

**STUDI KOMPERATIF TERHADAP ANTIGENITAS
MYOSIN HEAVY CHAIN DARI BEBERAPA OTOT
KERANGKA HEWAN**

PAMERAN

16 NOV 1998

SELESAI

Peneliti :

Drh. Dady Soegianto Nazar

Dibiayai oleh Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Dasar
Kontrak Nomor : 20/PPIP/DPPM/96/PPIP/1996 tgl. 22 Juli 1996
Ditbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdikbud

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Januari 1997

1) MOLECULAR BIOLOGY
2) ANTIGENS

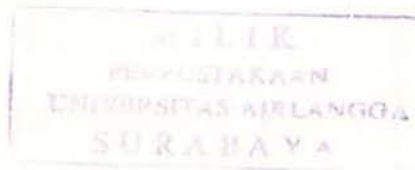
STUDI KOMPERATIF TERHADAP ANTIGENITAS MYOSIN HEAVY CHAIN DARI BEBERAPA OTOT KERANGKA HEWAN

kk@
kk
572-8
Naz
5-1

Peneliti :

Drh. Dady Soegianto Nazar

3000 318983141



Dibiayai oleh Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Dasar
Kontrak Nomor : 20/PPIP/DPPM/96/PPIP/1996 tgl. 22 Juli 1996
Ditbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdikbud

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Januari 1997

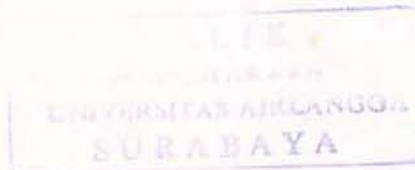
Departemen Pendidikan dan Kebudayaan
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Universitas Airlangga

**STUDI KOMPERATIF TERHADAP ANTIGENITAS
MYOSIN HEAVY CHAIN DARI BEBERAPA OTOT
KERANGKA HEWAN**

Oleh

Dady Soegianto Nazar
Garry Cores de Vries
Achmad Sadik

3000 318 98 3141



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar /DP3M
Depdikbud DIP Nomor : 317/XXIII/3/-/1996 tanggal 30 Maret 1996 dengan Surat
Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor : 22/PPIP/DPPM/96/PPIDP/1996,
Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Ditjen Dikti
Depdikbud



UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|--|
| 1. Puslit dan Pembangunan Regional | 4. Puslit Lingkungan Hidup | 8. Puslit Kependudukan dan Pembangunan |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 5. Puslit dan Pengembangan Gizi | 9. Puslit Bioenergi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 6. Puslit/Studi Wanita | 10. Puslit/Studi Kesehatan Reproduksi |
| | 7. Puslit Olahraga | |

Jl. Darmawangsa Dalam No. 2 Telp. (031) 5342322 Fax. (031) 5342322 Surabaya 60286


IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

=====

1	a. Judul Penelitian	Studi Komperatif terhadap Antigenitas Myosin Heavy Chain dari beberapa Otot Kerangka Hewan
	b. Macam Penelitian	(X) Dasar () Terapan () Pengembangan
	c. Kategori Penelitian	(√) I () II () III
2	Kepala Proyek Penelitian	
	a. Nama lengkap dengan gelar	Dady Soegianto Nazar, MSc.,Drh
	b. Jenis Kelamin	Laki-laki
	c. Pangkat/Golongan dan NIP	Pembina / IVa / 130 687 560
	d. Jabatan Sekarang	Lektor
	e. Fakultas / Jurusan	Kedokteran Hewan / Reproduksi Hewan
	f. Universitas	Airlangga
	g. Bidang Ilmu yang diteliti	Biologi Molekuler
3	Jumlah Tim Peneliti	3 Orang
4	Lokasi Penelitian	Fakultas Kedokteran Hewan - UNAIR
5	Kerjasama dengan Instansi lain	
	a. Nama Instansi	
	b. A l a m a t	
6	Jangka waktu Penelitian	6 (enam) bulan
7	Biaya yang diperlukan	Rp. 15.415.000,-
8	Seminar Hasil Penelitian	
	a. Dilaksanakan Tanggal	15 April 1997
	b. Hasil Penilaian	() Baik Sekali (V) Baik () Sedang () Kurang


Surabaya, April 1997

Kepala Proyek Penelitian,

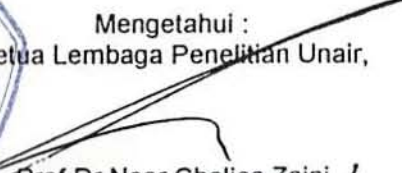

Dady Soegianto Nazar, MSc.,Drh
NIP. 130 687 560

Mengetahui :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan


Prof. Dr. H. Roehiman Sasmita, MS.,Drh
NIP. 130 350 739

Mengetahui :
Ketua Lembaga Penelitian Unair,


Prof. Dr. Noor Cholies Zaini f
NIP. 130 355 372

RINGKASAN

STUDI KOMPERATIF TERHADAP ANTIGENITAS MYOSIN HEAVY CHAIN DARI BEBERAPA OTOT KERANGKA HEWAN. (Dady Soegianto Nazar, Garry Cores de Vries, Achmad Sadik. 1997. 39 halaman)

Myosin Heavy Chain (MHC) dapat diisolasi dan dimurnikan dengan menggunakan *Gel Filtration Column*, dan sifat antigenitasnya dapat menimbulkan antibodi yang spesifik. Dengan uji serologis yang cukup sensitif yaitu *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) dapat digunakan untuk mendeteksi antigen *Myosin Heavy Chain* dari berbagai jenis hewan.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari karakteristik antigenik dari *Myosin Heavy Chain* pada berbagai jenis hewan terhadap kemungkinan penggunaannya untuk mendeteksi jenis/asal daging dalam upaya membantu bidang forensik / polisi veteriner. Langkah pertama adalah preparasi dan isolasi myosin rantai panjang (MHC) yang kemudian dilanjutkan dengan pemurnian isolat MHC dengan teknik *Gel Filtration Column* yang berisi *Sepharose CL-2B*.

Kemudian dilanjutkan dengan langkah kedua untuk menguji antigenitas MHC setelah diisolasi dan dimurnikan MHC dari otot kerangka beberapa jenis hewan (sapi, domba, kambing dan babi). Antibodi poliklonal dihasilkan dari kelinci, yang diinokulasi beberapa kali dengan antigen-MHC dan diisolasi dengan cara khromatografi afinitas pada ikatan *Sepharose 4B-MHC*. Antibodi terhadap MHC dibuat dan dimurnikan terlebih dahulu. Kajian hambatan kompetitif ELISA digunakan untuk mengevaluasi antigenitas MHC dengan antibodi homolog maupun heterolog. Sumur piring mikrotiter dilapisi dengan antigen-MHC. Supaya antigen yang digunakan untuk melapisi dan menghambat dalam reaksi ELISA memberi nilai konsentrasi antigen yang cukup rendah pada daya hambat 50 % maka antigen diambil dari sumber yang sama. Pada keadaan di mana antigen-MHC berasal dari sumber yang berbeda, maka hasil reaksi dengan antibodi yang heterolog bila dibandingkan dengan yang homolog akan membutuhkan konsentrasi

antigen MHC yang cukup tinggi pada daya hambatan 50 % . Hasil ini menunjukkan bahwa antibodi yang terbentuk terhadap antigen MHC hewan lain dari spesies yang sama bereaksi dengan sistem heterolog dan perkembangan protein MHC dipengaruhi oleh banyak faktor. Afinitas terbaik berasal dari reaksi kombinasi yang homolog.

(Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Kontrak Nomor:
22/PPIP/DPPM/96, Tanggal 22 Juli 1996)

SUMMARY

COMPERATIVE STUDIES OF THE ANTIGENICITY OF MYOSIN HEAVY CHAIN (MHC) FROM SKELETAL MUSCLE OF ANIMALS

by

Dady Soegianto Nazar, Garry Cores de Vries and Achmad Sadik
Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University

Myosin Heavy Chain (MHC) can be isolated and purified by gel filtration column, and their antigenicity can be expected to make a specific antibody. A sensitive serological test like Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) can be used to detect Myosin Heavy Chain antigen of many kind of animals.

The mean of this work is to study the antigenicity characteristic of myosin heavy chain of several animal species in order to determinate the original animal of the suspected meat. This is a contribution to the forensic aid or veterinair police. On the first step, deals with the preparation and isolation of myosin heavy chain (MHC), and then followed by purification of myosin heavy chain, isolated on Sepharose CL-2B gel column.

Then followed by the second step for examine the antigenicity of MHC after MHC was isolated and purified from skeletal muscle of many kind of animals (cattle, sheep, goat and pig). Polyclonal antibodies were raised in rabbits against beef myosin heavy chain and isolated by affinity chromatography on myosin heavy chain-bound Sepharose 4B. Antibody against myosin heavy chain had been raised and purified previously. ELISA competitive inhibition analysis was used to evaluate the antigenicity of the beef myosin heavy chain with homologous and heterologous antibodies. Microtitre plates were coated with myosin heavy chain. Provided the coating and inhibiting antigen were of the same source the antigen concentration required for 50 % inhibition gave satisfactorily low values. When of different origin the antibody favoured its homologous counterpart resulting in an underestimation of heterologous antigen test requiring high concentrations of that antigen for 50 % inhibition. The result show that antibodies directed against myosin heavy chain of related species reacted in heterologous systems. Affinity was favoured in homologous combinations.

(Research Institute of Airlangga University, Contract Number : 22/PPIPD/
DPRM/96, Date July 22, 1996)

KATA PENGANTAR

Penanggulangan suatu permasalahan yang kompleks tidak dapat diselesaikan secara tuntas dengan satu disiplin ilmu saja, tetapi sebaiknya oleh pengetahuan yang multi disiplin dengan penggunaan berbagai metode/teknik yang cukup akurat.

Dalam upaya mencerdaskan kehidupan bangsa seperti yang tercantum dalam Pembukaan UUD 45 alinea 4, maka untuk pencapaian ini selain melalui bidang pendidikan, peranan daging sebagai sumber protein hewani penting bagi pembentukan sel-sel otak pada anak-anak Balita.

