Indo. J. Chem. Sci. 14 (3) (2025)
Indonesian Journal of Chemical Science
http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs

Optimization of the Performance of a Microplate Type UV-Vis Spectrophotometer as a Protein Content Testing Instrument Based on Green Analytical Chemistry (GAC)

Martin Sulistyani[1]✉, F. Widhi Mahatmanti[1], Nuril Huda[1], dan Ridho Prasetyo[1,2]
[1]Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang.
[2]Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro
Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati Telp. (024)8508112 Semarang 50229

Info Artikel

Diterima : 07-08-2025

Disetujui : 17-11-2025

Dipublikasikan : 24-11-2025

Keywords:
Barium sulfat
Box Behnken Design
Response Surface Methodology,
Seng Klorida

Abstrak

Perkembangan teknologi laboratorium mendorong penerapan metode analisis yang lebih efisien dan ramah lingkungan, sejalan dengan prinsip *Green Analytical Chemistry* (GAC). Penelitian ini bertujuan mengoptimalkan kinerja spektrofotometer UV-Vis tipe mikroplate untuk analisis kandungan protein bahan pangan menggunakan metode Biuret. Metode ini didasarkan pada reaksi kompleks berwarna ungu antara reagen Biuret dan ikatan peptida dalam protein, dengan absorbansi yang sebanding terhadap konsentrasi protein. Tiga metode pengenceran diuji, yaitu mL-mikroplate, µL-mikroplate, dan mL-kuvet, dengan parameter evaluasi meliputi panjang gelombang maksimum, linearitas, dan akurasi. Ketiga metode menunjukkan panjang gelombang maksimum yang sama (562 nm), menandakan kestabilan sistem reaksi. Metode mL-kuvet memberikan nilai linearitas tertinggi (R^2 = 0,998), sementara mL-mikroplate menunjukkan akurasi terbaik (91,00%) dan hasil paling konsisten pada pengujian sampel tempe dan yoghurt. Di sisi lain, µL-mikroplate memberikan akurasi memadai (90,25%) dengan penggunaan reagen yang sangat hemat, mendukung prinsip GAC. Oleh karena itu, metode mL-mikroplate direkomendasikan sebagai metode utama untuk analisis protein berbasis spektrofotometri UV-Vis, dan metode µL-mikroplate sebagai alternatif ramah lingkungan yang efisien untuk aplikasi laboratorium modern.

Abstract

Advancements in laboratory technology have driven the adoption of more efficient and environmentally friendly analytical methods, in line with the principles of Green Analytical Chemistry (GAC). This study aims to optimize the performance of a microplate-based UV-Vis spectrophotometer for determining protein content in food samples using the Biuret method. The method is based on a colorimetric reaction between Biuret reagent and peptide bonds in proteins, forming a purple complex whose absorbance is proportional to protein concentration. Three dilution methods were evaluated: mL-microplate, µL-microplate, and mL-cuvette, based on parameters including maximum wavelength, linearity, and accuracy. All methods showed the same maximum absorbance wavelength (562 nm), indicating reaction stability. The mL-cuvette method achieved the highest linearity (R^2 = 0.998), while the mL-microplate method demonstrated the best accuracy (91.00%) and most consistent results in tempeh and yogurt samples. Meanwhile, the µL-microplate method offered acceptable accuracy (90.25%) with significantly reduced reagent volume, supporting the GAC approach. Therefore, the mL-microplate method is recommended as the primary technique for protein analysis using UV-Vis spectrophotometry, while the µL-microplate method provides an efficient and eco-friendly alternative for modern laboratory applications.

© 2025 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lantai 2 Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229
E-mail: martin@mail.unnes.ac.id

