

### **Penentuan kadar protein terlarut**

Penentuan kadar protein terlarut dalam penelitian ini menggunakan cara Folin – Lowry dengan langkah- langkah yang pertama pembuatan reagensia larutan Lowry A yang terdiri A : 20g/1 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dalam 0,1 N NaOH, B : 20 g/1 KNa tarat, C: 10 g/1 CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O, kemudian dicampur dengan perbandingan A:B:C = 100:1:1. Setelah itu pembuatan larutan Lowry B yaitu dengan larutan Folin-Ciocalteau dan diencerkan dengan aquades dengan perbandingan 1:1. Kemudian selanjutnya pembuatan kurva standar dengan cara : menyiapkan larutan standar protein (Bovin Serum Albumin) dengan konsentrasi 20 mg/100 ml. Dibuat seri pengenceran hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 40, 80, 120, 160, dan 120 µg/ml. Selanjutnya menyiapkan tabung reaksi dan diisi 1 ml larutan standard dan sebagai blangko 1 ml aquades. Pada masing- masing tabung ditambah 5ml larutan Lowry A, divortek dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan larutan Lowry B 0,5 ml, dicampur hingga homogen dan dibiarkan 20-30 menit. Ditera absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Dibuat kurva standar dan persamaan regresinya untuk menentukan protein pada sampel.

Penentuan protein pada sampel dengan cara menyiapkan larutan sampel sebanyak 1 ml dan tambahkan 5 ml larutan Lowry A, Selanjutnya diperlukan sama pada pembuatan kurva standar. Protein dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standar yang diperoleh. (Sudarmaji, 1996). % protein terlarut bahan dihitung dengan rumus : konsentrasi gelombang spektrofotometer x faktor pengenceran / berat sampel x 1.000.000 x 100%.

### **Penentuan pencernaan protein *in vitro***

Kadar protein tercerna dianalisis dengan cara *in vitro* sesuai (Tanaka dkk., 1978 dalam Aji, 1989) yaitu: Menimbang sampel sejumlah 200 mg dilarutkan dalam 9 ml 0,1 N buferWalpole pH 2 dan ditambah 1 ml 2% enzim pepsin. Selanjutnya diinkubasikan dalam penangas air bergoyang pada temperatur 37oC selama 5 jam. Selanjutnya disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan sejumlah 5ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Trichloro asam asetat 20% sejumlah 5ml ditambahkan ke dalam supernatan lalu diinkubasikan pada temperatur kamar (antara 20 - 26°C) selama 15 jam. Selanjutnya disaring dengan kertas saring Whatman No.41. Nitrogen protein dalam filtrate dianalisis dengan Mikro Kjehldahl. Persen protein tercerna dihitung : (mg N dalam filtrat x 6,25 x 100%)/ (mg bahan x % protein bahan).