Daging adalah suatu bahan makanan yang mendekati sempurna, karena mengandung nilai gizi yang lengkap dan dibutuhkan oleh tubuh. Pengetahuan dan penelitian tentang ilmu dan perkembangan teknologi daging adalah sangat esensial karena berkaitan dengan peningkatan kualitas daging. Banyak cara untuk mengontrol kualitas daging dan banyak pula telah muncul ilmu dan teknologi daging yang berasal dari berbagai disiplin ilmu. Namun sejauh mana hal-hal tersebut dapat mengontrol dan dimanfaatkan agar berdaya guna dan berhasil guna, masih perlu dipelajari secara terus menerus dan mendalam. Penelitian sebagai subyek akademik di Perguruan Tinggi hendaknya cenderung diarahkan pada penelitian ilmu dasar dari pada ilmu terapan, agar informasi yang diperoleh bersumber dari tingkatan seluler dan molekuler.

Penelitian ini dapat terlaksana atas bantuan banyak pihak, namun tidak semuanya dapat kami sebutkan. Ucapan terima kasih kami tujukan terutama pada :

(1): Pemerintah Republik Indonesia melalui Direktur Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan R.I. atas bantuan dana yang diberikan dari DIP Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Dasar, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Depdikbud Nomor 317/XXIII/3/-/1996 tanggal 30 Maret 1996.

(2). Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan persetujuan pelaksanaan penelitian ini.

Dengan rendah hati kami menunggu saran dan kritik saudara demi perbaikan makalah ini, semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
SUMMARY	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA	5
Nilai Gizi Daging	5
Struktur Serabut Otot	6
Protein Miofibrilar	7
Faktor-faktor yang berperan terhadap komposisi daging	11
Pemisahan Protein dengan Khromatografi	12
ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>)	14
Pembacaan hasil uji ELISA	19
Aspek Praktis	20
TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	22
METODE PENELITIAN	24
HASIL DAN PEMBAHASAN	29
Pemurnian dan Isolasi Miosin Rantai Panjang (MHC)	29
Sifat ELISA pada penggunaan sistem homolog Ag-Ab dari MHC	31
Antigenitas MHC pada keadaan homolog dan heterolog	33
KESIMPULAN DAN SARAN	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

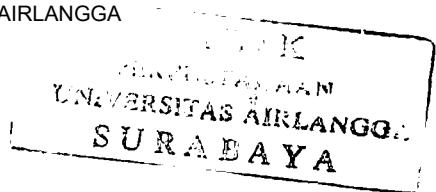
Halaman

Tabel 1. Kajian hambatan kompetitif dengan antibodi spesifik terhadap MHC dari otot kerangka sapi (lulur dan puwer)	34
---	----

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. <i>Polyacrylamid Gel Electrophoresis</i> di dalam SDS dari hasil homogenasi otot kerangka hewan	30
Gambar 2. <i>SDS-Polyacrylamid Gel Electrophoresis</i> dari hasil preparasi otot kerangka lurur dan puer	31
Gambar 3. Hasil purifikasi <i>myosin heavy chain</i> dari otot kerangka dengan <i>Gel Filtration Column</i> yang berisi Sepharose CL-2B. Dikaji dengan SDS-PAGE.	32
Gambar 4. Titrasi MHC otot puer sapi dengan teknik ELISA	36
Gambar 5. Titrasi antibodi monospesifik dengan teknik ELISA	37
Gambar 6. Homogenasi otot kerangka dengan Homogenizer	44
Gambar 7. Pengadukan suspensi daging dalam larutan K-Na buffer dengan stirer	44
Gambar 8. Purifikasi MHC di dalam <i>Gel Filtration Column</i> yang berisi Sepharose CI-2B	45
Gambar 9. Analisis MHC dengan SDS-PAGE	45

PENDAHULUAN



Kualitas gizi yang terkandung di dalam daging sebagai sumber protein hewani tidak saja ditentukan oleh bermacam-macam asam amino dan elemen anorganik yang dikandungnya, tetapi juga ditentukan oleh faktor lain seperti perlakuan yang dialami hewan sebelum dan sesudah disembelih misalnya jenis pakan, umur, proses *rigor mortis* dan lain-lain (Bodwell dan McClain, 1978).

Protein di dalam tubuh hewan merupakan bagian terbanyak sesudah air (DeRobertus dan DeRobertus, 1981). Dari jenis protein di dalam otot kerangka (skelet), miofibril mendapat perhatian yang lebih menonjol dibandingkan sarkoplasma dan jaringan pengikat, terutama miosin yang terdapat sekitar 55 - 60 % dari protein (aktin, aktomiosin, tropomiosin, troponin dan aktinin).

Otot kerangka merupakan jaringan tubuh yang terbesar. Otot berperan di dalam metabolisme tubuh. Tugas dari otot sangat pelik. Peranan otot adalah mengubah energi dari sari makanan (nutrisi) ke dalam kerja mekanik dan pada proses adaptasi hewan terhadap lingkungan. Pada ternak (sapi pedaging) hampir 40-60 % berat tubuh adalah berat karkas. Jadi 35-50 % adalah protein. Jaringan otot ini penting bagi aktifitas makhluk hidup. Jaringan otot terdiri dari serat-serat otot yang kontraktile (elastis). Serat otot terbentuk dari miofibril sedangkan miofibril terdiri dari bermacam-macam protein seperti miosin, aktin, tropomiosin dan troponin. Jaringan serat otot juga mengandung organel sel seperti inti, mitokhondria, lisosom, retikulum, sarkoplasma dan

protein terlarut. Seluruh komponen tersebut termasuk dalam bagian dari sarkoplasma otot yang berfungsi mengatur aktifitas jaringan tersebut.

Miosin ada dua jenis, yaitu dua buah *myosin heavy chain* (MHC) dengan berat molekul 200 kd dan empat buah *myosin light chain* (MLC) dengan berat molekul 16 - 20 kd (Bodwell dan McClain, 1978). MHC merupakan suatu molekul yang sangat evolusioner. Ada bagian tertentu dari MHC Nematoda (*Caenorhabditis elegans*) yang homolog dengan protein pada kelinci. Ada pula bagian tertentu MHC kelinci yang identik dengan protein otot kerangka manusia (Persson, Lofberg dan von der Decken, 1990). MHC berubah konsentrasinya di dalam otot kerangka bila hewan percobaan diberi pakan dengan tingkat energi yang berubah-ubah (Lied dan von der Decken, 1985; von der Decken dkk, 1989). Demikian pula terjadi pada ikan bila diberi estradiol (Olin dan von der Decken, 1987; Olin, Nazar dan von der Decken, 1991).

Protein merupakan sumber asam amino yang dibutuhkan oleh tubuh untuk fungsi fisiologis seperti penyembuhan luka atau pada proses rigor mortis (kematian) (Persson, Lofberg dan von der Decken, 1992). Protein pada otot organisme hidup penting dalam fungsi fisiologis tubuh. Daging merupakan sumber protein yang bergizi tinggi di dalam ransum makanan. Pengetahuan tentang biosintesis protein, struktur dan reaksi kimia protein merupakan dasar pengertian dari proses *pre* dan *post mortem* serta perubahan-perubahan seperti temperatur yang terjadi pada daging dan produk daging. Mengingat pentingnya fungsi daging bagi kelangsungan hidup suatu organisme dan tingginya nilai biologis dan nilai gizi yang dikandungnya, namun komoditi ini mudah rusak dan merupakan media yang

baik bagi pertumbuhan berbagai mikro-organisme serta sering mengalami berbagai usaha pemalsuan. Oleh sebab itu peneliti ingin mengetahui dan mempelajari tentang protein daging berbagai jenis hewan, dalam hal ini miosin rantai panjang (MHC) yang dapat mewakili protein secara keseluruhan (daging tersusun berbagai jenis protein seperti aktin, aktomiosin, tropomiosin, troponin dan aktinin). Untuk maksud tersebut perlu suatu studi pada tingkat molekuler dengan penggunaan teknik pemisahan MHC, purifikasi dan identifikasi jenis protein MHC dari beberapa jenis hewan. Sementara penelitian ini difokuskan pada hewan yang sering digunakan sebagai ternak potong.

Tidak semua jenis protein di dalam otot kerangka perlu diteliti guna menentukan status kualitas daging. Komponen utama dari miofibril adalah miosin khususnya miosin rantai panjang (MHC). Banyak cara untuk mendeterminasi jenis protein berdasarkan urutan susunan asam amino yang dikandungnya, tetapi hal ini bukan untuk mengisolasi fraksi protein yang dikandungnya tetapi hanya sekedar untuk mengetahui atau mendeteksi jenis proteinnya. Teknik denaturasi protein atau pemutusan rantai dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti penggunaan temperatur tinggi atau dengan cara non fisiologis yang lain tetapi dapat mengakibatkan protein tersebut kehilangan aktivitas biologisnya. Hal ini dapat ditanggulangi dengan penggunaan 2-mercapto-ethanol dan urea konsentrasi tinggi. Tetapi untuk tahap determinasi selanjutnya membutuhkan penemuan teknik lain, karena dengan penggunaan *Gas Chromatography* atau *Liquid Chromatography* sangatlah mahal akibat residu urea yang ditinggalkan di dalam saluran column, sehingga membutuhkan biaya perawatan *column* (Lied dan von der

Decken, 1985), maka digunakan cara lain yaitu teknik preparasi dan isolasi fraksi-fraksi protein secara murni dari otot kerangka dengan cara yang sesuai kondisi sarana laboratorium yang ada dan sebagai langkah permulaan dari usaha mempelajari dan memanfaatkan setiap fraksi protein. Selain itu dapat pula diaplikasikan dalam mendeteksi asal daging dari jenis hewan tertentu.

TINJAUAN PUSTAKA

Nilai Gizi Daging

Protein merupakan komponen bahan kering yang terbesar dari daging (otot kerangka). Nilai nutrisi daging yang tinggi disebabkan karena daging mengandung asam-asam amino esensial yang lengkap dan seimbang (Forrest dkk, 1975; Frankel, 1983; Soeparno, 1994). Selain protein, otot mengandung air, lemak, karbohidrat dan komponen anorganik.