p-ISSN 2252-6951
e-ISSN 2502-6844

Pendahuluan

Perkembangan teknologi laboratorium telah membawa dampak yang signifikan terhadap instrumentasi pengujian di berbagai bidang ilmiah, termasuk biokimia, farmasi, teknologi pangan dan ilmu lingkungan (Bergquist & Turner, 2018). Inovasi dalam teknologi analitik tidak hanya meningkatkan akurasi dan kecepatan pengujian, tetapi juga mengintegrasikan prinsip-prinsip kimia hijau untuk mengurangi dampak lingkungan (Ganesh *et al*., 2021). Pendekatan ini dikenal sebagai *Green Analytical Chemistry* (GAC), yang berfokus pada penggunaan metode yang lebih ramah lingkungan dan efisien (Agrawal *et al*., 2021; Ganesh *et al*., 2021). Dalam beberapa tahun terakhir, kemajuan dalam alat-alat laboratorium yang lebih canggih, seperti Spektrofotometer UV-Vis (Ultraviolet-Visible) telah mengubah cara kita melakukan penelitian dan pengujian (Amekura, 2018; L.C. Passos & M.F.S. Saraiva, 2019). Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat analisis yang sangat penting dalam berbagai bidang, termasuk kimia (Sulistyani *et al*., 2023), biokimia (Mörschbächer *et al*., 2018; Wang *et al*., 2019), farmasi (Akash & Rehman, 2019), biologi (Ferreira *et al*., 2020), dan ilmu material (Malik *et al*., 2021; Pratiwi & Nandiyanto, 2022). Spektrofotometer UV-Vis adalah alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi atau transmitansi cahaya ultraviolet dan visible yang diserap oleh suatu larutan atau sampel. Prinsip dasar dari spektrofotometri UV-Vis melibatkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan materi pada panjang gelombang tertentu, yang memungkinkan analisis kuantitatif berbagai senyawa (Akash & Rehman, 2019; Amekura, 2018). Pemanfaatan spektrofotometer uv-vis dalam pengujian diantaranya untuk mengetahui kadar zat terlarut, mempelajari kinetika reaksi, identifikasi senyawa (Suhartati, 2017), pengujian kualitas air, pengujian farmasi, karakterisasi material dan pengujian protein dalam makanan.

Sejalan dengan program pemerintah dalam menyediakan makan siang bergizi, Laboratorium Kimia Universitas Negeri Semarang memiliki peran dalam pengembangan metode analisis kandungan bahan pangan. Laboratorium Kimia FMIPA UNNES memiliki spektrofotometer UV-Vis tipe microplate yang memiliki keunggulan penggunaan reagen dalam skala mikro, sehingga metode yang digunakan lebih efisien dan ramah lingkungan (sejalan dengan prinsip *green chemisty*) (Kreusch *et al*., 2003). Spektrofotometer UV-Vis tipe microplate juga telah dilakukan metode validasi dalam pengujian kandungan vitamin C (Sulistyani *et al*., 2023) dan antioksidan (Sulistyani *et al*., 2024). Hasil yang diperoleh menunjukkan kinerja yang optimum dan ketelitian yang sangat tinggi. Riset ini merupakan pengembangan instrument Spektrofotometer UV-Vis dalam analisis kandungan protein dengan reagen biuret.

Metode biuret merupakan salah satu teknik dalam menentukan kadar proten dalam suatu sampel. Metode ini didasarkan pada reaksi antara ikatan peptida dalam protein dengan reagen Biuret, yang menghasilkan kompleks berwarna ungu (Syauqi *et al*., 2018). ketika reagen Biuret (yang mengandung tembaga(II) sulfat) ditambahkan ke dalam larutan yang mengandung protein, ion tembaga akan bereaksi dengan ikatan peptida (C=O dan N-H) dalam protein, membentuk kompleks berwarna ungu(Langyan *et al*., 2022; Syauqi *et al*., 2018; Trang *et al*., 2021). Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi protein dalam larutan. Oleh karena itu, absorbansi dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang sekitar 500-650 nm (Aurand *et al*., 1987; Sudarmadji *et al*., 1984). Metode ini spesifik dalam analisis protein karena hanya ikatan peptida yang dapat bereaksi dengan reagen biuret. Metode ini juga merupakan metode yang sederhana dan cepat. Riset ini bertujuan untuk menganalisis optimalisasi kinerja spektrofotometer uv-vis tipe microplate sebagai instrumen pengujian kandungan protein dalam bahan pangan.

Metode

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam riset ini antara lain: Neraca analitik (O-Haus), Spektrofotometer UV-VIS*(Fluostar Omega BMG LabTech)*, Mikroplate kuarsa *(BMG Labtech 96),* botol gelap, *Hot plate* dan *stireer* (D Lab), Labu ukur 10 mL (pyrex), Labu Ukur 25 mL(pyrex), Mikropipet 100 mikroliter, pipet ukur(pyrex), pipet volume(pyrex), ball pipet, gelas beker, Tabung Sentrifugasi. Bahan yang digunakan antara lain: Tembaga(II) Sulfat Pentahidrat p.a (Merck), Natrium Kalium Tartrat p.a (Merck), Natrium Hidroksida p.a (Merck), kertas saring, Aquabidest, Etano Teknis, Kalium Dikromat, Aluminium Foil, Tissue.

