

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik. Dalam penelitian ini mempunyai beberapa tahapan yaitu isolasi protein pada sampel protein daging ayam, protein daging babi serta protein produk olahannya, profil protein hasil isolasi diidentifikasi menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai Agustus 2018 di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (UGM), Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta dan Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY), Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta.

C. Sampel

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah daging ayam, daging babi, serta produk olahan sosis. Sampel yang digunakan didapatkan dari pasar Kranggan Yogyakarta.

Pada sampel setiap daging dibagi menjadi 3 kelompok yaitu:

1. Kelompok sampel protein daging asli.
2. Kelompok campuran sosis referensi.
3. Kelompok sampel sosis komersil.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas

Daging ayam, daging babi, sosis buatan sendiri, dan sosis komersil.

b. Variabel terikat

Profil protein hasil isolasi berupa pita protein.

E. Bahan dan Alat

a. Bahan

Daging ayam dan daging babi segar, tepung tapioka, garam, bawang putih, aquabides, marker protein, *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10%; *Ammonium Persulfate* (APS); Tris HCL pH 8,8; Tris HCL pH 6,8; *loading buffer*; *normal saline*; *phenylmethane sulfonyl fluoride* (PMSF); *N,N,N',N'-Tetramethylenediamine* (TEMED) 100% (BioRad); 10x buffer elektroforesis pH 8,7; isobutanol; *Coomasie brilliant blue*; *destaining solution*; *reagen biuret*. Bahan yang digunakan untuk *running buffer* SDS-PAGE adalah tris, *glycine*, SDS. Bahan yang digunakan untuk 5 ml dapar sampel adalah 0,5 M tris HCl pH 6,8 ; *glycerol 70%* (v/v), SDS 10% (b/v), 2-merkaptanol dan biru bromfenol 1% (b/v). Bahan yang digunakan untuk 1 liter dapar elektroda adalah tris HCl 25 mM, glisin 250 mM pH 8,3 dan SDS 0,1%.

b. Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi autoklav (*Hiclave HVE-50 Hirayama*), *beaker glass Pyrex*, penangas air (*Memmert*), *blender (Miyako)*, *Centrifuge (Hettich Zentrifugen EBA-20)*, Pisau, timbangan analitik (*Mettler Toledo*), tabung eppendorf (*Biologix*), *Vortex (Super Mixer Gemmy Industrial)*, tabung reaksi (*Pyrex*), *Micropipet (Bio-Rad)*, *Blue tip (Biologix)*, *Yellow tip (Biologix)*, *White tip (Biologix)*, tabung (*conical Biologix*), *Kuvet (quartz glass Hellma)*, *Refrigerated Centrifuge (Thermo Fisher)* untuk isolasi protein dari jaringan hewan. *Aparatus* elektroforesis

Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad) untuk pemisahan dan karakterisasi protein.
Shimadzu UVmini-1240 Spectrophotometer untuk penentuan kadar protein.

F. Cara Kerja

1. Persiapan

Semua alat yang akan digunakan disterilisasi dengan metode panas basah dalam autoklav pada suhu 121°C selama 20 menit.

2. Pembuatan Sosis Daging

- a. Daging ayam dipotong kecil-kecil kemudian dihaluskan menggunakan blender.
- b. Daging yang sudah halus ditambahkan dengan bahan tambahan lainnya seperti tepung tapioka 10%, bawang putih dan garam dengan konsentrasi daging yang berbeda-beda.

Tabel 1. Komposisi Sosis

Sampel	Konsentrasi	Daging Ayam (gram)	Daging Babi (gram)	Bahan lainnya (gram)
DA	100% DA	25	-	-
DB	100% DB	-	25	-
1	SA 10% DB	21,375	1,125	2,5
2	SA 25% DB	20,25	2,25	2,5
3	SA 50% DB	16,875	5,625	2,5
4	SA 75% DB	11,25	11,25	2,5
5	SA 90% DB	5,625	16,875	2,5
6	SA 100%	22,5	-	2,5
7	SB 100%	-	22,5	2,5

- c. Campur daging yang sudah dihaluskan dengan bahan tambahan hingga homogen.
- d. Adonan yang sudah homogen dimasukkan kedalam selongsong (*casing*) sosis.
- e. Adonan sosis dikukus pada suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian sosis diangkat dan ditiriskan untuk pengujian selanjutnya (Olympias dkk, 2016).