Komposisi kimiawi otot skeletal mamalia terdiri dari 75 % air dengan kisaran 68-80 % , protein sekitar 19 % (16-22 %), substansi non protein yang larut 3,5 % serta lemak 2,5 % (1,5-13 %) (Forrest dkk, 1975; Lawrie, 1979; Gracey dan Collins, 1992; Soeparno, 1994). Nilai kalori daging ditentukan oleh kandungan lemak intrasekuler serabut-serabut otot yang dikenal sebagai lemak *marbeling* dan oleh jumlah daging yang dimakan. Kandungan gizi daging dari berbagai bangsa ternak dan ikan berbeda, tetapi setiap 100 gram daging dapat memenuhi kebutuhan gizi setiap hari sebesar 10 % kalori, 50 % protein, 35 % zat besi (Fe) dan 25-60 % vitamin B kompleks (Forrest dkk, 1975; Gracey dan Collins, 1992; Soeparno, 1994). Daging segar berbeda dengan daging olahan dalam jumlah kandungan protein, air, lemak dan mineral.

Protein adalah suatu rangkaian asam amino yang ditautkan satu sama lain oleh ikatan peptida. Asam amino merupakan asam organik dimana atom C (karbon) yang bervalensi 4, salah satu tangannya berikatan dengan gugus karboksil (-COOH), tangan kedua berikatan dengan gugus

amino (-NH₂) dan yang lainnya berikatan dengan salah satu rantai R (gugus C) yang berbeda antara setiap jenis asam aminonya. Terdapat kurang lebih 20 jenis asam amino yang dibutuhkan sel untuk polimerisasi sehingga membentuk suatu molekul protein. Perbedaan asam amino satu dengan lainnya terletak pada jumlah rantai karbon yang dimilikinya.

Struktur Serabut Otot

Otot tersusun dari banyak ikatan serabut otot yang disebut fasikuli, sedangkan serabut otot tersusun oleh banyak fibril yang dikenal sebagai miofibril. Miofibril tersusun dari banyak filamen yang dikenal sebagai myofilamen. Jaringan ikat otot tersusun dari epimesium yang terdapat di sekeliling otot. Perimesium terletak diantara faskuli dan endomesium terdapat disekeliling sel otot atau serabut otot. Setiap jaringan ikat terdiri dari serabut-serabut kolagen. Endomesium mengelilingi membran sel atau disebut sarkolema. Serabut kolagen endomesium kecil dan disebut serabut retikuler.

Sarkolema tersusun dari lipid dan protein miofibrilar. Diameter serabut otot bervariasi antara 10 - 100 μ m. Sarkolema bersifat elastis dan berperan penting pada kontraksi / pemendekan otot, relaksasi dan peregangan otot.

Serabut otot terdiri atas beberapa komponen yaitu : *Sarkoplasma* merupakan sitoplasma serabut otot yang berupa substansi koloidal intraseluler yang berisi air 75-80 %, lipid, granula glikogen, nitrogen nonprotein dan komponen anorganik. Serabut otot skeletal berinti banyak. Jumlah inti diantara serabut otot satu dengan lainnya bervariasi. *Mitokondria* merupakan organela di dalam sarkoplasma. Berfungsi menangkap energi

yang berasal dari metabolisme karbohidrat, lipid dan protein. Mitokondria mengandung enzim-enzim yang dipergunakan di dalam proses metabolisme oksidatif. *Lisosom* adalah gelembung kecil di dalam sarkoplasma yang berisi enzim guna mencerna sel dan isi sel, contohnya katepsin yaitu suatu enzim proteolitik. *Kompleks Golgi* terdiri atas gelembung-gelembung kecil yang berfungsi sebagai tempat penyimpanan produk metabolik dari sel. *Miofibril* adalah organela serabut otot yang berbentuk silindris, panjang dan tipis, berdiameter 1-2 μm . Satu serabut otot yang berdiameter 50 μm , mengandung 1000-2000 miofibril. Miofibril terdiri dari segmen yang disebut sarkomer yang panjangnya saat istirahat adalah 2,5 μm . sarkomer terdiri dari 2 macam miofilamen, yaitu filamen tebal dengan diameter 10-12 μm dan filamen tipis dengan diameter 5-7 μm . *Miofilamen* atau biasa disebut *filamen*. Filamen tebal berbeda dengan filamen tipis dalam hal dimensi, komposisi kimia, letaknya di dalam sarkomer. Filamen tebal otot vertebrata berdiameter antara 14-16 nm dan panjangnya 1,5 μm , dan sebagian besar terdiri atas molekul protein kontraktile miosin sehingga filamen ini dikenal sebagai filamen miosin (Forrest dkk, 1975). Filamen tipis berdiameter 6-8 nm dengan panjang 1 μm . Terdiri dari molekul-molekul protein aktin, sehingga disebut filamen aktin. Setiap filamen miosin dikelilingi oleh 6 filamen aktin.

Protein Miofibrilar

Sebagian besar serabut otot mengandung lebih dari 50 % protein miofibril. Miofibril mengandung 55-60 % miosin dan 20 % aktin (Swatland, 1984; Soeparno, 1994). Protein miofibril lainnya jumlahnya kecil dan hanya

berfungsi mengatur kompleks adenosin trifosfat (ATP)-aktin-miosin. Protein pengatur ini terdiri dari tropomiosin, troponin, 2 buah M-protein, α -aktinin, C-protein dan β -aktinin (Forrest dkk, 1975). *Miosin* adalah protein filamen tebal yang dominan dan proporsi asam-asam amino basa dan asamnya tinggi. *Miosin* mempunyai pH isoelektrik 5,4, mengandung asam amino prolin yang lebih rendah dan lebih fibrus daripada aktin. Molekul miosin berbentuk seperti batang korek dengan bagian tebal pada salah satu ujungnya. Bagian tebal atau disebut kepala miosin ada dua buah, dan batang panjang disebut ekor miosin. Bila miosin diberi enzim proteolitik seperti tripsin maka miosin akan terpisah didekat lehernya menjadi dua fragmen yang berbeda berat molekulnya yaitu : (1) meromiosin ringan dengan berat molekulnya 140.000 Dalton dan (2) meromiosin berat dengan berat molekulnya 340.000 Dalton. Pepsin dapat memisahkan meromiosin berat menjadi 2 subfragmen. Subfragmen pertama tersusun dari dua kepala molekul miosin yang aktif dan mengikat diri pada aktin serta mampu menghidrolisis ATP (Swatland, 1984). Di dalam satu filamen miosin terdapat beratus-ratus molekul miosin. Panjang filamen miosin 1,5 μm , sedangkan ekornya 120 nm. Di tengah setiap filamen miosin terdapat pembesaran yang disebabkan oleh adanya kumpulan M-protein. Protein miofibril mengandung 4 % M-protein. M-protein terdiri dari dua atau lebih protein seperti enzim pemisah glikogen, kreatin kinase dan miomesin (Swatland, 1984, Soeparno, 1994).

Setiap filamen tebal mengandung 40 molekul C-protein yang berjumlah 2-2,5 % dari protein miofibril. C-protein melingkari filamen miosin dan mengikat molekul miosin menjadi satu sehingga membentuk filamen

tebal. C-protein tidak mempunyai aktivitas ATP-ase, tetapi dapat menghambat konsentrasi ion kalsium aktomiosin secara bebas. Sejumlah kecil I-protein terikat pada miosin dan menghambat aktivitas ATP-ase bila tidak ada ion kalsium.

Protein tropomiosin, troponin dan β -aktinin adalah protein filamen tipis atau aktin. Molekul aktin banyak mengandung asam amino prolin. Rantai polipeptida yang dilengkapi dengan gugus amino (=N-H) dari prolin membentuk molekul globular. Monomer aktin ini berbentuk globular maka disebut G-aktin (globular-aktin). Molekul G-aktin berdiameter 5,5 nm. Monomer G-aktin terikat bersama-sama pada F-aktin. Dua untai F-aktin secara spiral saling membentuk lilitan disebut superhelix dan merupakan ciri dari filamen aktin. Filamen aktin berdiameter 6-8 nm dan mempunyai pH isoelektrik 4,7. Setiap filamen tipis (aktin) panjangnya 1 μ m dan mengandung 300-400 G-aktin.

Tropomiosin meliputi 8-10 % protein miofibril dan mengandung asam amino yang bersifat asam dan basa. pH isoelektrik tropomiosin 5,1. Tropomiosin mengandung prolin dalam jumlah kecil yang ikut menentukan sifat fibrus tropomiosin. Tropomiosin larut dalam air dan larutan garam (Swatland, 1984).

Troponin adalah suatu protein glubular, terdapat pada filamen aktin dan tropomiosin, jumlahnya sekitar 8-10 % dari protein miofibril. Troponin adalah protein penerima ion kalsium dan merupakan fungsi utama pembentukan kompleks aktomiosin-tropomiosin. Troponin mengandung prolin dan asam amino aromatik.

α -aktinin dan β -aktinin adalah protein globular yang mempunyai fungsi sebagai pengatur di dalam otot. Komposisi asam aminonya sama dengan aktin. α -aktinin berfungsi sebagai perekat filamen-filamen dan proporsinya 2-2,5 % dari protein miofibril. β -aktinin terdapat pada ujung filamen tipis dan berfungsi untuk mempercepat polimerisasi F-aktin dari G-aktin dan menghambat pembentukan F-aktin yang tidak teratur. γ -aktinin mempunyai fungsi yang berlawanan dengan fungsi β -aktinin yaitu menghambat polimerisasi G-aktin (Swatland, 1984). Konektin atau titin adalah protein elastin di dalam miofibril dan menyebabkan elastisitas longitudinal.

Protein sarkoplasmik terdiri dari enzim-enzim yang berhubungan dengan glikolisis (73 %), kreatin kinase (9 %), mioglobin yang meningkat sesuai dengan umur dan hemoglobin (Forrest dkk, 1975). Enzim glikolitik dan kreatin kinase dapat aktif dalam keadaan anaerob dan berfungsi sebagai penyedia energi untuk kontraksi otot. Protein filamen tipis seperti F-aktin, tropomiosin dan troponin dapat mengikat enzim glikolitik.

