

**JURNAL**

**ANALISIS KADAR PROTEIN TERLARUT HIDROLISAT PROTEIN IKAN  
CUNANG (*Congresox talabon*) MENGGUNAKAN METODE BRADFORD**

**OLEH**

**ANGGI ANGELITA HERMAYA**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN  
UNIVERSITAS RIAU  
PEKANBARU  
2020**

# **ANALISIS KADAR PROTEIN TERLARUT HIDROLISAT PROTEIN IKAN CUNANG (*Congresox talabon*) MENGGUNAKAN METODE BRADFORD**

**Oleh**

**Anggi Angelita Hermaya<sup>(1)</sup>, Edison<sup>(2)</sup>, Andarini Diharmi<sup>(2)</sup>**

*Email: [anggiangelitah@gmail.com](mailto:anggiangelitah@gmail.com)*

## **ABSTRAK**

Ikan cunang merupakan salah ikan laut yang kaya akan protein. Daging yang terdapat pada ikan cunang bermanfaat dalam pembuatan hidrolisat protein ikan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik hidrolisat protein ikan cunang berdasarkan protein terlarut. Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimen serta rancangan acak lengkap (RAL) non faktorial. Perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi enzim papain berbeda yaitu 2% (P1), 4% (P2) dan 6% (P3). Parameter yang diamati terdiri dari analisis kadar protein terlarut metode Bradford pada hidrolisat protein ikan cunang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar proksimat pada daging ikan cunang yaitu kadar abu 15,15%, kadar air 73,95%, kadar protein 73,15%, dan kadar lemak 1,93%. Konsentrasi enzim papain memberikan pengaruh nyata terhadap kadar protein terlarut hidrolisat protein ikan cunang, dengan nilai kadar protein terlarut yaitu perlakuan P1 yaitu 7,30%, perlakuan P2 yaitu 8,77% sedangkan perlakuan P3 yaitu 11,64%.

**Kata Kunci: Hidrolisat Protein Ikan, Enzim Papain, Bradford**

---

<sup>1)</sup> **Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau**

<sup>2)</sup> **Dosen Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau**

**ANALYSIS OF DISSOLVED PROTEIN CONTENT ON PROTEIN  
HYDROLYZATES OF CUNANG FISH (*Congresox talabon*)  
USING THE BRADFORD METHOD**

**By**

**Anggi Angelita Hermaya<sup>(1)</sup>, Edison<sup>(2)</sup>, Andarini Diharmi<sup>(2)</sup>**

*Email: [anggiangelitah@gmail.com](mailto:anggiangelitah@gmail.com)*

**ABSTRACT**

Cunang fish is one of the sea fish which is rich in protein. The meat found in cunang fish is useful in making fish protein hydrolyzates. This study aims to look at the protein hydrolyzate of cunang fish based on dissolved protein. The research methods used were experimental and non-factorial Completely Randomized Design (CRD). The treatments used were different papain enzymes: 2% (P1), 4% (P2) and 6% (P3). The parameters observed consisted of analysis of dissolved protein by Bradford method on protein hydrolyzate of cunang fish. The results showed that the proximate levels of cunang fish meat was ash 15,15%, water content 73,95%, protein content 73,15% and fat content 1,93%. The concentration of papain enzyme had a significant effect on the dissolved protein content of cunang fish protein hydrolyzate, with the value of dissolved protein content P1 was 7.30%, P2 was 8.77% while P3 was 11.64%.

**Keyword:** fish protein hydrolyzate, papain enzyme, bradford

---

<sup>1)</sup> **Student of the Faculty of Fisheries and Marine, Riau University**

<sup>2)</sup> **Lecturer of the Faculty of Fisheries and Marine, Riau University**

## PENDAHULUAN

Sektor perikanan laut di Indonesia diharapkan menjadi salah satu sektor unggulan. Salah satu komoditi perikanan laut yang dapat dimanfaatkan yaitu ikan cunang (*Congresox talabon*). Ikan cunang biasanya tidak dalam keadaan utuh, dikarenakan gelembung renang ikan tersebut terlebih dahulu diambil sebelum dipasarkan. Gelembung renang ikan cunang dapat dimanfaatkan menjadi beberapa produk seperti enzim dan dijual dengan harga yang cukup tinggi dibandingkan daging ikan cunang. Bentuk dari ikan cunang yang kurang menarik membuat masyarakat jarang ingin mengkonsumsi daging ikan tersebut.

