1,2% dan suhu 35 <sup>0</sup> C
45.	F7M3	Konsentrasi pelarut NaCl 1,2% dan suhu 40 <sup>0</sup> C
46.	F7M4	Konsentrasi pelarut NaCl 1,2% dan suhu 45 <sup>0</sup> C
47.	F7M5	Konsentrasi pelarut NaCl 1,2% dan suhu 50 <sup>0</sup> C
48.	F7M6	Konsentrasi pelarut NaCl 1,2% dan suhu 55 <sup>0</sup> C
49.	F7M7	Konsentrasi pelarut NaCl 1,2% dan suhu 60 <sup>0</sup> C

Setiap kombinasi perlakuan tersebut diberikan ulangan sebanyak 3 kali sehingga terdapat 147 satuan percobaan dengan perlakuan tanpa pemanasan dan dengan pemanasan menggunakan waterbath selama 30 menit.

## 6. Pembuatan Makanan Pendamping Air Susu Ibu (MP-ASI) Biskuit yang Mengandung Pro-albumin Ikan

Tahap ketiga dalam penelitian ini yaitu pembuatan biskuit ber pro-albumin dari hasil ekstrak ikan yang memiliki kandungan pro-albumin tertinggi.

### 6.1. Pembuatan MP-ASI Biskuit Ber-pro-albumin Ikan

Komposisi bahan dan takaran pembuatan biskuit pada penelitian ini ditampilkan pada Tabel 2.2 berikut:

**Tabel 2.2. Formula MP-ASI Biskuit yang Mengandung Pro-albumin Ikan**

Komposisi Bahan	Berat Bahan (g)
Tepung Terigu	54
<b>Tepung Pro-albumin Ikan</b>	<b>5</b>
Tepung Ikan non Pro-albumin	15
Gula Halus	10
Susu Skim	5
Kuning Telur	5
Margarin	5
Vanili	1

Tahapan pembuatan biskuit pada penelitian ini mengacu pada penelitian Aini (2014), dengan sedikit modifikasi. Tahap pertama dalam pembuatan biskuit adalah margarin diaduk dengan kecepatan sedang, kemudian dimasukan gula halus. Setelah tercampur rata dimasukan kuning telur lalu dikocok dengan kecepatan tinggi. Setelah warna adonan

berubah menjadi kuning pucat, ditambahkan vanili. Selanjutnya tepung terigu, tepung ikan, tepung pro-albumin dan susu skim dimasukkan ke dalam adonan lalu diaduk sampai kalis.

Untuk menghasilkan biskuit yang berkualitas, pengadukan tepung terigu dilakukan tidak terlalu lama atau kurang. Pengadukan yang terlalu lama menurut Manley (1998) dapat memungkinkan pembentukan matriks gluten, sebaliknya menurut Sunaryo (1985) jika waktu pengadukan kurang maka adonan akan kurang menyerap air sehingga adonan kurang elastis. Proses berikutnya adalah proses pemipihan dan pencetakan. Adonan digiling menggunakan rolling pin menjadi lembaran. Pemipihan adonan dilakukan berulang-ulang. Menurut Sunaryo (1985) pelempengan atau pemipihan adonan harus dilakukan berulang-ulang agar lembaran yang dihasilkan halus dan kompak. Setelah berbentuk lembaran adonan dicetak dengan ketebalan dan berat yang seragam yaitu 0.4 cm dan berat 5 g. Tujuan adonan dicetak seragam, agar saat biskuit dipanggang didalam oven dapat matang secara merata dan tidak hangus (Sultan 1992).

Tahap selanjutnya adalah pemanggangan biskuit menggunakan oven. Pemanggangan dilakukan selama 20 menit dengan suhu 150°C. Menurut Matz (1992), suhu dan waktu pemanggangan di dalam oven tergantung pada jenis oven dan jenis produk. Menurut Sunaryo (1985) semakin tinggi gula dan lemak dalam suatu adonan, biskuit dapat dipanggang pada suhu yang lebih tinggi.

Biskuit menggunakan margarin yang banyak sehingga suhu pemanggangan yang digunakan adalah 150°C. Pada proses pemanggangan kadar air adonan berkurang dari 20% menjadi kurang dari 5%, sehingga terjadi penyusutan berat pada biskuit yang telah dipanggang.

### **6.1.1. Parameter Pengamatan Biskuit yang Mengandung Pro-albumin Ikan**

#### **1. Analisis Asam Amino**

##### Preparasi Sampel

Sampel ditimbang  $\pm 2,5$  g dimasukkan ke dalam tabung ulir 50 mL. Ditambahkan HCl 6N sebanyak 20 ml. Selanjutnya dihidrolisis dalam autoclave suhu 110 °C selama 12 jam lalu dinetralkan dengan NaOH 6N sampai 100 mL. Saring dengan filter 0,22  $\mu$ M. diencerkan 5x dengan H<sub>2</sub>O lalu diinjeksikan ke LCMS 5  $\mu$ L.

#### **2. Analisis Asam Lemak Jenuh Dan Tidak Jenuh**

##### 2.1. Hidrolisis

Sampel diambil sebanyak 5-10 gram ditambahkan 10 ml HCl pekat, dipanaskan pada *waterbath* suhu 80°C dilanjutkan sampai mendidih

selama 3 jam, lalu didinginkan dengan 25 ml diethyl ether dan petroleum ether (1:1), dikocok dengan Vortex kemudian dидiamkan sampai mengendap, lalu ambil lapisan atas sebagai minyak, diuapkan dalam *waterbath* dengan bantuan gas N<sub>2</sub>.

## 2.2. Metilasi

Sebanyak 0,5 mL sampel diambil, ditambahkan 1,5 mL larutan Natrium metanolik, ditutup dan dipanaskan pada suhu 60<sup>0</sup>C selama 5-10 menit sambil digojok. Selanjutnya didinginkan, ditambahkan 2 mL Boron trifluoride metanoat, panaskan pada suhu 60<sup>0</sup>C selama 5-10 menit lalu didinginkan. Ekstrak ditambahkan dengan 1 mL Heptan dan 1 mL NaCl jenuh diambil lapisan atas dan masukkan ke dalam pipet Eppendorf. Lalu diinjeksikan ke sebanyak 1µL pada GC Agilent 7890B.