Berdasarkan sumber asalnya, protein daging dapat dibedakan menjadi sarkoplasma, miofibril dan tenunan pengikat. Terdapat juga protein-protein khusus pada organ tertentu, membran sel, kulit dan tulang. Protein sarkoplasma adalah cairan di sekeliling dan di dalam miofibril sel-sel otot, berisi bahan-bahan organik dan anorganik, protein dan organel. Contohnya adalah cairan sitoplasma sel. Protein miofibril adalah suatu bentukan protein otot skelet yang kasar dan berfungsi di dalam transduksi mengubah energi kimia ke dalam energi mekanis sehingga terjadi kontraksi dari protein miofibril tersebut. Jenis-jenis protein miofibril adalah miosin,

aktin, aktomiosin, tropomiosin, troponin dan aktinin. Protein jaringan ikat berfungsi sebagai elemen yang mendukung tubuh hewan. Fungsi setiap jaringan ikat berbeda satu sama lainnya, tergantung pada letaknya seperti pada otot, organ, kulit dan lain-lainnya. Terdapat beberapa jenis jaringan ikat yaitu kolagen, retikulin dan elastin.

Miofibril otot skelet mengandung 55-60 % miosin. Miosin terdiri dari 200 sampai 400 molekul dengan panjang 70-75 Angstrom. Terdapat dua jenis miosin yaitu I-meromiosin yang memiliki berat molekul 20 kd dan h-meromiosin yang memiliki berat molekul 210-220 kd dan larut dalam air.

Faktor-Faktor yang berpengaruh terhadap Komposisi Daging

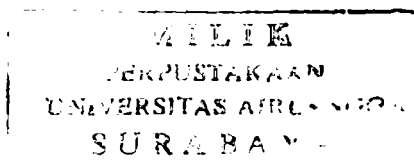
Komposisi fisik dan kimia daging dipengaruhi berbagai faktor yaitu faktor genetik dan faktor lingkungan (fisiologis dan nutrisi). Komposisi kimia daging yang terdiri dari air, protein, lemak dan abu secara proporsional berubah sesuai proporsi salah satu variabel mengalami perubahan. Di dalam bangsa ternak yang sama, komposisi daging dapat berbeda dengan karakternya tersendiri. Faktor genetik dan lingkungan mempunyai hubungan erat. Untuk mengekspresikan kapasitas genetik individu secara sempurna, diperlukan kondisi lingkungan yang ideal (Lawrie, 1979; Soeparno, 1994).

Jenis kelamin, hormon dan kastrasi dapat mengakibatkan perubahan komposisi karkas. Namun jenis kelamin pada domba yang beratnya kurang dari 10 Kg tidak mempengaruhi komposisi karkas (Black, 1983). Faktor lingkungan yang berkaitan dengan fisiologi ternak antara lain temperatur,

iklim dan kelembaban dapat menyebabkan stres. Toleransi ternak terhadap temperatur lingkungan bervariasi, tergantung pada spesies dan lingkungan hidup. Kondisi temperatur (panas dan dingin) yang lama dapat menyebabkan perubahan hormonal.

Laju pertumbuhan tubuh, nutrisi, umur dan berat tubuh adalah faktor-faktor yang mempunyai hubungan erat antara satu dengan lainnya yang biasanya dapat secara individu atau kombinasi mempengaruhi komposisi karkas. Nutrisi merupakan faktor terpenting yang mempengaruhi komposisi karkas, konsentrasi energi dan ratio energi terhadap protein pakan, bahan aditif dan kandungan gizi pakan dapat mengubah komposisi karkas.

Kualitas daging dipengaruhi oleh faktor sebelum dan setelah pemotongan (*ante* dan *post mortem*). Faktor sebelum pemotongan antara lain adalah genetik, spesies, bangsa, tipe ternak, jenis kelamin, umur, pakan, dan stres. Faktor setelah pemotongan adalah cara pelayuan daging, stimulasi listrik, cara memasak, pH daging, cara penyimpanan dan pengawetan daging, macam otot daging dan lokasi dari pada suatu otot daging.



Remisahan Protein dengan Khromatografi

Suatu cara yang umum digunakan untuk memisahkan fraksi-fraksi protein adalah dengan khromatografi, suatu teknik yang dikembangkan untuk memisahkan molekul-molekul kecil seperti asam-asam amino, gula-gula. Prinsip kerja khromatografi ini adalah satu tetes sampel yang ditaruh pada

suatu bahan absorbent yang terbuat dari kertas (paper chromatography) atau lembaran plastik atau gelas yang dilapisi bahan absorbent tipis seperti selulose atau gel silika (thin layer khromatografi). Suatu larutan pelarut seperti air dan alkohol dapat melewati lapisan lembaran tersebut, sehingga molekul-molekul yang ada di dalam pelarut tersebut menjadi terpisah menurut daya larutnya pada kedua pelarut diatas. Yang penting adalah pemilihan pelarut yang tepat sehingga ada molekul yang terlarut berbeda daya ikatnya diantara kedua fase pelarut sehingga akan terbentuk lapisan pelarut yang stasioner pada permukaan bahan absorbent. Jadi terdapat molekul yang stasioner dan molekul yang bergerak mengikuti pelarutnya. Molekul yang angka kelarutannya tinggi akan terus mengikuti pelarut dan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk memasuki fase stasioner.

Pemisahan fraksi protein dengan *Column Chromatography*, prinsip kerjanya hampir sama yaitu suatu larutan protein yang dilalukan melalui sebuah kolom yang berisi suatu bahan padat yang berpori-pori. Protein yang berbeda jenis dan ukurannya akan berbeda pula laju pergerakannya melalui bahan tersebut, sehingga dapat dikoleksi secara terpisah. Pemilihan jenis bahan padat tersebut didasarkan pada ukuran berat molekul atau kemampuan untuk mengikat suatu gugusan kimia tertentu seperti *gel filtration chromatography* dan *affinity chromatography*. *Gel Filtration Column* yang memisahkan protein berdasarkan ukuran berat molekulnya, terbuat dari bahan padat yang membentuk *bead* yang berpori-pori kecil. Molekul yang lebih besar tetapi ukuran diameternya lebih kecil dari pori-pori akan cepat

bergerak turun dibandingkan yang kecil. Jadi cara ini tepat untuk menentukan ukuran molekul.

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*)

Prinsip dari ELISA adalah penggabungan antara antibodi spesifik yang sensitif terhadap uji enzimatik yang menggunakan spektrofotometer sederhana, dengan konyugat antibodi atau antigen yang memberi suatu nilai balik yang cukup akurat. Kini ELISA mengganti peran RIA (*Radio Immuno Assay*), walaupun RIA telah mapan, otomatis dan kadang-kadang lebih sensitif. Pengoperasian ELISA lebih murah, lebih sederhana, tanpa bahaya radioaktif, reagensia dapat tahan lebih lama dan dapat digunakan pada laboratorium kecil yang tidak memiliki fasilitas pengukuran radioaktif sinar γ (Burrin, 1987).

Enzyme Immunoassay (EIA) adalah suatu uji serologik yang cara pemeriksaannya ada dua kelompok, yaitu :

a. EIA Homogen, di mana label enzim pada reagensia menunjukkan perbedaan sifat

bila reagensia tersebut berada dalam keadaan terikat pada lawan reaksinya dibandingkan bila dia berada dalam keadaan bebas, sehingga tidak memerlukan pemisahan antara yang terikat dan yang bebas.

b. EIA Heterogen di mana tidak ada perbedaan sifat dari label enzim bila reagensinya

berada dalam keadaan terikat maupun bebas, sehingga memerlukan pemisahan antara yang terikat dan yang bebas. EIA Heterogen ini dikenal sebagai ELISA.

Prinsip dasar dan jenis teknik ELISA ada 3 kelompok sebagai berikut :

1. Pemberian label pada antigen

a. ELISA Kompetitif untuk penentuan antigen

Antigen yang diberi label ezym dicampur dengan bahan pemeriksaan yang juga mengandung antigen yang sama dan akan ditentukan, sehingga terjadi kompetisi dalam mengikat sejumlah yang terbatas antibodi spesifik yang terikat pada fase padat. Antigen yang terikat kemudian dipisahkan dari yang bebas dengan pencucian, dan aktivitas enzim ditentukan dengan penambahan substrat. Dengan menggunakan suatu kurva baku yang didapat dari larutan-larutan baku yang mengandung pelbagai konsentrasi antigen yang diketahui, dapat ditentukan kadar antigen dalam bahan pemeriksaan. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding terbalik dengan kadar antigen yang terdapat dalam bahan pemeriksaan.

b. ELISA Titrasi untuk penentuan antigen

Prinsip dasarnya hampir sama dengan ELISA Kompetitif, yang berbeda terletak pada penambahan antigen yang berlabel dan antigen yang akan ditentukan (tidak berlabel) tidak dilakukan bersamaan.

Pada ELISA Titrasi, antigen yang akan ditentukan ditambahkan dahulu

pada antibodi spesifik yang berlebihan yang terikat pada fase padat. Setelah waktu inkubasi, bagian yang tidak terikat dibuang dan dicuci dengan bufer, lalu ditambahkan sejumlah tertentu antigen yang berlabel.

c. Solid Phase Anti-Immunoglobulin M ELISA untuk penentuan antibodi (IgM)

AntiHuman IgM diikat pada fase padat lalu ditambahkan serum yang akan diperiksa, sehingga semua IgM dalam serum tersebut akan diikat oleh AntiHuman IgM yang terdapat pada fase padat. Setelah bagian yang tidak terikat dibuang dan dicuci, ditambahkan antigen tertentu yang diberi label dengan enzim, sehingga IgM spesifik terhadap antigen tersebut di atas saja yang dapat mengikat antigen berlabel yang ditambahkan. Aktivitas enzim dari ikatan tersebut ditentukan dengan menambahkan substrat yang mengandung bahan kromogen.

2. Pemberian label enzim pada antibodi

a. Double Antibody Sandwich ELISA

Bahan pemeriksaan yang mengandung antigen direaksikan dengan antibodi spesifik pertama yang terikat pada fase padat. Selanjutnya ditambahkan antibodi spesifik kedua yang berlabel enzim. Akhirnya ditambahkan substrat dari enzim tersebut. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding lurus dengan kadar antigen dalam bahan pemeriksaan. Cara ini hanya dapat dipakai untuk antigen yang cukup besar sehingga dapat mengikat dua molekul besar.

b *Inhibition* ELISA untuk penentuan antigen

Antigen yang akan ditentukan ditambahkan pada antibodi spesifik terhadap antigen tersebut yang telah diberi label (konjugat) dan dalam jumlah tertentu yang berlebihan, sehingga sebagian akan mengikat antigen dalam sampel dan sisanya berada dalam keadaan bebas. Bila campuran tersebut kemudian ditambahkan pada antigen sama tetapi telah terikat pada fase padat, maka sisa konjugat yang masih bebas akan terikat pada antigen tersebut. Aktivitas enzim dari konjugat yang terikat pada fase padat ditentukan dengan menambahkan substrat (bahan kromogen) setelah bagian yang tidak terikat pada fase padat dibuang dan dicuci. Kadar antigen dalam sampel ditentukan dengan kurva baku.