Ikan cunang memiliki bentuk tubuh yang memanjang seperti belut. Kisaran panjang tubuh ikan cunang yaitu 150-220 cm (FAO, 2012). Menurut Laksono *et al.*, (2019) kadar protein ikan cunang yaitu sebesar 12,27 dalam basis basah. Dikarenakan daging ikan cunang masih terbilang jarang dimanfaatkan dan memiliki kadar protein yang cukup tinggi tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam pembuatan hidrolisat protein ikan.

Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein menjadi peptida dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh asam, basa, enzim, atau fermentasi (Pasupuleti *et al.*, 2010). Secara teoritis, metode yang paling efisien dalam proses hidrolisis protein yaitu menggunakan enzim, dikarenakan peptida-peptida yang mudah pecah serta kurang kompleks dapat dihasilkan oleh enzim. Selain itu, hidrolisis menggunakan enzim dapat membentuk perubahan pada produk hidrolisat yang bersifat non hidrolitik serta terhindar dari kerusakan produk (Johnson, 1974). Dalam

pembuatan hidrolisat protein ikan, terdapat protein yang tidak terhidrolisis. Sehingga perlu dilakukan pengukuran protein terlarut pada hidrolisat protein ikan cunang.

Terdapat berbagai metode dalam pengukuran protein terlarut. Salah metode yang dapat digunakan adalah metode Bradford. Metode Bradford mempunyai sensitivitas empat kali dibandingkan metode *lowry* (Hadinoto, 2019). Metode Bradford dapat mendeteksi adanya kadar protein menggunakan kurva standar yang menghubungkan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan sampel. Metode ini memiliki reagen khusus yaitu reagen Bradford. Keuntungan dari metode ini adalah pereaksi yang digunakan sangat sederhana serta mudah disiapkan.

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar protein terlarut pada hidrolisat protein ikan cunang.

## METODE PENELITIAN

### *Bahan dan alat*

Bahan baku utama yang digunakan adalah ikan cunang (*Congresox talabon*) berupa daging yang berasal dari Bengkalis, Riau.

Bahan-bahan kimia yang digunakan yaitu enzim papain merk Xian Lyphar Biotech, aquades, HCl, NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Cu kompleks, kloroform, NaOH, indikator PP, H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, indikator campuran (metilen merah biru), bofin serum albumin (BSA), serta reagen Bradford.

Sedangkan peralatan yang digunakan yaitu *beaker glass*, *hot plate*, *sentrifuge*, blender, pH-meter, inkubator, desikator, tabur pengabuan, buret, timbangan digital, pipet tetes, labu kjedahl, labu lemak, tabung reaksi, gelas ukur, labu erlenmeyer, corong gelas,

cawan porselin, spatula, penjepit, *magnetic stirrer*, botol sampel, kertas label, saringan, sarung tangan dan masker mulut.

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan melakukan percobaan secara langsung dalam proses pembuatan hidrolisat protein serta pengujian protein terlarut yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial. Perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi enzim papain berbeda, terdiri dari 3 taraf (konsentrasi enzim 2%; 4%; 6%). Ulangan yang digunakan sebanyak 3 kali, sehingga jumlah unit percobaan sebanyak 9 unit.