Prosedur

1. **Persiapan Larutan NaOH 10%**
   Timbang NaOH sebanyak 50 gram dan masukkan ke dalam labu ukur 500 mL. Tambahkan aquabidest hingga tanda tera, kocok dan homogenkan.
2. **Pembuatan Reagen Biuret**
   Timbang Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat sebanyak 1,5 gram dan kalium natrium tartrat sebanyak 6 gram masukkan ke dalam labu ukur 500 mL. Tambahkan aquabidest hingga tanda tera, kocok dan homogenkan. Pindahkan larutan tersebut kedalam labu takar 1000 mL, tambahkan NaOH 10% sebanyak 300 mL. Tambahkan aquabidest hingga tanda tera, kocok dan homogenkan. Larutan ini bisa disimpan dalam jangka waktu yang lama.
3. **Pembuatan Larutan Induk Albumin (10 mg/mL)**
   Timbang albumin BSA sebanyak 100 mg masukkan kedalam labu ukur 10 mL tambahkan aquabidest hingga tanda tera. Homogenkan menggunakan vorteks.
4. **Pembuatan Larutan Standar Albumin**
   Pembuatan larutan standar albumin 1, 2, 3, 4 dan 5 mg/mL dilakukan dengan 2 metode untuk membandingkan hasil, Metode pembuatan larutan standar ditunjukkan pada Tabel berikut:

Tabel 1. Metode Pembuatan Larutan Standar Skala Mikroliter

Konsentrasi	Volume Larutan Induk BSA (µL)	Volume Aquabidest (µL)
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50

Tabel 2. Metode Pembuatan Larutan Standar Skala Mililiter

Konsentrasi	Volume Larutan Induk BSA (mL)	Volume Aquabidest (mL)
1	0,5	4,5
2	1	4
3	1,5	3,5
4	2	3
5	2,5	2,5

5. **Pembuatan Larutan Sampel**
   Sampel diambil sebanyak 0,5 gram, tambahkan aquabidest sebanyak 10 mL. Homogenkan. Pindahkan larutan sampel ke dalam tabung sentrifugase. Lakukan sentrifugase pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Ambil larutan supernatant untuk dilakukan analisis lebih lanjut.
6. **Persiapan Optimalisasi Instrumen Spektrofotometer UV-VIS**
   Instrumen Spektrofotometer UV-VIS tipe *microplate(Fluostar Omega BMG LabTech)* dihidupkan sesuai SOP dan ditunggu selama 30-60 menit untuk memastikan instrument siap untuk membaca sampel(Sulistyani *et al.*, 2023).
7. **Pengecekan Absorbansi *Microplate***
   Pastikan instrument spektrofotometer uv-vis sudah siap untuk membaca absorbansi sampel. Scan *microplate* kosong pada panjang gelombang 220-1000 nm. Catat absorbansi pada masing-masing *hole* (Sulistyani *et al.*, 2023).
8. **Penetapan Panjang Gelombang Maksimum dan Pengukuran Kandungan Protein pada Sampel**
   Masing-masing larutan dipipet dengan volume dan perbandingan yang ditunjukkan pada Tabel 3 dan 4 untuk skala mikroliter dan mililter

Tabel 3 Penyiapan Larutan Standar dan Sampel Skala Mikroliter

Konsentrasi (ppm)	Volume Larutan Standar (µL)	Volume Biuret (µL)	Total Volume (µL)
1	20	80	100
2	20	80	100
3	20	80	100
4	20	80	100
5	20	80	100
Sampel	20	80	100

Tabel 4 Penyiapan Larutan Standar dan Sampel Skala Mililiter

Konsentrasi (ppm)	Volume Larutan Standar (mL)	Volume Biuret (mL)	Total Volume (mL)
1	1	4	5
2	1	4	5
3	1	4	5
4	1	4	5
5	1	4	5
Sampel	1	4	5

Setelah direaksikan dengan biuret masing – masing larutan diinkubasi selama 15 dan 30 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 – 700 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum. Kemudian dibaca kembali sebanyak 10 kali replikasi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Hasil yang diperoleh kemudian di analisis.

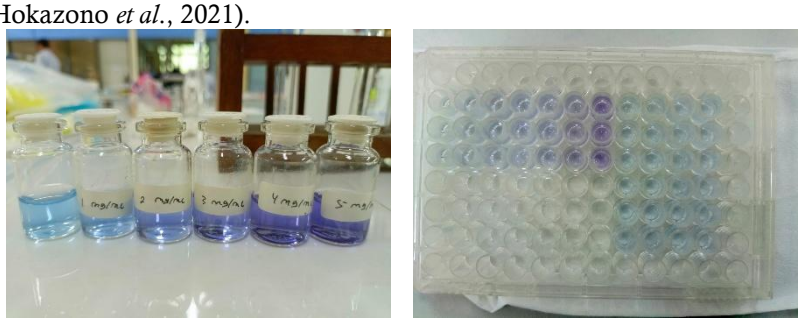
9. Pembuatan Larutan Kalium Dikromat 1%

Timbang 1 gram kalium dikromat, masukkan kedalam labu ukur 100 mL. Tambahkan aquabidest sampai tanda tera kocok dan Homogenkan. Larutan ini dugunakan sebagai larutan pencuci microplate setelah digunakan.

