

## VALIDASI METODE ANALISIS PROTEIN DALAM SUSU CAIR KEMASAN SECARA SPEKTROFOTOMETRI

Leny Irawati<sup>1</sup>, \* Achmad Zubair, S.T., M.T.<sup>2)</sup>  
<sup>1,2)</sup> PLP Muda Politeknik Negeri Ujung Pandang, Makassar

### ABSTRACT

The determination of protein content in packaged liquid milk can be analyzed by using spectrophotometry visible. This method is a non-standard method so before being used in the laboratory this method needs to be validated. In this research, the validation of the protein analysis method in packaged liquid milk was carried out by spectrophotometry based on the parameters of linearity, precision, accuracy, the limit of detection, and the limit of quantitation. Linearity was determined by measuring the absorbance standard of Bovin Serum Albumin (BSA) in the range of 0 - 25 mg/L. Precision was determined by calculating the coefficient of variation (% RSD) of the protein content measurement results for seven replications. Accuracy is determined based on the results of recovery (% Recovery) using the standard addition method, while the Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantity (LoQ) are determined by measuring the absorbance of the blank solution. The results showed that the method had a linearity that met the acceptability requirements, with correlation coefficient ( $r$ ) = 0.9986, and the precision of the method was acceptable with the %RSD value  $< 2/3$  CV Horwitz. In determining the accuracy, the %Recovery value is obtained between 94,63 % - 102.23%, this value has met the acceptability requirements according to the AOAC table, which is 80-120%. From these results, it can be concluded that the spectrophotometric method can be used in the laboratory as an alternative to the Kjeldahl method for determining protein content in packaged liquid milk.

**Keywords:** *Protein Determination, Package milk, Spectrophotometry, Methode validation*

### ABSTRAK

Penentuan kadar protein dalam susu cair kemasan dapat dilakukan secara spektrofotometri visible. Metode ini merupakan metode nonstandar sehingga sebelum digunakan di laboratorium metode ini perlu di validasi. Pada penelitian ini dilakukan validasi metode analisis protein dalam susu cair kemasan secara spektrofotometri berdasarkan parameter linieritas, presisi, akurasi, limit deteksi dan limit kuantitasi. Linieritas ditentukan dengan cara mengukur absorbansi standar Bovin Serum Albumin (BSA) pada rentang 0 - 25 mg/L. Presisi ditentukan dengan menghitung koefisien variasi (%RSD) hasil pengukuran kadar protein sebanyak tujuh kali ulangan. Akurasi ditentukan berdasarkan hasil perolehan kembali (%Recovery) menggunakan metode adisi standar, sedangkan Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ) ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan blanko. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode memiliki linieritas yang memenuhi syarat keberterimaan yaitu koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,9986, Presisi metode dapat diterima dengan nilai %RSD  $< 2/3$  CV Horwitz. Pada penentuan akurasi, diperoleh nilai %Recovery antara 94,63 % - 102,23 %, nilai ini telah memenuhi syarat keberterimaan menurut tabel AOAC yaitu 80-120%. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa metode spektrofotometri dapat digunakan di laboratorium sebagai alternatif selain metode Kjeldahl untuk menentukan kadar protein dalam susu cair kemasan.

**Kata kunci:** *Penentuan protein, Susu kemasan, Spektrofotometri, Validasi metode*

### 1. PENDAHULUAN

Dalam rangka mendukung pelaksanaan kegiatan Tridarma Perguruan Tinggi yaitu Pendidikan, Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, dibutuhkan sarana pendukung yang memadai. Salah satu sarana pendukung yang sangat penting adalah tersedianya laboratorium dengan peralatan yang lengkap. Agar penelitian dosen dan mahasiswa dapat menghasilkan data yang valid dan dapat dipercaya, peralatan laboratorium yang digunakan harus terkalibrasi, yang dioperasikan oleh personil laboratorium yang memiliki kompetensi dan telah tersertifikasi, serta menggunakan metode yang tervalidasi.