3. Pemberian label enzim pada anti-imunoglobulin

a. ELISA tidak langsung (*indirect*) untuk penentuan antibodi Serum dengan antibodi yang akan ditentukan direaksikan dengan antigen yang terikat pada fase padat. Selanjutnya ditambahkan *antihuman globulin* (AHG) yang berlabel enzim dan akhirnya ditambahkan substrat. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding lurus dengan kadar antibodi yang terdapat dalam bahan pemeriksaan.

b. *Double antibody sandwich antiglobulin* ELISA untuk penentuan antigen

Hampir sama dengan *double antibody sandwich* ELISA, hanya pada *double antibody sandwich antiglobulin* ELISA, antibodi kedua tidak berlabel dan ada tambahan satu tahap lagi yaitu pemberian antihuman globulin yang berlabel enzim. Keuntungan dari cara ini ialah tidak dibutuhkan konjugat khusus untuk setiap jenis antigen yang akan ditentukan. Kerugiannya adalah dengan penambahan satu tahap tersebut, maka kemungkinan untuk membuat kesalahan juga lebih besar.

c *Indirect inhibition* ELISA untuk penentuan antigen

Merupakan gabungan dari *inhibition* ELISA dan ELISA tidak langsung. Tahap awalnya mirip *inhibition* ELISA dan tahap akhirnya mirip ELISA tidak langsung. Pada *indirect inhibition* ELISA, antigen yang akan ditentukan, ditambah dengan sejumlah tertentu antibodi spesifik yang berlebihan terhadap antigen tersebut, sehingga sebagian akan terikat pada antigen yang akan ditentukan dan sisanya berada dalam keadaan bebas. Kemudian campuran ini ditambahkan pada antigen sama tetapi telah terikat pada fase padat maka antibodi bebas yang tersisa dalam campuran. Bila bagian yang tidak terikat pada fase padat dibuang dan dicuci, lalu ditambahkan AHG yang berlabel enzim, maka konjugat tersebut akan terikat pada antibodi spesifik di fase padat. Aktivitas enzim dari konjugat yang terikat pada fase padat, ditentukan dengan penambahan substrat (bahan kromogen). Kadar antigen ditentukan dengan kurva baku.

Enzim yang sering digunakan pada uji ELISA, banyak ragamnya antara lain adalah : *horse-radish peroxidase*, *alkaline phosphatase*, *beta-D-galactosidase*, *glucose-oxidase*, *glucoamylase* dan *acethylcholinesterase*. Dari bermacam-macam enzim tersebut, hanya 2 enzim saja yang paling sering dipakai yaitu *horse-radish peroxidase* (HRP) dan *alkaline phosphatase* (AP). *Horse-radish peroxidase* lebih disukai karena mudah didapat dan dapat memberi perubahan warna yang cerah pada bahan kromogennya.

Pembacaan hasil uji ELISA

Dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu :

- a. Untuk pemeriksaan secara kualitatif / semi kuantitatif, cukup dibaca dengan mata telanjang yaitu dengan melihat adanya perubahan warna.
- b. Untuk pemeriksaan secara kuantitatif, bagian dari substrat yang dipecah perlu diukur dengan spektrofotometer.

Pengaruh terhadap hasil pemeriksaan ELISA, secara umum menyangkut pengenceran serum/darah yang rendah dari bahan-bahan pemeriksaan tersebut dapat mempengaruhi reaksi imunologik maupun enzimatik. Hal ini penting diperhatikan terutama pada penentuan kuantitatif, secara khusus pengaruh terhadap anti-Imunoglobulin antibodi.

Sensitivitas ELISA ini tergantung pada amplifikasi enzim. Dalam bentuk sederhana, produk enzim pertama digunakan untuk menggertak sistem enzim yang kedua yang dapat menghasilkan suatu warna. Enzim pertama tidak perlu diukur tetapi hanya berperan sebagai katalisator

terhadap sistem kedua, maka enzim ini penting dalam sistem ini seperti *aldolase* atau *glucose 6 phosphatase*. Amplifikasi enzim pada uji *double antibody* di mana *alkaline phosphatase*, enzim primer, mendegradasi substrat NADP^+ menjadi NAD^+ dapat diperoleh dengan menggunakan *alcohol dehydrogenase* untuk mengamplifikasi enzim dan zat warna tetrazolium sebagai aseptor redoxi. Untuk memacu alcohol dehydrogenase maka zat warna tetrazolium direduksi menjadi produk warna formazan, yang dapat dikaji dengan spektrofotometer, misalnya *iodonitrotetrazolium violet* dapat direduksi menjadi merah formazan dan *yellow thiazolyl blue* dapat direduksi menjadi biru formazan. Pada keadaan normal sebanyak 500 molekul formazan dapat dihasilkan per menit dengan amplifikasi redox untuk setiap molekul NAD^+ , yang dihasilkan oleh sistem enzim primer. Amplifikasi enzim dapat diperoleh pada satu langkah amplifikasi, di mana enzim dan substrat bereaksi pada saat bersamaan atau dua langkah amplifikasi di mana enzim pertama dihambat sebelum atau selama penambahan enzim kedua dan substrat.

Aspek Praktis

Fase padat yang digunakan pada ELISA mengandung *cross link dextran* atau *polyacrylamide beads*, kertas *filter cellulose* atau tabung *polypropylene*. Yang paling cocok untuk jumlah sampel yang banyak adalah piring mikrotiter *polystyrene* yang *disposable*. Antigen atau antibodi yang dimaksud diikatkan pada fase padat secara adsorpsi pasif atau penggabungan kovalen dengan cyanogen bromida. Sampel antigen atau antibodi biasanya diencerkan dengan bufer yang sama yang mengandung

agen pembasah seperti Triton X-100 yang digunakan untuk mencuci fase padat ikatan antigen. Konjugat antibodi-enzim yang digunakan harus mengandung antibodi yang sangat reaktif, yang diikatkan pada enzim dengan kemampuan berubah yang tinggi. *Alkaline phosphatase* dan *horseradish peroxidase* merupakan enzim yang umum digunakan. *Glutaraldehyde* adalah suatu agen pengikat yang biasa digunakan untuk mengkonjugasikan enzim pada antibodi tetapi membutuhkan grup amino reaktif yang merupakan bagian dari enzim dan antibodi.

Oksidasi periodata dari grup karbohidrat *horseradish peroxidase* menghasilkan grup aldehyd yang akan bergabung dengan grup amino dari immunoglobulin untuk menghasilkan *Conjugate Base Schiff* yang dapat distabilkan dengan direduksikan dengan natrium borohidrat. Substrat enzim harus dalam keadaan stabil, aman dan murah. Substrat tak berwarna berubah menjadi berwarna oleh kerja dari enzim, misalnya *p-nitrophenylphosphate* diubah menjadi kuning-*p-nitrophenol* oleh *alkaline phosphatase*. *Diamino benzidine*, *5-amino salicylate* dan *o-phenylen diamine* digunakan sebagai substrat dengan peroxidase. Sampel kontrol positif dan negatif harus disertakan di dalam setiap seri uji untuk mendapatkan hasil yang akurat dan *reproducible*.

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari perbedaan karakteristik protein MHC yang digunakan sebagai antigen dalam pengujian imunologis (ELISA) dalam upaya membedakan daging dari setiap jenis spesies hewan berdasarkan angka daya hambat 50 % antigen tersebut. Perbedaan angka daya hambatan kompetitif ini digunakan untuk membedakan jenis daging hewan.

Untuk mencapai tujuan tersebut, terdapat beberapa tahapan yang perlu dilakukan seperti berikut ini :

1. Preparasi dan isolasi protein MHC dari jaringan otot kerangka hewan sapi, domba, kambing dan babi.
2. Purifikasi protein MHC melalui *Gel Filtration Column* dan deteksi protein ini dapat dilakukan dengan SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) dan dengan Spektrofotometer.
3. Pembuatan antiserum pada kelinci untuk mendapatkan antibodi spesifik terhadap MHC dari masing-masing hewan sapi, domba, kambing dan babi.
4. Pembuatan konjugat antibodi (antibodi murni) melalui *Gel Filtration Column* untuk digunakan pada pengujian ELISA (Enzyme Linked Immunosorbance Assay) dan dilanjutkan penghitungan angka hambatan kompetitif 50 %.

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pengembangan penelitian lanjutan terhadap jenis protein lainnya di dalam daging, serta dapat pula dimanfaatkan untuk aplikasinya dalam pembuatan Kitt Diagnostik penentuan jenis daging hewan.



METODE PENELITIAN

Metode isolasi miosin rantai panjang (MHC) yang digunakan seperti yang dilakukan oleh Lied dan von der Decken (1985) dengan sedikit modifikasi.

Bahan

Bahan kimia dengan tingkatan analitik digunakan dalam penelitian ini yaitu KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, MgCl , KCl , Na_2PO_4 , LiCl , Glycine, K-Citrat Asam Asetat dan *Amido Black* adalah buatan Merck. Sepharose Cl-2B, Sepharose 4B, *Freund complete adjuvant*, Triton X-100, *Cyanogen Bromide*, *Silver stain* dan ATP diperoleh dari Sigma Chemical Co. Sedangkan EDTA, 2-Mercaptoethanol, *Goat anti rabbit IgG (+L) Conjugate*, *Alkaline phosphatase substrate*, *Phosphate buffer* adalah buatan Biorad. TEMED, *Acrylamide*, *Bisacrylamide*, Tris-HCl, *Sodium Dodecyl Sulphate*, Urea, *Coomassie Brilliant Blue*, *Bovine Serum Albumin*, *Ammonium persulphate*, *Molecular weight markers* dan *p-nitrophenil phosphatase* adalah buatan Promega.