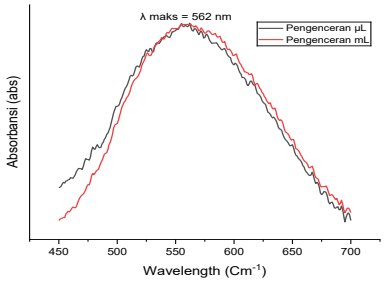
Hasil dan Pembahasan

Analisis Gelombang Maksimum

Spektrum absorbansi yang ditampilkan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa kedua metode pengenceran baik skala mikro (µL) maupun skala mL menghasilkan puncak serapan maksimum (λ maksimum) yang sama, yaitu pada 562 nm. Panjang gelombang ini merupakan karakteristik dari reaksi kompleks antara ion Cu^{2+} dan gugus peptida protein dalam metode Biuret yang menghasilkan kompleks berwarna ungu (Hokazono *et al.*, 2021).



(a) (b)



(c)

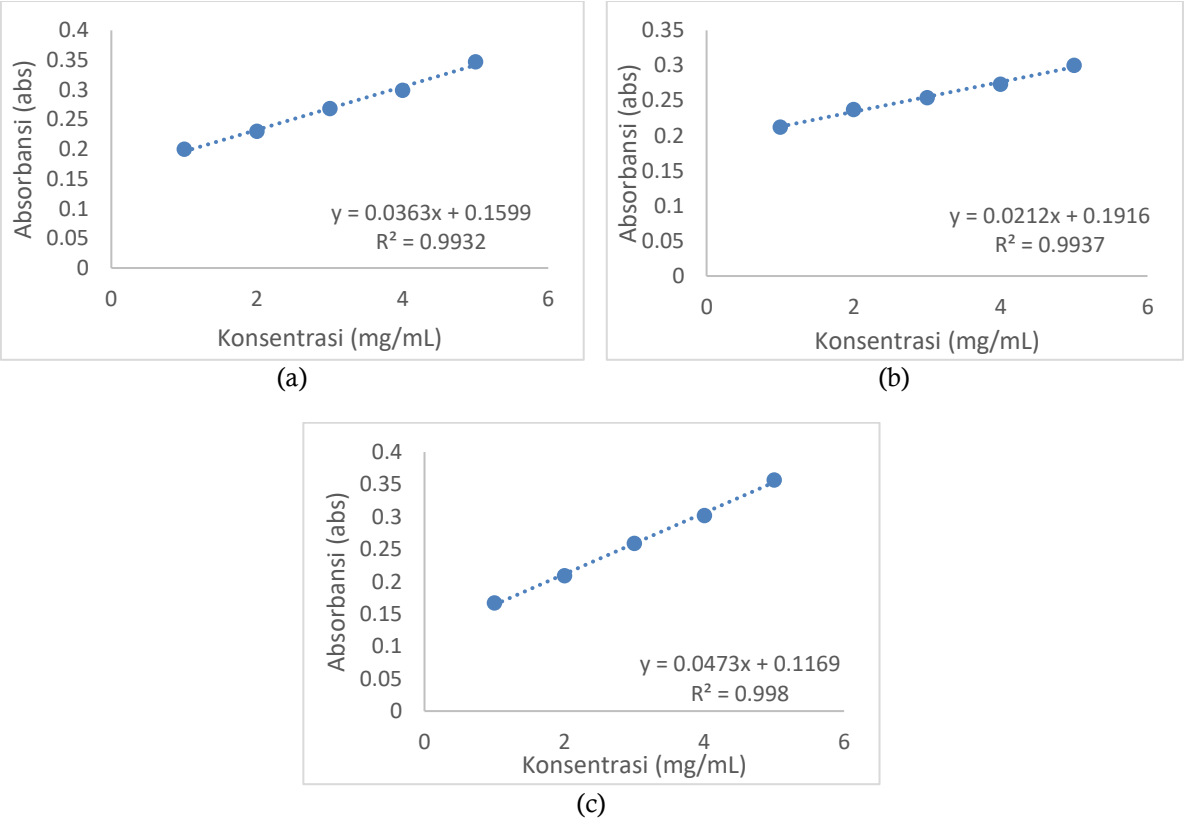
Gambar 1. (a) Pengenceran skala mL, (b) Pengenceran skala µL, (c) Lamda Maksimum

Konsistensi nilai λ maksimum antara dua pendekatan pengenceran menunjukkan bahwa perbedaan volume kerja tidak memengaruhi posisi puncak serapan, sehingga tidak berdampak pada mekanisme interaksi kimia yang mendasari pembentukan kompleks Cu^{2+}–protein. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode Biuret memberikan stabilitas panjang gelombang maksimum yang tinggi, terlepas dari skala pengenceran yang digunakan.