Untuk menghasilkan metode yang tervalidasi, dilakukan serangkaian percobaan di laboratorium terhadap setiap metode uji sebelum digunakan di laboratorium. Menurut Kalra (2011) Validasi Metode adalah suatu proses yang digunakan untuk mengkonfirmasi bahwa prosedur analisis yang digunakan untuk suatu uji tertentu telah sesuai peruntukannya. Hasil dari validasi metode dapat digunakan untuk menilai kualitas dan

---

\* Korespondensi penulis: Irawati L, email [irawatileny@gmail.com](mailto:irawatileny@gmail.com)

konsistensi hasil analisis [1]. Sedangkan menurut Harmita, Validasi Metode Analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya [2]. Validasi Metode diperlukan karena suatu metode analisis dapat memberikan hasil yang berbeda jika dilakukan oleh laboratorium yang berbeda. Hal tersebut disebabkan karena adanya perbedaan lingkungan kerja, waktu, tempat, peralatan, serta personil laboratorium yang mengerjakannya.

Terdapat beberapa protokol validasi yang dapat digunakan sebagai acuan antara lain ICH Q2R1 (2005), Eurachem Guide 2014-2019, AOAC International, USP 44, Indonesian Pharmacopeia VI (2020), British Pharmacopeia 2020, BSN SNI ISO 17025 – 2017. Protokol atau metode validasi tersebut mencakup skala nasional, regional dan internasional. Penggunaan protokol tersebut disesuaikan dengan kebutuhan laboratorium pengujian. Sebagai contoh untuk Balai BPOM di Indonesia akan menggunakan Indonesian Pharmacopeia sedangkan untuk laboratorium pengujian lainnya akan merujuk pada BSN SNI ISO 17025 – 2017.

Untuk laboratorium pendidikan, pemilihan metode sangat tergantung pada ketersediaan bahan-bahan yang akan digunakan, terutama bahan acuan standar bersertifikat yaitu, CRM, SRM ataupun bahan acuan lainnya. Kegiatan Validasi Metode, diawali dengan persiapan alat dan bahan, serta seleksi parameter validasi yang akan dilakukan. Pada penelitian ini parameter validasi yang akan dilakukan adalah linieritas, presisi, akurasi, limit deteksi dan Limit kuantitasi. Metode yang akan di validasi pada penelitian ini adalah metode nonstandar Analisis Protein menggunakan spektrofotometer, yang bersumber dari Buku Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif. Penulis Dr. Ir. Rina Yenrina, M.Si. Cetakan Andalas University Press tahun 2015, halaman 73, ISBN: 978-602-6953-05-06 [3].

Pemilihan metode ini sebagai alternatif terhadap metode analisis protein secara Kjeldahl yang membutuhkan waktu lama dan menggunakan bahan habis pakai yang cukup banyak. Pada metode Kjeldahl, analisis protein membutuhkan beberapa tahapan antara lain destruksi, destilasi dan titrasi. Pada tahap destruksi, sampel dipanaskan menggunakan asam kuat di dalam lemari asam. Kemudian hasil destruksi dinetralkan hingga sedikit basa, menggunakan Natrium hidroksida konsentrasi tinggi. Setelah itu didestilasi dan terakhir dititrasi menggunakan asam encer. Sedangkan untuk metode spektrofotometer dapat dilakukan dalam waktu relatif singkat. Sampel diubah menjadi asam amino kemudian direaksikan dengan pereaksi biuret atau reagen folin ciocalteau hingga terbentuk warna biru yang dapat diukur intensitasnya menggunakan spektrofotometer sinar tampak.

## 2. METODE PENELITIAN

### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Laboratorium Analisis Pangan dan Laboratorium Analitik Instrumen Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang, pada bulan Juni hingga Oktober 2022.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian ini yaitu seperangkat alat-alat gelas, mikro pipet, *sentrifuge*, oven dan Spektrofotometer *UV- VIS* beserta kuvetnya.

Bahan yang digunakan antara lain *Bovin Serum Albumin* (Sigma Aldrich), Na K Tartrat Tetrahidrat (Merck),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck), NaOH (Merck),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck), *Folin Ciocalteau* (Merck), akuades dan kertas saring.

### Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan beberapa parameter validasi antara lain (1) Penentuan Linieritas, (2) Penentuan Presisi (3) Penentuan Akurasi/Persen Recovery (4) Penentuan Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi.