Sampel Daging

Potongan daging bagian puser (*musculus biceps femoris*) dan bagian lurur (*loin, musculus psoas major*) asal ternak potong sapi, domba, kambing dan babi masing-masing diambil seberat 5 - 10 gram langsung saat pemotongan di Rumah Potong Hewan, Surabaya. Setiap sampel daging

yang diambil tersebut adalah duplo yang berasal dari sampel hewan yang berbeda dan dimasukkan ke dalam termos yang berisi Nitrogen cair sehingga membeku, kemudian dibawa ke laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga untuk disimpan dalam Freezer pada -20°C hingga digunakan dalam penelitian.

Preparasi dan Isolasi MHC

Pengerjaan isolasi MHC dilakukan pada temperatur 4°C . Daging seberat 5 gram yang bebas dari serat dan lemak dimasukkan dalam larutan bufer yang berisi 3,4 mM KH_2PO_4 , 15,5 mM Na_2HPO_4 dengan pH 7,5 kemudian dihaluskan dalam mortir dan dihomogenasi dengan alat homogenizer dengan kecepatan perputaran 800 rpm. Kemudian dibuat menjadi suspensi dengan penambahan 50 ml K-Na fosfat bufer, diaduk dengan magnetik stirrer selama satu jam dan disaring dengan kain kasa. Langkah ini juga dilakukan dengan pengadukan selama 18 jam. Kemudian jaringan tersebut disuspensikan dengan dua volume bufer yang berisi 0,7 M KCl, 4,26 mM KH_2PO_4 - 19,5 mM Na_2HPO_4 dengan pH 7,5 dan ditambah 0,15 volume $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ dan MgCl sehingga konsentrasi akhir menjadi 10 mM. Setelah tercampur, lalu dipusingkan pada kecepatan $8.000 \times g$ selama 15 menit. Pindahkan supernatan kedalam 4 volume H_2O dan dipusingkan lagi pada $8.000 \times g$ selama 10 menit. Buang supernatan dan tambahkan 3 volume bufer yang berisi 0,9 M KCl, 6,76 mM KH_2PO_4 - 31,0 mM Na_2PO_4 dengan pH 7,5 untuk melarutkan miosin. Pindahkan cairan ke dalam 10

volume H₂O untuk mempresipitasikan miosin. Pusingkan pada 8.000 x g selama 10 menit. Pelet disuspensikan dengan 5 volume larutan 2,4 M LiCl, 0,1 M KCl, 0,13 M 2-Mercapto-ethanol, 2 mM ATP, 0,1 M Glisin dengan pH 11,35 untuk memisahkan MHC dari MLC. Biarkan larutan tersebut sepanjang malam, kemudian tambahkan K-Sitrat sehingga konsentrasinya menjadi 0,8 M. Pusingkan pada kecepatan 14.000 x g selama 30 menit, kemudian pelet tersebut dilarutkan dalam 0,9 M KCl, 6,76 mM KH₂PO₄ - 31,0 mM Na₂HPO₄ dengan pH 7,5 sehingga konsentrasi protein menjadi 2-3 mg/ml. Tambahkan dengan (volume 1:1) 8 M Urea, 10 mM EDTA, 50 mM Tris HCl bufer pH 8. Setelah itu pusingkan pada 8.000 x g selama 10 menit. Larutan disimpan pada suhu beku.

Purifikasi isolat MHC

Untuk purifikasi lebih lanjut MHC diambil 2,5 ml supernatan untuk dilalukan pada column yang berisi Sepharose Cl-2B yang sebelumnya di-equilibrasi dengan 4 mM Urea, 10 mM EDTA dan 50 mM Tris-HCl bufer.

Hasil koleksi protein dideteksi dengan metode Spektrofotometri dengan pengecatan Perak (Silver staining, Wray *et al.*, 1981) atau dengan pewarnaan *Amido Black* dan menggunakan *bovine serum albumin* sebagai standart, dan analisis MHC dilakukan dengan SDS-PAGE (Hames, 1983).

Isolat MHC disimpan pada suhu beku untuk tahap penelitian selanjutnya.

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Suatu gel acrylamide 10 % dalam SDS 0,1 % digunakan pada penelitian ini. Sebelum dilakukan elektroforesis, sediaan protein diinkubasi pada suhu 100° C selama 3 menit di dalam 2 % SDS - 1 mM 2-Mercaptoethanol. Kemudian setelah electroforesis selesai, gel tersebut diwarnai dengan *Coomassie brilliant blue R-250*.

Pembuatan antiserum kelinci dan isolasi antibodi spesifik terhadap MHC

Pembuatan antiserum terhadap MHC dari masing-masing hewan sapi, domba, kambing dan babi diperoleh dengan cara yang dilakukan oleh Lied dan von der Decken (1985), yaitu dengan mengimunisasi kelinci dengan menyuntikkan secara intra muskuler 300 µg MHC + Freund's complete adjuvant empat kali dengan interval waktu satu minggu. Pengambilan serum setelah 5 hari dari penyuntikan keempat. MHC diikatkan pada CNBr-Sepharose 4B dan antibodi tersebut dimurnikan dengan cara immunoabsorpsi (Kromatografi Afinitas).

Immunoassay

Dilakukan dengan metode ELISA. Untuk melakukan *Test Competitive Inhibition* (Engvall dan Perlmann, 1972), sumur-sumur piring mikrotiter dilapisi dengan 100 µl MHC (0,5 mg/ml) dalam 2,5 mM NaH₂PO₄ - 7,5 mM Na₂HPO₄, 0,45 M NaCl. Antibodi yang terikat pada lapisan antigen dari sumur-sumur tersebut dihambat dengan peningkatan konsentrasi antigen MHC. Kemudian ditambahkan *alkaline phosphatase-conjugated* antibodi

(IgG) dan p-nitrophenil phosphate. Antigen dan antibodi dititrasi menurut cara standart. Kadar MHC dihitung dengan spektrofotometer dan analisis regresi.

Analisis

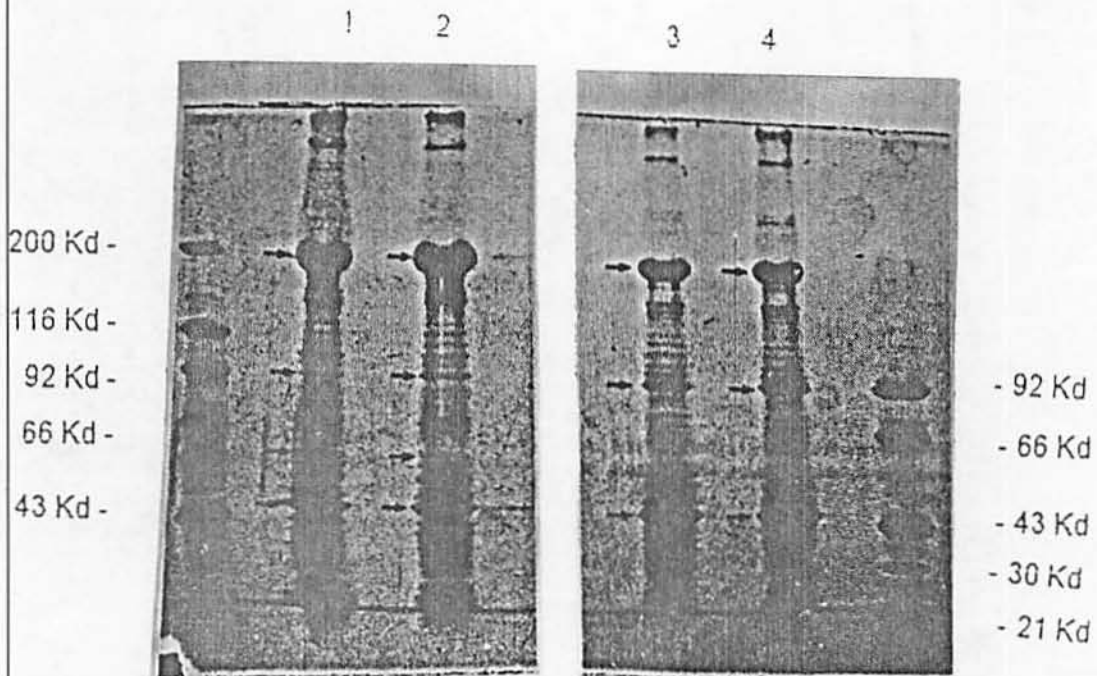
Data yang terkumpul dihitung nilai rata-rata dan simpangan bakunya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

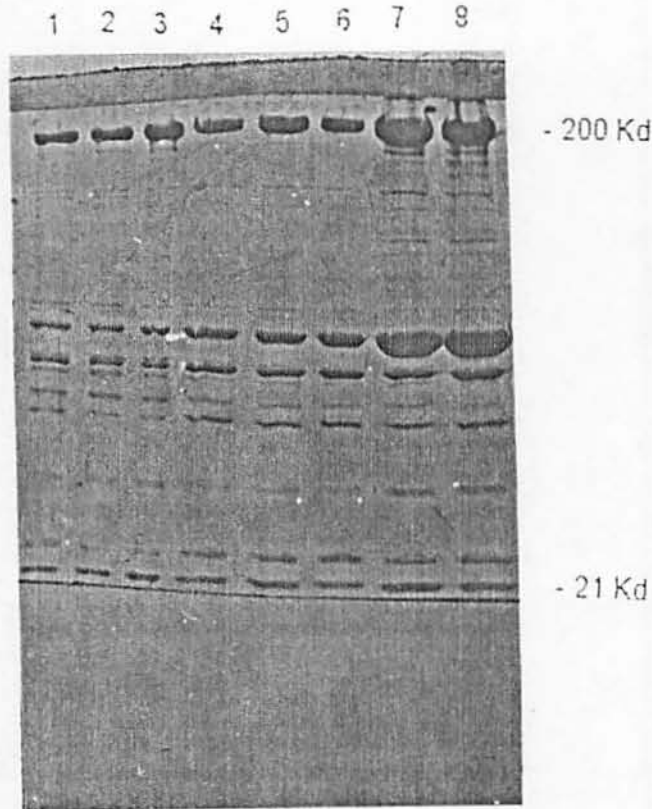
Pemurnian dan Isolasi Miosin Rantai Panjang (MHC)