3. Isolasi Protein

Sampel daging ayam dan daging babi segar serta produk olahannya ditimbang 30 mg kemudian dicuci menggunakan *normal saline* dan dihaluskan. Setelah itu ditambahkan reagen ekstraksi sebanyak 300 μ l, dihomogenkan menggunakan *vortex*. Setelah homogen, ditambahkan PMSF 2 μ l, dihomogenkan. Kemudian sampel di sentrifus dingin dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi dingin diambil secara perlahan kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf baru dan disimpan pada suhu 2-5°C.

4. Penentuan Kadar Protein Sosis

a. Pembuatan Kurva Baku

Larutan standar yang digunakan adalah larutan baku albumin. 100 mg standar albumin dilarutkan dalam 10 ml *aquadest*. Konsentrasi BSA dibuat seri kadar 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 dan 0,8; mg/ml. Ditambahkan 4 ml reagen *biuret* dan diamkan selama 40 menit. Absorbansi diukur menggunakan *spectrophotometer UV – Vis* pada panjang gelombang 540 nm. Hasil absorbansi larutan standar konsentrasi standar dibuat grafik untuk menentukan persamaan garis linier.

b. Preparasi Sampel

2 gram sampel dihaluskan, lalu dilarutkan dengan 2 ml *aquadest*. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi pada 250 rpm selama 10 menit sampai terpisah dan ambil supernatan.

c. Pengukuran Absorbansi Sampel

Supernatan diambil sebanyak 1 ml kedalam tabung reaksi, tambahkan 4 ml reagen *biuret* dan diamkan selama 40 menit. Absorbansi diukur menggunakan

spectrophotometer UV – Vis pada panjang gelombang 540 nm. Hasil konsentrasi dapat dihitung dengan memasukan pada rumus persamaan garis linier.

5. Preparasi Reagen SDS-PAGE

a. Larutan *Acrylamide* 30%

29,2 g *acrylamide* dilarutkan dalam 100 ml aquabides, kemudian ditambahkan 0,8 ml N'N'-*bis-methylene-acrylamide*. Larutan disaring dan disimpan pada suhu 4°C.

b. SDS 10%

10 g SDS dilarutkan dalam 90 ml aquabides dicampur dengan hati-hati, kemudian ditambah aquabides hingga 100 ml.

c. 1,5 M Tris – HCl pH 8,8

18 g Basa Tris dilarutkan dalam 60 ml aquabides dicampur dengan hati-hati, lalu sesuaikan pH hingga 8,8 dengan penambahan 6 HCl. Kemudian ditambahkan aquabides hingga 100 ml dan disimpan pada suhu ruang.

d. 0,5 M Tris – HCl pH 6,8

0,6 g Basa Tris dilarutkan dalam 6 ml aquabides dicampur dengan hati-hati, lalu sesuaikan pH hingga 6,8 dengan penambahan 6 HCl. Kemudian ditambahkan aquabides hingga 10 ml dan disimpan pada suhu 4°C.

e. *Loading Sample*

0,5 M Tris – HCl pH 6,8 sebanyak 0,5 ml ditambahkan SDS 10% 2 ml, lalu ditambahkan gliserol 1 ml, *β-mecaptoerhanol* sebanyak 1,25 ml dan

bromophenol blue 1% sebanyak 250 μ l , kemudian aquabides hingga volume total 5 ml.

f. APS 10%

100 mg *Ammonium Peroxodisulfate* dilarutkan dalam 1 ml aquabides.

g. *Staining Solution* (Larutan Pewarna)

0,1 g *Coomasie Brilliant Blue* ditambahkan 45 ml *methanol* dan 10 ml asam asetat glasial, kemudian ditambahkan 45 aquabides hingga volume total 100 ml.

h. *Destaining Solution* (Larutan Pencuci)

20 ml *methanol* ditambah 20 ml asam asetat glasial, kemudian ditambahkan 160 ml aquabides hingga volume total 200 ml.

6. Preparasi Gel SDS-PAGE

Persiapkan cetakan gel *glass spacer* diambil dari wadah yang berisi etanol 70% dicuci dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu. *Glass plate* dan *spacer* dipasang dalam *casting slot*. Sebelum digunakan uji kebocoran dengan cara menuangkan aquades ke dalam *sandwich plate*.