Untuk penentuan Linieritas, beberapa larutan standar BSA dengan konsentrasi berbeda (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15, 20,0 dan 25,0 mg /L) ditambahkan pereaksi C dan D kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal. Absorbansi masing-masing larutan standar dibaca untuk membuat kurva kalibrasi standar BSA. Kemudian dihitung nilai slope, intersep, dan nilai korelasi. Untuk masing-masing standar dilakukan 7 kali ulangan pembacaan.

Pada penentuan presisi (*repeatability*) dilakukan pengujian pada contoh uji sebanyak 7 kali ulangan. Kemudian ditentukan %RSD dan nilai 2/3 CV Horwitz untuk mengetahui keberterimaan presisi metode. Akurasi

ditentukan sebagai % Recovery standar (spike) yang ditambahkan terhadap sampel. Konsentrasi spike sampel (A), konsentrasi sampel (B) dan konsentrasi spike (C). Akurasi (Persen recovery) dihitung sebagai  $[(A-B)/C] \times 100\%$ . Pengukuran dilakukan sebanyak tujuh kali ulangan. Dan syarat keberterimaan mengacu pada tabel AOAC.

Limit deteksi dan limit kuantitasi dihitung berdasarkan standar deviasi pembacaan blanko sampel yang dilakukan sebanyak tujuh kali ulangan.

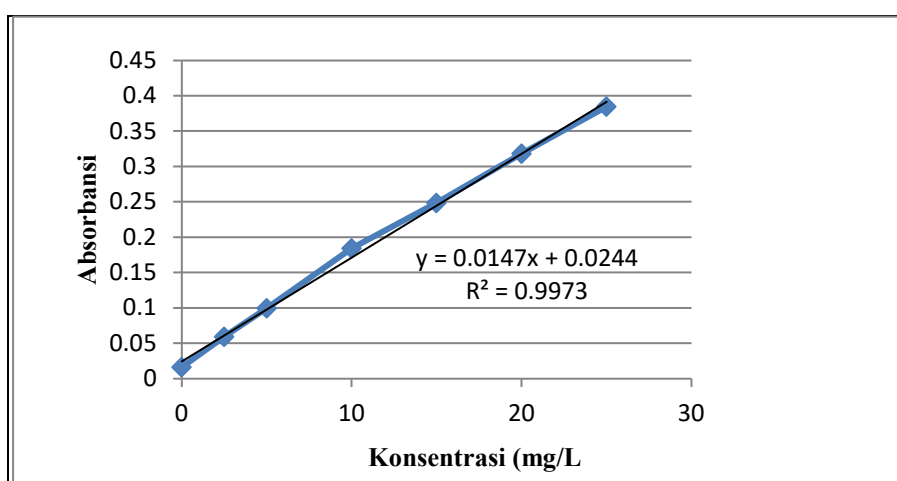
$$\text{LOD} = X + 3\text{SD}$$

$$\text{LOQ} = X + 10\text{SD}$$

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Penentuan Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis untuk memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel [2]. Pada penelitian ini linieritas ditetapkan dengan mengukur pembacaan absorbansi deret standar. Deret standar yang digunakan adalah Larutan deret standar BSA dengan konsentrasi 0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15, 20,0 dan 25,0 mg/L. Hasil pembacaan konsentrasi larutan standar disajikan dalam bentuk kurva standar pada gambar 1.



Gambar 1. Kurva Kalibrasi BSA

Berdasarkan perhitungan statistik regresi linear diperoleh nilai koefisien korelasi (r) untuk BSA yaitu 0,9986 dengan persamaan garis  $y = 0,014x + 0,024$ . Hal ini menunjukkan bahwa analisis protein menggunakan metode spektrofotometer memiliki linearitas yang baik, karena telah memenuhi syarat kriteria keberterimaan yaitu  $r \leq 0,995$ . Dari hasil pengujian linieritas, diperoleh koefisien korelasi (r) sebesar 0.9986. Nilai koefisien korelasi yang diperoleh ini lebih besar dari persyaratan, yaitu 0.995. Hal ini menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi dan absorbansi berbanding lurus dimana semakin besar konsentrasi, semakin besar pula absorbansinya. Kurva standar BSA dengan nilai (r) yang lebih baik dihasilkan oleh Sung Kim *et al*, sebesar 0,9992 dengan konsentrasi standar 0, 25, 50, 75 dan 100 mg/L. [4]