Preparasi MHC dari sampel otot kerangka dikerjakan seperti pada protokol yang tertulis pada metodologi penelitian ini, yang dilanjutkan dengan pemurnian dan isolasi MHC pada khromatografi kolumn (*Gel Filtration Column*) yang berisi Sepharose Cl-2B (lihat Gambar 1 dan 2). Hasil preparasi MHC dengan sedikit modifikasi dari metode yang dikembangkan oleh Lied dan Von der Decken (1985) yaitu dengan penambahan *adenosin triphosphate* (ATP), memberikan isolat MHC yang lebih banyak bila dibandingkan dengan tanpa menggunakan ATP. Hasil ini menunjukkan bahwa ATP berinteraksi dengan dua domain yang berbeda dari Calcium-ATPase yang berperan sebagai katalisator (Lacapere, Bennet, Dupont dan Guillain, 1990). Domain pertama mengikat bagian adenosin dari substrat, dan pH-nya tergantung pada partisipasi H⁺ yang terikat pada ADP. Domain kedua sebagai katalisator berikatan dengan γ -phosphate dan ion magnesium dari kompleks Mg-ATP dan menghasilkan interaksi elektrostatik antara substrat dan enzim (Lacapere dkk, 1990). Pemisahan biomolekul pada agarose Sepharose Cl-2B dilakukan dalam keadaan kondisi normal tanpa penggunaan pompa peristaltik. Miosin rantai pendek (*Myosin Light Chain*, MLC) dipisahkan dari MHC dengan menggunakan cara tersebut diatas (Gambar 3). Antibodi poliklonal yang digunakan terhadap antigen MHC bersifat spesifik. Antibodi ini dimurnikan dengan mengikatkan MHC pada

CNBr-Sepharose 4B aktif, antiserum akan terus melalui bead dan antibodi yang spesifik terhadap MHC akan tetap terikat pada matrik.



Gambar 1. *Polyacrylamid Gel Electrophoresis* di dalam SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) dari hasil homogenasi otot kerangka hewan : kolom 1 kambing, kolom 2 domba, kolom 3 sapi dan kolom 4 babi. Visualisasi pita protein dengan pengecatan Perak (Silver staining). Berat molekul protein dapat dilihat pada marker mulai dari 200 kd (myosin heavy chain), 116 kd, 92 kd, 66 kd, 43 kd (actin 45 kd), 30 kd dan 21 kd yang ditunjukkan dengan tanda panah. Myosin light chain 16-20 kd.

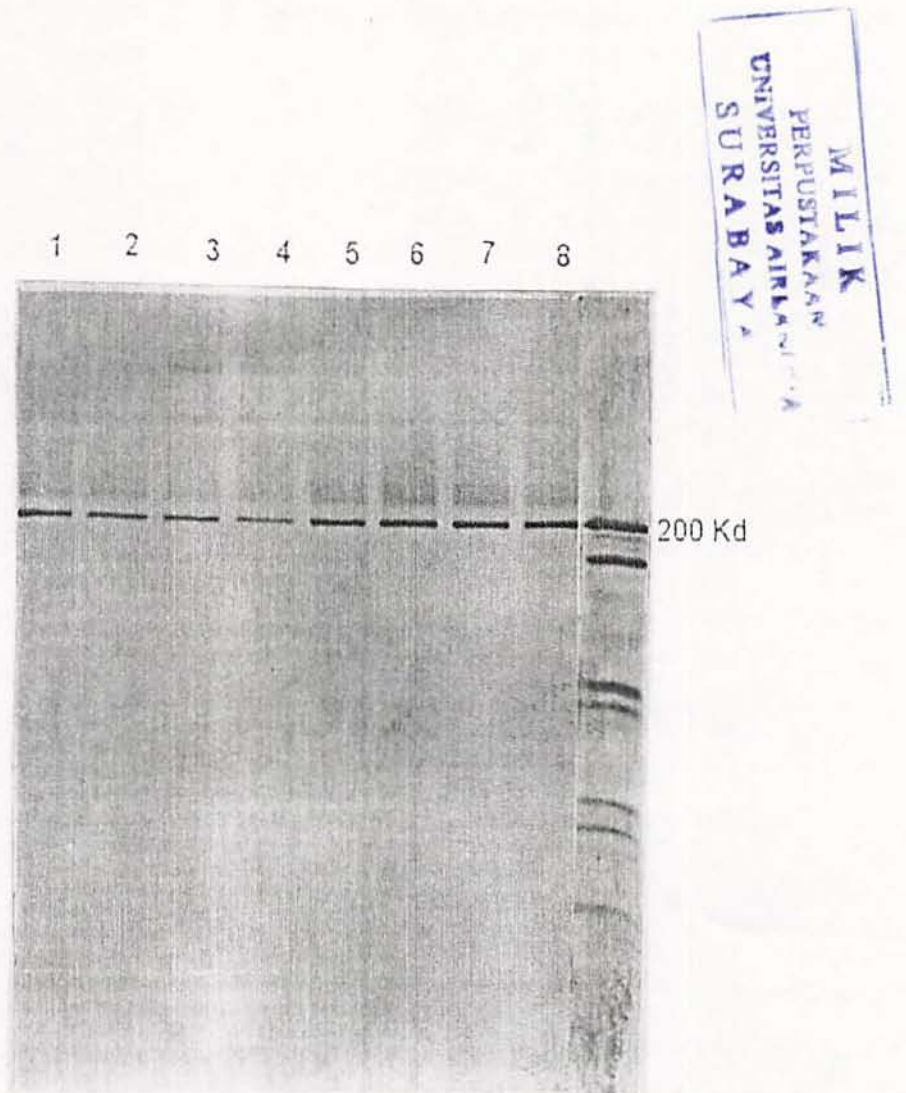


Gambar 2. SDS-Polyacrylamid Gel Electrophoresis dari hasil preparasi otot kerangka : kolom 1 lulur (loin, musculus psoas major) sapi, kolom 2 puwer (m. biceps femoris) sapi, kolom 3 lulur kambing, kolom 4 puwer kambing, kolom 5 lulur domba, kolom 6 puwer domba, kolom 7 lulur babi dan kolom 8 puwer babi. Pita paling atas adalah *myosin heavy chain* (BM 200 kd), sedangkan pita yang bawah adalah *aktin* (43 kd) dan *myosin light chain* (16-20 kd).

Sifat ELISA pada penggunaan sistem homolog antigen-antibodi dari MHC

Teknik ELISA yang diterapkan disini adalah untuk menitrasi antigen dan mengkaji lebih lanjut reaksi antigen dengan antibodi yang monospesifik (Gambar 4). Suatu peningkatan linier pada permulaan percobaan dengan konsentrasi log antigen 1 $\mu\text{g/ml}$ hingga mencapai garis yang mendatar (plateau). Dengan meningkatkan konsentrasi antigen hingga menjadi 5

$\mu\text{g/ml}$ terhadap titrasi antibodi pada pengenceran 1 : 250 dari serum memberikan reaksi maksimum dan akan menurun reaksinya sekitar 20 % pada pengenceran 1 : 1000 (Gambar 4).



Gambar 3. Hasil purifikasi *myosin heavy chain* dari otot kerangka dengan *Gel Filtration Column* yang berisi Sepharose CL-2B. Dikaji dengan SDS-PAGE. Kolom 1 mengandung kumpulan fraksi protein lula sapi dari tabung nomor 9 - 16. Kolom 2 kumpulan fraksi protein puwer sapi dari tabung nomor 11 - 19. Kolom 3 dan 4 merupakan kumpulan fraksi protein lula dan puwer kambing dari masing-masing tabung 10 - 19. Kolom 5, 6, 7 dan 8 merupakan kumpulan fraksi protein masing-masing secara berturut-turut lula dan puwer dari domba dan babi yang berasal dari tabung nomor 6 - 10, 11 - 17, 12 - 19 dan 7 - 12.

Antigenitas MHC pada keadaan Homolog dan Heterolog

Antigenitas MHC otot kerangka hewan seperti lulur sapi atau puer kambing telah dibandingkan dengan otot kerangka bagian lain dari beberapa jenis hewan (sapi, kambing, babi) yang berbeda dengan menggunakan teknik ELISA dan uji hambatan kompetitif (*competitive inhibition test*) (Tabel 1). Ketika sumur piring mikrotiter dilapisi dengan MHC otot lulur sapi tampak bahwa pada daya hambatan 50 % diperoleh hasil dari sistem homolog antigen-antibodi, antigen hambatan sebesar 8,1 μg protein MHC. Sedangkan antigen otot puer sapi, nilai ini mencapai 5,85 μg protein MHC. Pada sistem heterolog antigen-antibodi, antigen hambatan lulur kambing sebesar 12,3 μg protein MHC, puer kambing sebesar 9,35 μg protein MHC, lulur babi sebesar 48 μg protein MHC dan puer babi sebesar 53 μg protein MHC. Ketika sumur piring mikrotiter dilapisi dengan MHC otot puer sapi tampak daya hambatan 50 % diperoleh hasil dari sistem homolog antigen-antibodi dan menggunakan antibodi spesifik terhadap MHC sapi maka angka hambatan 50 % antigen puer sapi adalah sebesar 3,51 μg protein MHC dan 8,55 μg protein MHC untuk antigen otot lulur sapi. Pada sistem heterolog antigen-antibodi, antigen hambatan lulur kambing sebesar 10,25 μg protein MHC, puer kambing sebesar 4,95 μg protein MHC, lulur babi sebesar 51 μg protein MHC dan puer babi sebesar 45 μg protein MHC. Demikian pula bila sumur piring mikrotiter dilapisi dengan antigen MHC otot lulur kambing atau puer kambing atau lulur babi, maka daya hambat 50 % diperoleh hasil dari sistem homolog antigen-antibodi maupun sistem

heterolognya dapat dilihat pada tabel 1. Jadi efisiensi hambatan (nilai daya hambatan 50 % terendah) tampak pada otot puer sapi yang digunakan sebagai pelapis sumur piring mikrotiter dan antigen hambatan.

Reaksi antigen-antibodi memperlihatkan afinitas yang lebih besar dalam sistem homolog daripada kombinasi heterolog. Untuk pengembangan dari reaksi imunologi yang digunakan tergantung pada sumber antigen yang digunakan untuk melapisi sumur piring mikrotiter dan sumber antigen yang digunakan untuk uji hambatan. Antigen yang digunakan untuk melapisi sumur piring mikrotiter dan antibodi yang berasal dari sumber yang sama lebih baik hasil reaksi imunologinya dibandingkan antigen yang diperoleh dari sumber yang berbeda dan sama halnya pada reaksi uji hambatan. Antigen otot lurus di dalam sistem otot puer dari jenis hewan lain memperlihatkan kurangnya afinitas terhadap antibodi otot puer dibandingkan antigen otot puernya sendiri.