Tabel 2. Formula gel elektroforesis (Sumber: Bio Rad)

Bahan	Separating	Stacking
	gel 10% (ml)	gel 3 % (ml)
Aquades	3.08	1.58
Akrilamid/Bis-akrilamid 30%	1.945	0.25
Tris-HCl 3 M pH 8,8	0.74	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	0.60
SDS 10%	0.06	0.025
APS 10%	0.02	0.02
TEMED	0.01	0.01

- a. *Stacking gel* sebagai gel tempat meletakkan sampel. Pembuatan *stacking gel* terdiri dari larutan stok akrilamid/bis-akrilamid 30%, SDS 10%, 0,5 M tris-HCl pH 6,8; *ammonium peroxydisulfate* (APS) 10% dan TEMED.
- b. *Separating gel* merupakan tempat dimana protein bergerak dan berpindah menuju anoda. Pembuatan *separating gel* terdiri dari larutan stok akrilamid/bis-akrilamid 30%, SDS 10%, 3 M tris-HCl pH 8,8; *ammonium peroxydisulfate* (APS) 10% dan TEMED.

Sebelum penambahan TEMED ke larutan *separating gel*, aquades dalam *sandwich plate* dibuang dan dikeringkan dengan tisu. TEMED dimasukkan ke larutan *separating gel*, dihomogenisasi, dan dituangkan ke dalam *sandwich plate* sampai dengan jarak 1 cm dari permukaan *plate*. Isobutanol ditambahkan pada bagian atas larutan *separating gel* untuk meratakan, membuang gelembung, dan mencegah oksidasi. Kemudian gel didiamkan selama 0,5-1 jam dalam temperatur ruang atau disimpan dalam inkubator pada suhu 37° C untuk mempercepat polimerisasi.

Sebelum penambahan TEMED ke dalam larutan *stacking gel*, isobutanol dibuang dan permukaan gel dicuci dengan aquades lalu dikeringkan dengan tisu. TEMED dimasukkan ke larutan *stacking gel*, dihomogenisasi, dan dituangkan ke atas *separating gel* yang telah mengeras. *Comb* atau sisir segera dipasang. Kemudian didiamkan selama 15-30 menit.

7. Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan pengambilan sampel sebanyak 13 μl kemudian ditambahkan 5 μl *loading buffer*. Marker protein diambil sebanyak 10 μl . Saat *loading buffer* akan ditambahkan ke dalam sampel, proses pengerjaannya dilakukan di lemari asam. Kemudian masing-masing sampel dan marker protein dididihkan pada air yang bersuhu 100°C selama 1 menit.

8. Prosedur Elektroforesis

Profil protein dari sampel dikarakterisasi dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) yang dilakukan dengan metode standar (Hemes, 1998). *Sandwich plate* dilepaskan dari *casting slot*, kemudian dipasangkan ke *aparatus* elektroforesis dan dituangkan elektroforesis buffer pada bagian tengah dan luar *aparatus*. Perlahan sampel dimasukkan kedalam sumuran. Dilakukan *running* protein pada 80 *volt*, hingga sampel mencapai akhir dari *stacking gel*. Kemudian tegangan listrik dinaikkan menjadi 140 *volt*, sampai sampel mencapai ujung *separating gel* (Hermanto, 2009). Diakhir proses sumber listrik dilepas dan gel diambil dari *plates*. *Stacking gel* bagian sumuran dipotong secara perlahan.