Hasil ini penting dalam konteks validasi metode, karena menunjukkan bahwa penggunaan teknik pengenceran mikro tetap menghasilkan data absorbansi yang ekuivalen dengan metode konvensional, sehingga dapat dijadikan alternatif yang valid dalam analisis kuantitatif protein dengan volume reagen dan sampel yang lebih efisien berlandaskan dengan *Green Analytical Chemistry* (GAC). Validisai metode berbasis pengenceran mikro dilakukan sebagai upaya mengurangi penggunaan reagen kimia yang berlebih sehingga lebih ramah lingkungan.

Uji Linearitas

Linearitas kurva standar menunjukkan sejauh mana hubungan antara konsentrasi analit dan nilai absorbansi bersifat proporsional. Kurva ini dibangun berdasarkan hukum Beer-Lambert yang menyatakan bahwa absorbansi sebanding dengan konsentrasi analit dalam kondisi ideal (Mamouei *et al.*, 2021). Namun, dalam praktiknya, linearitas dapat terganggu oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi yang terlalu tinggi, cahaya yang tidak monokromatik, atau media yang menyebar. Oleh karena itu, model regresi linier sederhana digunakan untuk menentukan kemiringan (slope) dan intersep kurva dengan metode kuadrat terkecil (Delgado, 2022). Evaluasi linearitas dilakukan dengan melihat nilai koefisien determinasi (R^2) (Chilian, 2025). Linearitas kurva standar sangat penting untuk menjamin keakuratan hasil analisis konsentrasi dalam metode spektrofotometri.



Gambar 2. Analisis Linearitas Standar Protein (a) Pengenceran mL-mikroplate, (b) Pengenceran µL-microplate, (c) Pengenceran mL-kuvet

Tabel 5. Analisis Linearitas

	Pengenceran mL-mikroplate	Pengenceran µL- microplate	Pengenceran mL-kuvet
Slope	0,0363	0,0212	0,0473
Intersep	0,1599	0,1916	0,1169
R^2	0,9932	0,9937	0,998

Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada Tabel 5, seluruh metode pengenceran yakni pengenceran mL-mikroplate, µL-mikroplate, dan mL-kuvet menunjukkan nilai koefisien determinasi (R^2) yang tinggi, masing-masing sebesar 0,9932, 0,9937, dan 0,998. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan bahwa ketiga metode memiliki hubungan linier yang sangat kuat antara konsentrasi dan respon instrumen, sehingga ketiganya dapat dikatakan memenuhi kriteria linearitas sesuai dengan pedoman validasi metode analisis yang diacu secara internasional (ICH Q2(R1)) (Zhu, 2024). Pengenceran mL-kuvet menunjukkan performa paling baik dengan nilai R^2 tertinggi (0,998), yang menandakan tingkat keakuratan model linear yang sangat tinggi. Selain itu, nilai slope tertinggi juga diperoleh dari metode ini, yakni sebesar 0,0473, yang mengindikasikan bahwa metode tersebut memiliki sensitivitas paling tinggi terhadap perubahan konsentrasi. Hal ini berarti bahwa setiap peningkatan kecil dalam konsentrasi dapat menghasilkan perubahan respon yang signifikan, sehingga metode ini lebih responsif dibandingkan dua metode lainnya. Adapun nilai intersep pada metode mL-kuvet adalah 0,1169, yang merupakan nilai terendah dibandingkan pengenceran mL-mikroplate (0,1599) dan µL-mikroplate (0,1916), mengindikasikan adanya sinyal dasar atau noise yang lebih kecil pada metode tersebut.

Secara keseluruhan, metode pengenceran mL-kuvet dapat disimpulkan sebagai metode yang paling optimal dalam hal linearitas, sensitivitas, dan kestabilan sinyal dasar. Meskipun demikian, metode pengenceran berbasis mikroplate baik dalam satuan mL maupun µL tetap menunjukkan kinerja yang baik dan dapat dijadikan alternatif yang layak, terutama dalam konteks penghematan volume sampel dan efisiensi waktu analisis.

Uji Akurasi

Akurasi merupakan parameter penting dalam validasi metode analisis kuantitatif karena mencerminkan seberapa dekat nilai hasil pengukuran (konsentrasi) terhadap nilai sebenarnya (nilai teoritis) (Yardin, 2015). Akurasi berperan krusial dalam menjamin keandalan dan validitas hasil analisis, terutama dalam aplikasi rutin maupun kebutuhan regulasi seperti pelaporan mutu dan uji kelayakan produk (Rozet *et al.*, 2007). Pada penelitian ini, akurasi dievaluasi menggunakan pendekatan recovery, yakni dengan membandingkan konsentrasi sampel yang diketahui (3 mg/mL) dengan konsentrasi hasil pengukuran menggunakan metode regresi linier.