### **Pembuatan hidrolisat protein ikan cunang (*Congresox talabon*)**

Ikan cunang segar yang telah mati selanjutnya difillet untuk pengambilan daging dan kemudian ikan dihaluskan menggunakan blender. Daging dimasukan ke dalam erlenmeyer dan dicampurkan dengan aquades, dengan perbandingan daging dan aquades (1:4). Campuran tersebut diaduk kemudian pH diatur hingga mencapai pH 7. NaOH digunakan sebagai pengatur suasana basa. Campuran ditambahkan enzim papain konsentrasi 2%, 4%, dan 6% (b/v) kemudian dihidrolisis menggunakan inkubator pada suhu 55°C selama 5 jam. Hasil hidrolisis tersebut dipanaskan pada suhu 85°C selama 15 menit yang bertujuan untuk menginaktivasi enzim. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 ppm selama 20 menit. Ini bertujuan untuk memisahkan persipitat dan supernatan. Hidrolisat protein yang dihasilkan berupa supernatan kemudian dianalisis protein terlarut metode Bradford.

### **Analisis Proksimat**

#### **a. Analisis kadar air, metode oven (AOAC, 2005)**

Cawan yang telah dibersihkan, kemudian dikeringkan selama 24 jam didalam oven. Cawan yang telah dikeringkan, kemudian dimasukkan ke dalam desikator selama kurang lebih 30 menit yang bertujuan untuk didinginkan. Berat cawan tersebut ditimbang (A). Sampel ditimbang seberat 3 g, kemudian dimasukkan ke dalam cawan (B). Cawan berisikan sampel tersebut dimasukkan ke dalam oven yang memiliki suhu 100°C-105°C selama kurang lebih 6 jam. Sampel tersebut didinginkan menggunakan desikator selama 1 jam. Berat cawan berisikan sampel tersebut kemudian ditimbang (C). sampel tersebut kemudian ditimbang (C). Kadar air dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ kadar air} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat cawan kosong (g)

B = Berat cawan yang telah berisi sampel (g)

C = Berat cawan kosong berisi sampel yang telah dikeringkan (g)

#### **b. Analisis kadar abu (AOAC, 2005)**

Cawan yang telah dibersihkan, kemudian dikeringkan menggunakan oven selama kurang lebih 24 jam. Cawan tersebut dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit, kemudian cawan ditimbang (A). Sampel ditimbang seberat 3 g kemudian dimasukkan kedalam cawan (B). Cawan tersebut selanjutnya dibakar pada suhu 600°C menggunakan tanur pengabuan hingga mencapai pengabuan sempurna atau sekitar 4 jam. Cawan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam

desikator selama 1 jam untuk didinginkan. Cawan tersebut kemudian ditimbang (C g). Rumus perhitungan kadar air yaitu:

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{C-A}{B-A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat cawan kosong (g)

B = Berat cawan yang sudah berisi sampel (g)

C = Berat cawan berisi sampel yang sudah diabukan (g)

### c. Analisis kadar protein, metode Kjeldahl (AOAC, 2005).

Sampel ditimbang sebanyak 0,2-0,5 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Menambahkan 1 g katalis (Cu kompleks) dan 5 ml asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ke dalam sampel tersebut. Campuran didekstruksi dalam lemari asam sampai berwarna hijau atau bening, kemudian campuran tersebut didinginkan selama 30 menit. Larutan yang telah didestruksi diencerkan dengan aquades 80 ml dalam labu kjedahl. Indikator pp ditambahkan sebanyak 5 tetes serta NaOH 50% sampai terbentuk larutan yang berwarna merah muda. Erlenmeyer diisi dengan asam boraks sebanyak 25 ml kemudian menambahkan indikator campuran (metilen biru) sebanyak 2 tetes dan dihomogenkan. Destilasi berlangsung lebih kurang 45 menit. Hasil dari destilasi kemudian dititrasi menggunakan larutan asam standar (HCl 0,1 N) yang konsentrasi telah diketahui hingga berubah menjadi warna biru. Dengan cara yang sama dilakukan untuk blangko tanpa sampel. Kadar protein dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Protein} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 14,007 \times f_k}{w \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