#### Penentuan Presisi

Presisi merupakan kedekatan antara hasil pengukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian dari hasil uji individual yang diukur melalui penyebaran rata-rata apabila analisis dilakukan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku/standar deviasi (SD) dan Simpangan baku relatif (RSD). Presisi tidak harus berhubungan dengan kedekatan terhadap nilai benar (*true value*) [5]. Syarat keberterimaan presisi adalah jika CV analisis < CV Horwitz. Data untuk pengukuran presisi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data Pengukuran Presisi Metode

Ulangan	Absorbansi	Konsentrasi Protein (mg/L)	Kadar protein (%)
1	0,112	6,2857	3,1429
2	0,113	6,3571	3,1786
3	0,112	6,2857	3,1429
4	0,112	6,2857	3,1429
5	0,110	6,1429	3,0714
6	0,111	6,2143	3,1071
7	0,111	6,2143	3,1071
Rata-rata			3,1276
SD			0,0349
%RSD			1,11

Syarat keberterimaan untuk presisi metode adalah jika %RSD < 2/3 CV Horwitz, di mana nilai CV Horwitz =  $2^{(1-0,5 \times \log C)}$ . Pada penelitian ini 1,11 < 2,25735106 sehingga presisi metode ini dapat diterima.

### Penentuan Akurasi

Akurasi merupakan kedekatan antara nilai hasil uji dengan nilai sebenarnya. Terdapat beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mengevaluasi akurasi metode, antara lain 1) Uji Perolehan Kembali (Recovery), (2) Uji relatif terhadap metode baku dan (3) Uji terhadap Standar Reference Material (SRM). Pada penelitian ini Akurasi ditentukan sebagai % Recovery standar (*spike*) yang ditambahkan terhadap sampel (adisi standar). Konsentrasi *spike* - sampel (A), konsentrasi sampel (B) dan konsentrasi *spike* (C). Persen recovery dihitung sebagai:

$$[(A-B)/C \times 100\%]$$

Syarat keberterimaan mengacu pada tabel AOAC. Data pengukuran recovery disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Recovery

Ulangan	Konsentrasi Spike-Sampel	Konsentrasi Sampel	Konsentrasi Spike	%Recovery
1	0,0932	0,0317	0,065	94,63736
2	0,0982	0,0317	0,065	102,3297
3	0,0954	0,0317	0,065	97,93407
4	0,0961	0,0317	0,065	99,03297
5	0,0939	0,0317	0,065	95,73626
6	0,0946	0,0317	0,065	96,83516
7	0,0964	0,0317	0,065	99,58242
Rata-rata				98,01256

Seperti yang terlihat pada Tabel 2, %Recovery yang dihasilkan adalah 98,01256 sehingga Akurasi metode dapat diterima sesuai syarat keberterimaan menurut tabel AOAC adalah 90%-107%. Sedangkan nilai akurasi untuk validasi metode Lowry pada penelitian Sung Kim *et al* (2006) sebesar 85-112 [4]. Nilai ini berada diluar rentang Tabel AOAC.

### Limit Deteksi (LoD) dan Limit Kuantitas (LoQ)

LoD adalah batas konsentrasi terkecil yang dapat terdeteksi namun tidak perlu dikuantifikasikan. Sedangkan LoQ adalah nilai minimum konsentrasi dengan nilai presisi yang dapat diterima oleh metode.[6]. LoD ditentukan dengan mengukur konsentrasi blanko sebanyak tujuh kali ulangan. LoD adalah  $X+3SD$  sedangkan LoQ adalah  $X+10SD$ . Apabila blanko tidak memberikan serapan, LoD dan LoQ ditentukan dengan mengukur standar yang terkecil. Uji LoD dan LoQ juga dapat dilakukan dengan cara dinyatakan dengan statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi, di mana respon instrumen “y” berhubungan linier dengan

konsentrasi “x”. Nilai LoD dinyatakan dengan 3 Sa/b, di mana Sa adalah standar deviasi dan b adalah slope. Untuk nilai LoQ dinyatakan dengan 10 Sa/b [7]. Data pengukuran LoD dan LoQ disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran LoD dan LoQ