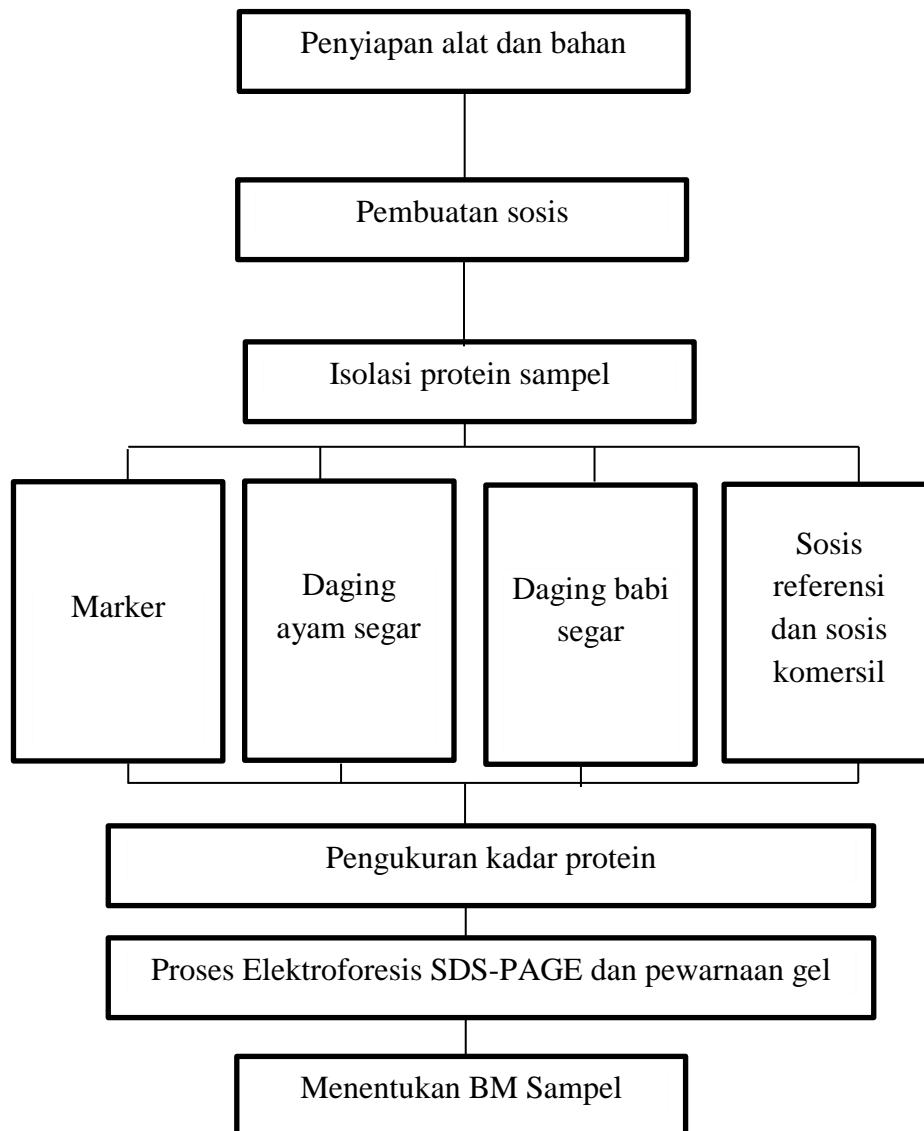
9. Proses Pewarnaan Gel

Gel dibersihkan dari sisa *stacking* kemudian diletakkan dalam wadah yang sudah ditambahkan dengan larutan pewarna *Staining Solution*. Selanjutnya wadah digoyang perlahan selama 60 menit. Kemudian gel dipindahkan dan ditambahkan larutan pencuci *Destaining Solution*, digoyang perlahan selama 30 menit. Angkat gel perlahan dan diletakkan pada *plastic tip*, setelah itu dilakukan pengamatan pada gel.

10. Analisis Bobot Molekul Protein Hasil SDS-PAGE

Analisis bobot molekul (BM) pada masing-masing protein hasil ekstraksi jaringan daging ayam, daging babi, sosis referensi dan sosis pasar dilakukan dengan menggunakan protein marker sebagai standar. Hasil *scanning* pita protein dimasukkan ke dalam kurva persamaan regresi linier sehingga dari persamaan regresi tersebut didapatkan nilai BM protein untuk masing-masing sampel.

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema Langkah Kerja

H. Analisis Data

Analisis data pada pita protein dengan cara membandingkan berat molekul pita protein, baik secara kuantitatif maupun secara kualitatif yaitu dengan membandingkan posisi pita protein sampel dengan protein pita kontrol untuk mendapatkan berat molekul protein sampel. Selain itu membandingkan ada atau tidaknya perbedaan ketebalan antar pita. Analisis secara kuantitatif yaitu menganalisis berat molekul protein dengan melakukan pengukuran nilai mobilitas relatif atau *retention factor* (Rf) (Shourie dan Chopadgaonkar, 2015). Nilai Rf diperoleh dengan cara membagi jarak pita protein dari titik awal migrasi dengan jarak migrasi *loading dye*. Berikut rumus yang digunakan:

$$Rf = \frac{\text{Jarak migrasi pita protein}}{\text{Jarak migrasi loading dye}}$$

Nilai Rf yang telah diperoleh dikonversikan ke log berat molekul melalui persamaan regresi pada kurva standar dari protein kontrol. Nilai log berat molekul sampel dikonversikan ke anti log untuk memperoleh nilai berat molekul pita protein dalam satuan kiloDalton (kDa) (Shourie & Chopadgaonkar, 2015).