W = Bobot Sampel

V<sub>1</sub> = Volume HCl 0,01 N yang dipergunakan penitaran blanko

V<sub>2</sub> = Volume HCl 0,01 N yang dipergunakan penitaran sampel

N = Normalitas HCl

f<sub>k</sub> = Faktor konversi untuk protein secara umum : 6,25

### d. Analisis kadar lemak (AOAC, 2005)

Labu penyaring dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 100°-105°C. Labu tersebut didinginkan menggunakan desikator kurang lebih selama 1 jam dan ditimbang beratnya (W<sub>2</sub>). Kemudian labu tersebut disambungkan dengan tabung soxhlet. Sampel sebanyak 4 g (W<sub>1</sub>) ditimbang dan dimasukkan ke dalam kertas saring. Sampel tersebut kemudian dimasukkan kedalam tabung soxhlet. Tabung soxhlet dimasukkan ke dalam ruang ekstraktor tabung soxhlet dan disiram dengan 250 ml n-heksan. Tabung tersebut dipasang pada alat destilasi soxhlet lalu didestilasi selama 6 jam. Labu lemak dikeringkan dalam oven dengan suhu 105°C selama kurang lebih 1 jam, kemudian dilakukan pendinginan labu didalam desikator dan dilakukan penimbangan (W<sub>3</sub>). Kadar lemak dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Lemak} = \frac{(W_3 - W_2)}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W<sub>1</sub> = Berat sampel (g)

W<sub>2</sub> = Berat labu lemak tanpa lemak (g)

W<sub>3</sub> = Berat labu lemak dengan lemak (g)

### Analisis Protein Terlarut (Bradford, 1976)

Untuk mengukur kadar protein terlarut menggunakan metode Bradford, terlebih dahulu dilakukan pembuatan larutan Bradford. Larutan Bradford dibuat menggunakan cara mereaksikan 25 mg

*comassie brilliant blue G-250* dengan 12,5 ml etanol 95%. Hasil dari reaksi tersebut diencerkan menggunakan 500 ml akuades. Sebelum dilakukan pengenceran, larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring serta diencerkan sebanyak lima kali sebelum dilakukan pengukuran absorbansinya.

Untuk membuat larutan stok menggunakan konsentrasi 2 mg/ml, dilakukan dengan cara melarutkan 100 mg protein BSA ke dalam 50 ml akuades. Pengenceran dilakukan menggunakan larutan stok menjadi larutan dengan berbagai konsentrasi yang lebih rendah yaitu 0,1-1 mg/ml.

Untuk mengukur protein terlarut metode Bradford dilakukan dengan cara mereaksikan 0,1 ml larutan sampel hidrolisat dengan 5 ml larutan Bradford di dalam tabung reaksi. Larutan tersebut diinkubasi selama lima menit dan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Preparasi dan Proporsi Ikan Cunang (*Congresox talabon*)

Untuk mendapatkan persentase bagian tubuh ikan, dilakukan perhitungan proporsi. Nilai proporsi yang didapatkan dari hasil penyiangan cunang per ekor disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Proporsi bagian tubuh ikan cunang

Bagian Ikan	Persentase (%)
Daging	54,50
Kulit	6,33
Tulang	30,50
Insang	0,67
Kepala	6,17
Isi perut	1,83

Bagian yang didominasi pada tubuh ikan cunang yaitu bagian daging. Proporsi daging ikan cunang tersebut mencapai 54,50%. Daging ikan cunang tersebut berwarna putih, memiliki tekstur yang lembut dan berlapis, dan pada daging tersebut terdapat tulang. Bagian kepala ikan cunang terdiri dari ujung mulut terdepan hingga ujung tutup insang paling belakang. Kulit ikan cunang tersebut elastis dan tipis yang digunakan sebagai pelindung. Bagian isi perut ikan cunang terdiri dari jantung, hati, usus, lambung, ginjal, gonad dan pankreas.