Tabel 6. Analisis Akurasi (Pengenceran mL-mikroplate)

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi Rata-Rata	Slope	Intersep	Konsentrasi Terukur (mg/mL)	Akurasi
1	0,2				
2	0,23				
3	0,268				
4	0,299	0,0363	0,1599	2,730	91,00%
5	0,347				
Sampel (3 mg/mL)	0,259				

Berdasarkan Tabel 6, metode pengenceran mL-mikroplate menghasilkan konsentrasi terukur sebesar 2,730 mg/mL dengan tingkat akurasi sebesar 91,00%. Hal ini menunjukkan bahwa metode ini cukup mampu mengukur konsentrasi dengan deviasi yang relatif kecil dari nilai sebenarnya. Nilai slope dan intersep yang digunakan untuk regresi linear masing-masing adalah 0,0363 dan 0,1599. Dengan rata-rata absorbansi sampel sebesar 0,259, nilai konsentrasi yang dihitung sesuai dengan rentang kurva kalibrasi, memperkuat validitas hasil.

Tabel 7. Analisis Akurasi (Pengenceran µL-mikroplate)

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi Rata-Rata	Slope	Intersep	Konsentrasi Terukur (mg/mL)	Akurasi
1	0,212				
2	0,237				
3	0,254				
4	0,273	0,0212	0,1916	2,708	90,25%
5	0,3				
Sampel (3 mg/mL)	0,249				

Sementara itu, metode µL-mikroplate (Tabel 7) menghasilkan konsentrasi terukur sebesar 2,708 mg/mL dan akurasi sebesar 90,25%. Meskipun nilai slope (0,0212) lebih kecil dibanding metode mL-mikroplate, nilai intersepnya lebih tinggi, yakni 0,1916. Nilai absorbansi rata-rata untuk sampel adalah 0,249, yang menghasilkan nilai konsentrasi terukur yang sedikit lebih rendah dibanding metode mL-mikroplate. Akurasi metode ini juga berada pada kisaran yang dapat diterima secara umum (≥ 90%) sesuai standar validasi analisis, meskipun sedikit lebih rendah daripada mL-mikroplate.

Tabel 8. Analisis Akurasi (Pengenceran mL-kuvet)

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi Rata-Rata	Slope	Intersep	Konsentrasi Terukur (mg/mL)	Akurasi
1	0,167				
2	0,209				
3	0,259				
4	0,302	0,0473	0,1169	2,708	90,27%
5	0,357				
Sampel (3 mg/mL)	0,245				

Metode ketiga, yaitu mL-kuvet (Tabel 8), menunjukkan konsentrasi terukur sebesar 2,708 mg/mL dengan akurasi sebesar 90,27%. Nilai slope tertinggi tercatat pada metode ini, yaitu 0,0473, yang menunjukkan sensitivitas yang tinggi. Adapun nilai intersepnya adalah yang paling rendah di antara ketiga metode (0,1169), yang mencerminkan tingkat noise atau interferensi paling kecil pada saat konsentrasi nol. Nilai absorbansi rata-rata sampel yang diukur adalah 0,245, yang menghasilkan nilai konsentrasi terukur yang hampir identik dengan metode µL-mikroplate. Dengan demikian, meskipun metode mL-kuvet memiliki slope yang lebih tinggi (menandakan respon lebih peka), namun nilai akurasinya sedikit lebih rendah dibandingkan metode mL-mikroplate.

Ketiga metode menunjukkan tingkat akurasi yang relatif seragam dan tinggi, yakni berada dalam rentang 90,25–91,00%. Metode mL-mikroplate unggul secara akurasi, meskipun metode mL-kuvet menunjukkan karakteristik sensitivitas yang lebih tinggi berdasarkan slope dan intersep. Sementara itu, metode µL-mikroplate menawarkan keseimbangan antara akurasi dan efisiensi volume sampel, menjadikannya pilihan menarik dalam konteks analisis berbasis mikrovolume.

Analisis Kandungan Protein dalam Sampel

Analisis kandungan protein dalam suatu sampel merupakan salah satu aspek penting dalam evaluasi kualitas bahan biologis, pangan, dan produk bioteknologi. Tujuan utama dari analisis ini adalah untuk mengetahui seberapa besar kadar protein yang terkandung dalam sampel uji secara kuantitatif, yang biasanya dinyatakan dalam satuan konsentrasi seperti mg/mL atau persen (%). Metode yang digunakan dalam penelitian ini merupakan metode biuret dengan tujuan membandingkan tiga metode pengenceran pada sampel tempe dan yoghurt.