Ulangan	Absorbansi	Konsentrasi BSA (mg/L)
1	0,033	0,6429
2	0,036	0,8571
3	0,035	0,7857
4	0,033	0,6429
5	0,034	0,7143
6	0,031	0,5000
7	0,032	0,5174
Rata-rata		0,6735
SD		0,1227
%RSD		18,22
LoD (X+3SD)		1,042
LoQ (X+10SD)		1,901

Nilai LoD yang diperoleh pada penelitian ini adalah 1,042 mg/L sedangkan nilai LoQ adalah 1,901 mg/L. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sung Kim *et al* (2006) yang juga menggunakan metode Lowry, nilai LoQ yang diperoleh sebesar 2,11 mg/L [4]. Nilai ini dapat dikatakan sama dengan hasil LoQ pada penelitian ini. Jika dibandingkan dengan LoD dan LoQ pada Validasi Metode Protein Metode Kjeldahl Susu bubuk yang dilakukan oleh Setiawati, dkk (2021) nilai LoD dan LoQ berturut-turut adalah 0,36% dan 0,42% [6]. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa Analisis Protein metode Lowry lebih sesuai digunakan untuk kandungan protein dalam jumlah yang kecil.

Hasil validasi metode dan syarat keberterimaan analisis protein pada susu cair kemasan dirangkum pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Validasi Metode Uji Analisis Protein Susu Cair Kemasan Menggunakan Metode Lowry

Parameter	Hasil	Syarat Keberterimaan	Diterima/Tidak
Linieritas	$r = 0,9986$	$r \leq 0,995$	Diterima
Presisi	%RSD=1,11 2/3 CV Horwitz=2,257	%RSD<2/3CV Horwitz	Diterima
Akurasi	%R 94,63-102,23	%R 90-107	Diterima
LoD	1,042 mg/L		Diterima
LoQ	1,901 mg/L		Diterima

#### 4. KESIMPULAN

Dari perolehan data pada validasi metode analisis dapat disimpulkan bahwa metode analisis protein secara spektrofotometer dapat digunakan sebagai alternatif untuk penentuan protein dalam susu cair kemasan. Hal ini dibuktikan dengan syarat keberterimaan telah terpenuhi untuk setiap parameter validasi yaitu linieritas, presisi, akurasi, LoD dan LoQ.

#### 5. DAFTAR RUJUKAN

- [1] Kalra, K., “Method Development and Validation of Analytical Procedures, Quality Control of Herbal Medicine and Related Areas”, 2011. Tersedia di <https://doi.org/10.5772/19894>.
- [2] Harmita, “Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya”, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. 1 No.3, hal 117-135, 2004.

- [3] Rina Yenrina, *Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif*. Andalas University Press, 2015, hal 73, ISBN: 978-602-6953-05-06
- [4] Sung Kim, H., *et al*, "Optimization of the Lowry Method of Protein Precipitation from the H. Influenzae Type b Conjugate Vaccine Using Deoxycholic Acid and Hydrochloric Acid", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Vol. 11 pp 215-222, 2006.
- [5] Torowati, dkk., "Validasi Metode Untuk Analisis Kandungan Uranium Menggunakan Potensiometer T-90", *Prosiding Seminar Penelitian Dan Pengelolaan Perangkat Nuklir*, hal 105-110, 9 Agustus 2016.
- [6] Setiawati, Tia A., Ida Nurfarida, Kikin Winangun, "Validasi Metode Analisis Protein Metode Kjeldahl Pada Susu Bubuk", *Prosiding Pengembangan Profesi Pranata Laboratorium Pendidikan*, Vol.1 hal 227-231, ISSN 2774-406X, 1 Januari 2021.
- [7] Napitupulu, Rona M., Dirgarini Julia, Aman Sentosa Panggabean, "Validasi Metode Penentuan Mn dalam Oli lubrikan Dengan Metode Pengenceran Langsung Menggunakan spektrofotometer Serapan Atom", *Indo J Chem. Res.*, Vol 6 No. 2 Hal 94-100, 2019.

## **6. UCAPAN TERIMA KASIH**

Ucapan terima kasih yang tak terhingga penulis haturkan kepada Direktur Politeknik Negeri Ujung Pandang dan kepada Kepala Pusat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Politeknik Negeri Ujung Pandang beserta tim penilai, yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian ini dengan dana yang bersumber dari PNBPNUP sehingga penelitian ini dapat terlaksana.