### Komposisi Kimia Ikan Cunang

Untuk mendapat data dari komposisi kimia, dilakukan pengujian analisis proksimat. Hasil analisis proksimat pada daging ikan cunang yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Proksimat daging ikan cunang

Komposisi	Persentase (%)
Air (bb)	73,95 ± 0,66
Protein (bk)	73,15 ± 0,12
Abu (bk)	15,15 ± 0,33
Karbohidrat (bk)	9,77 ± 0,33
Lemak (bk)	1,93 ± 0,03

Pada tabel 2 menunjukkan bahwa kadar air yang terdapat pada ikan cunang memiliki nilai yang cukup tinggi. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa kadar air yang terdapat pada daging ikan cunang yaitu sebesar 73,95% (bk). Hasil tersebut tidak sejalan dengan hasil yang didapat oleh penelitian sebelumnya yaitu 80,49% (Laksono *et al.*, 2019). Bahan baku ikan yang digunakan dalam bentuk segar dapat menjadi penyebab kadar air daging ikan cunang termasuk tinggi. Daging yang memiliki kadar air yang cukup tinggi dapat beresiko mudah busuk

jika tidak ditangani dengan cepat. Oleh karena itu, ikan yang memiliki kadar air cukup tinggi harus segera ditangani supaya tidak cepat mengalami kebusukan.

Sebagian besar bahan pangan terdiri dari 96% bahan organik dan airnya terdiri dari unsur-unsur mineral. Dalam proses pembakaran bahan dengan menggunakan suhu sebesar 600°C akan menyebabkan terbakarnya bahan organik, tetapi masih terdapat bahan yang tidak terbakar dan berubah menjadi bentuk abu yaitu bahan anorganik yang terdiri atas berbagai mineral. Kadar abu daging ikan cunang yang dihasilkan adalah sebesar 15,15%. Hasil tersebut tidak sejalan dengan hasil yang didapat pada penelitian sebelumnya yaitu sebesar 13,48% (Ilham, 2019). Perbedaan tersebut disebabkan adanya perbedaan kondisi lingkungan, habitat serta ukuran pada ikan yang digunakan.

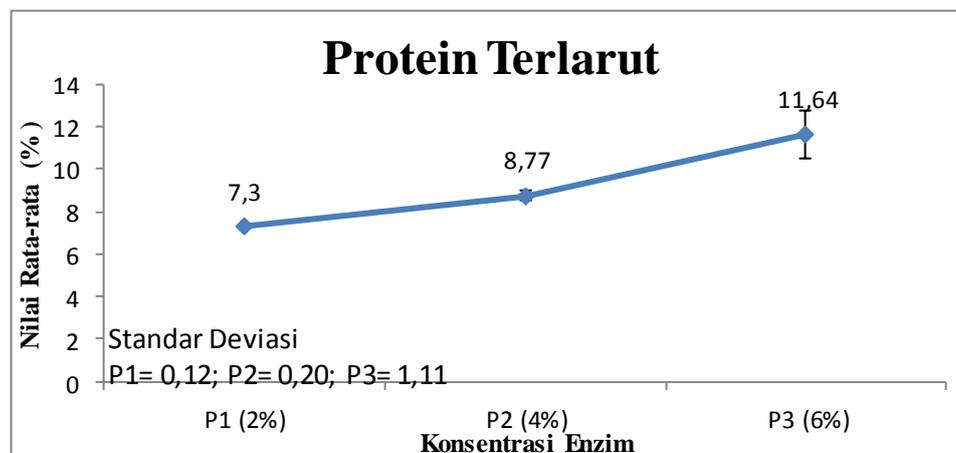
Protein merupakan zat pembangun jaringan, selain itu juga sebagai kandungan utama dari otot atau daging ikan. Pada tabel 2 menunjukkan bahwa ikan cunang menghasilkan kadar protein yaitu sebesar 73,15%. Kandungan protein ikan cunang tersebut tidak berbeda jauh dengan

penelitian sebelumnya yang bernilai 79,26% (Ilham, 2019). Hal tersebut menunjukkan daging ikan cunang tersebut memiliki kualitas yang cukup baik sebagai bahan baku dalam pembuatan hidrolisat protein ikan.

Lemak merupakan sumber energi yang sangat penting untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan. Lemak juga dapat sebagai sumber asam lemak esensial dan vitamin (vitamin A, D, E, K) (Belitz *et al.*, 2009). Kadar lemak yang terdapat pada daging ikan cunang yaitu 1,93%. Nilai ini tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya yang bernilai 0,49% (Ilham, 2019). Perbedaan komposisi yang terdapat pada ikan biasanya berasal dari faktor internal (jenis spesies, kelamin serta umur) dan faktor eksternal (habitat dan ketersediaan pakan).