Tabel 9. Analisis Kandungan Protein Pada Sampel

Sampel	Massa (mg)	mL-Mikroplate		µL-Mikroplate		mL-Kuvet	
		Absorbansi rata-rata	Kandungan (mg/mL)	Absorbansi rata-rata	Kandungan (mg/mL)	Absorbansi rata-rata	Kandungan (mg/mL)
Tempe	1105,1	0,248	2,427	0,240	2,283	0,215	2,074
Yoghurt	1029,7	0,361	5,540	0,300	5,113	0,377	5,499

Berdasarkan data table 9 menunjukkan bahwa masing-masing metode menghasilkan nilai kandungan protein yang relatif konsisten, meskipun terdapat perbedaan kecil antar metode. Pada sampel tempe, nilai kandungan protein tertinggi diperoleh dari metode mL-mikroplate (2,427 mg/mL), disusul oleh µL-mikroplate (2,283 mg/mL), dan yang terendah dari mL-kuvet (2,074 mg/mL). Selisih antara metode tertinggi dan terendah adalah 0,353 mg/mL, yang dapat diakibatkan oleh faktor matriks sampel tempe yang padat, tingkat homogenisasi, atau interaksi protein yang berbeda terhadap volume dan skala pengenceran.

Sementara itu, untuk sampel yoghurt, hasil pengukuran lebih konsisten di semua metode. Kandungan protein tertinggi dihasilkan oleh metode mL-mikroplate (5,540 mg/mL), diikuti oleh mL-kuvet (5,499 mg/mL), dan µL-mikroplate (5,113 mg/mL). Selisih antara nilai tertinggi dan terendah hanya 0,427 mg/mL, yang menunjukkan bahwa metode µL dan mL dalam sistem mikroplate maupun kuvet sama-sama layak digunakan untuk sampel cair seperti yoghurt, dengan reliabilitas yang relatif tinggi.

Perbedaan nilai antara metode mL-kuvet dan mikroplate mungkin dipengaruhi oleh perbedaan trayek optik (path length), sensitivitas instrumen, serta variasi kecil dalam reaksi warna metode Biuret dalam masing-masing sistem. Namun, semua metode tetap menunjukkan urutan tren konsisten antara sampel, yakni yoghurt memiliki kandungan protein lebih tinggi daripada tempe, sesuai dengan sifat alaminya sebagai produk fermentasi susu yang kaya protein.

Simpulan

Berdasarkan hasil analisis, metode pengenceran mL-mikroplate merupakan metode paling optimal untuk analisis protein karena menunjukkan akurasi tertinggi (91,00%), linearitas yang baik (R^2 = 0,9932), dan hasil pengukuran yang konsisten pada sampel tempe dan yoghurt. Selain itu, metode ini lebih efisien dibandingkan kuvet dalam penggunaan reagen. Namun, metode µL-mikroplate juga layak dipertimbangkan sebagai alternatif yang baik, karena tetap memberikan akurasi memadai (90,25%) dengan konsumsi reagen yang jauh lebih sedikit, sehingga mendukung prinsip *Green Analytical Chemistry* (GAC). Dengan demikian, mL-mikroplate direkomendasikan sebagai metode utama, dan µL-mikroplate sebagai solusi ramah lingkungan yang efisien.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan dana hibah penelitian ini.

Daftar Referensi

Agrawal, A., Keçili, R., Ghorbani-Bidkorbeh, F., & Hussain, C. M. (2021). Green miniaturized technologies in analytical and bioanalytical chemistry. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 143). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116383

Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2019). Essentials of pharmaceutical analysis. In *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7

Amekura, H. (2018). Ultraviolet–Visible Spectrophotometry. In *Compendium of Surface and Interface Analysis* (pp. 791–799). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6156-1_126

Aurand, L. W., Woods, A. E., & Wells, M. R. (1987). *Food Composition and Analysis*. Van Nostrand Reinhold Company.

Bergquist, J., & Turner, C. (2018). Analytical chemistry for a sustainable society – trends and implications. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 410, Issue 14, pp. 3235–3237). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1036-4

Chilian, A. (2025). Introduction of curvature index and improvement of calibration curves used in ion chromatography (IC), atomic absorption spectrometry (AAS), UV–vis spectrophotometry and catalytic combustion. *Analytica Chimica Acta*, *1336*, 343521. https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343521

Delgado, R. (2022). Misuse of Beer–Lambert Law and other calibration curves. *Royal Society Open Science*, *9*(2). https://doi.org/10.1098/rsos.211103

Ferreira, C. P., Techera Antunes, F. T., Rebelo, I. N., da Silva, C. A., Vilanova, F. N., Corrêa, D. S., & de Souza, A. H. (2020). Application of the UV–vis spectrophotometry method for the determination of glutamate in the cerebrospinal fluid of rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *186*. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113290

Ganesh, K. N., Zhang, D., Miller, S. J., Rossen, K., Chirik, P. J., Kozlowski, M. C., Zimmerman, J. B., Brooks, B. W., Savage, P. E., Allen, D. T., & Voutchkova-Kostal, A. M. (2021). Green Chemistry: A Framework for a Sustainable Future. In *ACS Omega*. American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03011