### Protein Terlarut metode Bradford

Protein terlarut pada hidrolisat protein ikan cunang dapat diukur dengan menggunakan metode Bradford. Hasil analisis protein terlarut ikan cunang dengan konsentrasi enzim yang berbeda disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Nilai rata-rata protein terlarut pada hidrolisat protein ikan cunang dengan berbagai konsentrasi enzim papain yang berbeda

Gambar 5 menunjukkan bahwa adanya perbedaan nilai protein terlarut pada ikan cunang pada setiap perlakuan enzim yang digunakan. Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan bahwa konsentrasi enzim papain berpengaruh nyata terhadap protein terlarut yang dihasilkan, dimana F hitung (34,32) > F tabel (5,14) pada tingkat kepercayaan 95%, kemudian dilakukan uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) (Lampiran 8). Hasil perhitungan BNJ menunjukkan bahwa pada perlakuan P3 berbeda nyata dengan perlakuan P1 dan P2, serta perlakuan P1 juga berbeda sangat dengan perlakuan P2 (Lampiran 9).

Reaksi antara enzim dengan substrat berpengaruh dalam menentukan kecepatan reaksi hidrolisis. Gambar 2 menunjukkan bahwa konsentrasi enzim mempengaruhi peningkatan terhadap kadar protein terlarut. Protein terlarut tertinggi pada hidrolisat protein ikan cunang terdapat pada konsentrasi enzim 6% yaitu sebesar 11,64%. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin banyaknya enzim papain yang digunakan maka semakin besar protein terlarut pada hidrolisat protein ikan. Semakin meningkatnya protein terlarut tersebut dikarenakan adanya kontribusi dari enzim papain didalam hidrolisat.

Kelarutan protein mengacu pada jumlah total protein yang masuk ke dalam larutan pada kondisi tertentu (Zays, 1997). Hal tersebut tergantung pada struktur protein, pH, lama waktu ekstraksi, suhu serta faktor instrinsik lainnya. Peningkatan kelarutan protein tersebut ditunjukkan oleh semakin banyaknya protein terlarut yang terdapat pada bagian supernatan. Apabila kadar protein terlarut mengalami penurunan, maka kualitas protein pada ikan juga akan mengalami penurunan.

## KESIMPULAN

Bedasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa kadar protein terlarut yang terdapat pada hidrolisat ikan cunang berpengaruh nyata, dimana P1 sebesar 7,30%, P2 sebesar 8,77% dan P3 sebesar 11,64%,

## DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18<sup>th</sup> Edition. Gaithersburg: AOAC International.
- Bradford, MM. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72. 284-254.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2012. *Congresox talabon (Forsskal 1775)*. Species fact sheets. Italia (IT): FAO Fisheries and Aquaculture Department.
- Hadinoto, S., Syukroni, I. 2019. Pengukuran Protein Terlarut Air Cucian Gelembung Renang dan Kulit Ikan Tuna menggunakan Metode Bradford. *Majalah Biam*. Vol 15 (01): 15-20
- Ilham, D. 2019. Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan Malong (*Congresox talabon*) dengan menggunakan Enzim Papain [Tesis]. Pekanbaru (ID): Universitas Riau
- Laksono, UT., Nurhayati, T., Suptijah, P., Nur'aenah, N., Nugroho, TS. 2019. Karakteristik Ikan Malong (*Muraenesox cinerus*) sebagai Bahan Baku Pengembangan Produk Diversifikasi. *JPHPI*. 22 (1). 60-10.

Johnson, AH., Peterson, MS. 1974.  
*Encyclopedia of Food Technology,*  
*Volume II.* Westport: The AVI  
Publ.Co.Inc.

Pasupuleti, VK., Demain, A.L. 2010.  
*Protein Hydrolysates in*  
*Biotechnology.* New York (US):  
Springer.

Zays, JF. 1997. *Functionally of Protein in*  
*Food.* Springer: Germany