Hokazono, E., Ota, E., Goto, T., Fukumoto, S., Kayamori, Y., Uchiumi, T., & Osawa, S. (2021). Development of a protein assay with copper chelator chromeazurol B, based on the biuret reaction. *Analytical Biochemistry*, *630*, 114320. https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114320

Kreusch, S., Schwedler, S., Tautkus, arbel, Cumme, G. A., & Horn, A. (2003). UV measurements in microplates suitable for high-throughput protein determination. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 313). www.elsevier.com/locate/yabio

Langyan, S., Bhardwaj, R., Radhamani, J., Yadav, R., Gautam, R. K., Kalia, S., & Kumar, A. (2022). A Quick Analysis Method for Protein Quantification in Oilseed Crops: A Comparison With Standard Protocol. *Frontiers in Nutrition*, *9*. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.892695

L.C. Passos, M., & M.F.S. Saraiva, M. L. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. In *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation* (Vol. 135, pp. 896–904). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045

Malik, M., Chan, K. H., & Azimi, G. (2021). Quantification of nickel, cobalt, and manganese concentration using ultraviolet-visible spectroscopy. *RSC Advances*, *11*(45), 28014–28028. https://doi.org/10.1039/d1ra03962h

Mamouei, M., Budidha, K., Baishya, N., Qassem, M., & Kyriacou, P. A. (2021). An empirical investigation of deviations from the Beer–Lambert law in optical estimation of lactate. *Scientific Reports*, *11*(1), 13734. https://doi.org/10.1038/s41598-021-92850-4

Mörschbächer, A. P., Dullius, A., Dullius, C. H., Bandt, C. R., Kuhn, D., Brietzke, D. T., Malmann Kuffel, F. J., Etgeton, H. P., Altmayer, T., Gonçalves, T. E., Oreste, E. Q., Ribeiro, A. S., de Souza, C. F. V., & Hoehne, L. (2018). Validation of an analytical method for the quantitative determination of selenium in bacterial biomass by ultraviolet–visible spectrophotometry. *Food Chemistry*, *255*, 182–186. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.057

Pratiwi, R. A., & Nandiyanto, A. B. D. (2022). How to Read and Interpret UV-VIS Spectrophotometric Results in Determining the Structure of Chemical Compounds. *Indonesian Journal of Educational Research and Technology*, *2*(1), 1–20. https://doi.org/10.17509/ijert.v2i1.35171

Rozet, E., Hubert, C., Ceccato, A., Dewé, W., Ziemons, E., Moonen, F., Michail, K., Wintersteiger, R., Streel, B., Boulanger, B., & Hubert, P. (2007). Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results. *Journal of Chromatography A*, *1158*(1–2), 126–137. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.102

Sudarmadji, S., Haryono, B., & Suhardi. (1984). *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian* (Ketiga). Universitas Gadjah Mada.

Suhartati, T. (2017). *Dasar-Dasar Spektrofotometri Uv-Vis dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*.

Sulistyani, M., Huda, N., Prasetyo, R., Alauhdin, D. M., & Abstrak, I. A. (2023). Calibration of Microplate Uv-Vis Spectrophotometer for Quality Assurance Testing of Vitamin C using Calibration Curve Method. *Indonesian Journal of Chemical Science* , *12*(2), 207–215. http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs

Sulistyani, M., Mahatmanti, W., Huda, N., Prasetyo, R., Kimia, J., Matematika, F., Ilmu, D., & Alam, P. (2024). Indonesian Journal of Chemical Science Optimization of Microplate Type Uv-Vis

Spectrophotometer Performance as an Antioxidant Activity Testing Instrument. In *J. Chem. Sci* (Vol. 13, Issue 1). http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs

Syauqi, A., Fuadi, M., & Santoso, H. (2018). Comparative Study of References and Protein Quantifications Using Biuret-Spectrophotometric Method. *Chimica et Natura Acta*, *6*(2), 42. https://doi.org/10.24198/cna.v6.n2.19224

Trang, C. H., Le, D. T. C., Lieu, D. T., & Minh, P. Q. (2021). *Determination of total protein content in biologicals using biuret method*.

Wang, X., Zeng, Z., Tian, Z., Sun, J., Li, Y., & Fan, X. (2019). Validation of spectrophotometric determination of chlorogenic acid in fermentation broth and fruits. *Food Chemistry*, *278*, 170–177. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.041

Yardin, C. (2015). Exactitude et intervalles statistiques en validation de méthode. In B. Larquier (Ed.), *17th International Congress of Metrology* (p. 02016). EDP Sciences. https://doi.org/10.1051/metrology/20150002016

Zhu, X. (2024). A linear validation method of analytical procedures based on the double logarithm function linear fitting. *Analytica Chimica Acta*, *1310*, 342695. https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342695