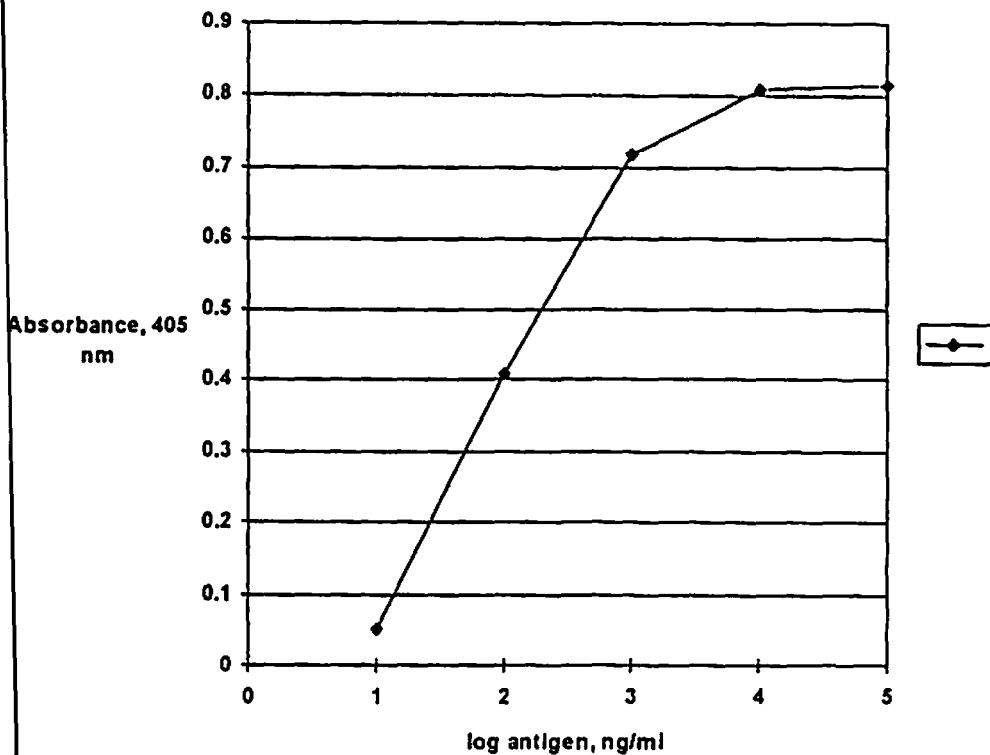
Tabel 1. Kajian hambatan kompetitif dengan antibodi spesifik terhadap MHC dari otot kerangka sapi (lurus dan puer)

Ag Pelapis	Daya Hambatan 50 % , mg protein MHC							
	Sumber Antigen							
	L-Sp	P-Sp	L-Kb	P-Kb	L-Db	P-Db	L-Bb	P-Bb
L-Sp	8,1±0,2	5,8±0,3	12,3±0,4	9,3±0,7	TU	TU	48	53
P-Sp	8,5±0,4	3,5±0,6	10,2±0,4	4,9±0,15	TU	TU	51	45
L-Kb	12,14	12,35	4,93	6,64	TU	TU	TU	TU
P-Kb	10,42	7,81	5,26	5,53	TU	TU	TU	TU
L-Db	TU	TU	TU	TU	TU	TU	TU	TU
P-Db	TU	TU	TU	TU	TU	TU	TU	TU
L-Bb	TU	TU	TU	TU	TU	TU	1,51	3,05
P-Bb	TU	TU	TU	TU	TU	TU	TU	TU

Keterangan : Sumur piring mikrotiter dilapisi dengan MHC otot lulu dan puwer sapi , MHC otot lulu dan puwer kambing serta MHC otot lulu babi masing-masing sebanyak 0,5 µg protein/ml. Hambatan kompetitif dibuat dari antigen otot lulu dan otot puwer dari sapi, kambing dan babi. Antibodi langsung dihadapkan pada MHC otot kerangka tersebut. Nilai daya hambatan 50 % dihitung berdasarkan kajian regresi. Hasil yang diperoleh merupakan angka rata-rata ± SB yang berasal dari dua ulangan. Sedangkan angka tanpa SB dilakukan tanpa ulangan.

L = lulu, P = puwer, Sp = sapi, Kb = Kambing, Db = domba, Bb = babi
TU = Tidak diuji, SB = simpangan baku

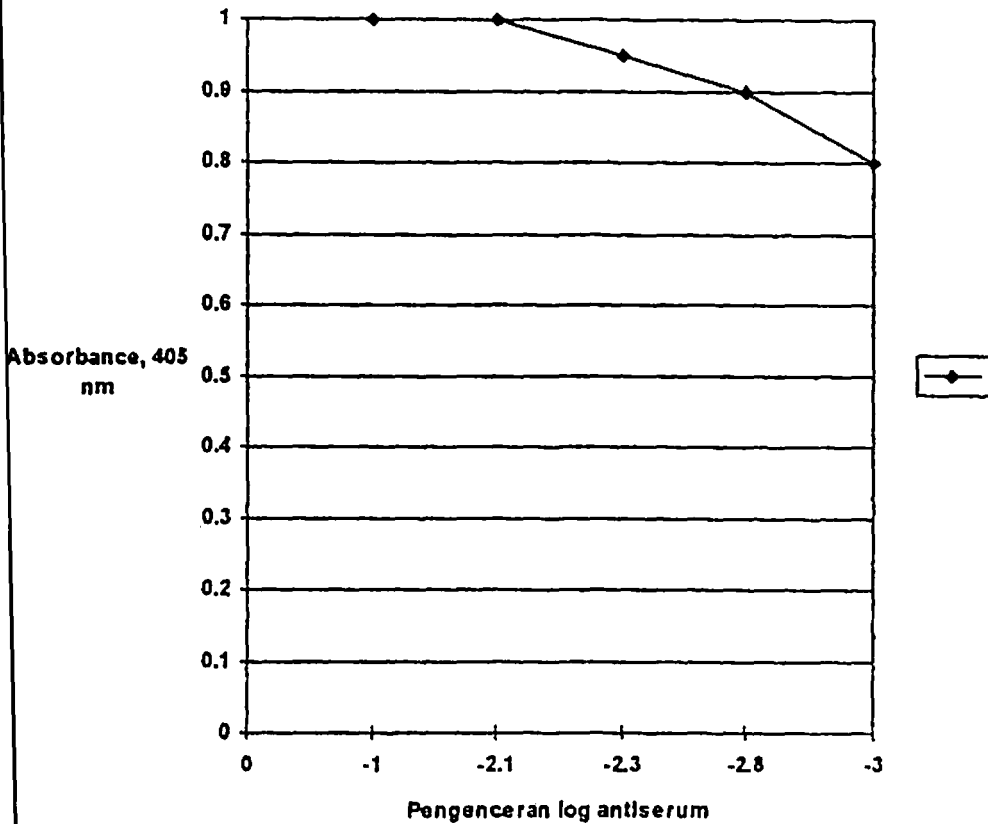
Hasil ini diluar perkiraan dari jumlah MHC yang ada pada sampel pada uji tersebut. Pelapisan sumur piring mikrotiter dengan antigen otot lulu dapat menyebabkan antibodi otot puwer bereaksi penuh dengan antigen penghambat otot lulu, hal ini menunjukkan bahwa MHC otot lulu mengandung tempat ikatan antigen yang afinitasnya cukup tinggi, tetapi lebih rendah dari protein otot puwer. Bila diperbandingkan pada keadaan sistem yang sama, MHC daging puwer menunjukkan reaksi yang paling baik. Dilihat dari kurva baku otot kerangka dan pelapisan terhadap sumur piring mikrotiter konsentrasi MHC yang tinggi dari otot kerangka lulu diperoleh sekitar 25 % dari jumlah keseluruhan protein otot kerangka lulu. Hal ini sama seperti yang didapatkan pada penelitian dengan daging ikan Salmon (Olin, Nazar dan von der Decken, 1991).



Gambar 4. Titrasi MHC otot puer sapi dengan teknik ELISA

Keterangan : Sumur piring mikrotiter dilapisi MHC otot puer sapi dengan konsentrasi yang makin meningkat dan diinkubasi dengan antiserum pada pengenceran 1:1000 kemudian dilanjutkan inkubasi dengan penambahan kunjugat anti-antibodi (IgG Kelinci) dan alkaline phosphatase dan substrat enzim.

Sifat antigenitas dari MHC otot kerangka dapat dihasilkan antibodi poliklonal yang melalui pendekatan immunologis dapat dikaji protein daging dengan menghasilkan informasi tentang efek dari berbagai perlakuan seperti jenis pakan ternak yang diberikan, cara pemeliharaan, proses rigor mortis dan lain-lain terhadap kondisi fisiologis dari protein myofibril MHC.



Gambar 5. Titrasi antibodi monospesifik dengan teknik ELISA

Keterangan : Sumur piring mikrotiter dilapisi antibodi monospesifik dengan konsentrasi yang makin menurun dengan cara pengenceran antiserumnya. Kemudian piring mikromikrotiter diinkubasi dengan antigen ($5 \mu\text{g/ml}$) dan ditambahkan konjugat antibodi dan substrat enzim.

Antibodi poliklonal yang digunakan terhadap lebih dari satu jenis antigen, akan meningkatkan jumlah reaksi antigen-antibodi dari MHC. Antibodi monoklonal dari otot yang aktif dan yang tidak aktif berbeda antara 2 *gene* yang menghasilkan molekul MHC selama perkembangan otot fetus. Protein pada tempat penempelan yang spesifik memiliki determinan antigen umum. Antibodi poliklonal telah menjadi berkembang bila seluruh isi *gene* yang menghasilkan miosin dikaji.

Sumbangan penelitian ini memberikan pengertian yang lebih mendalam tentang penggunaannya dalam kajian hambatan kompetitif ELISA. Pelapisan sumur piring mikrotiter dengan antigen yang sama yang digunakan dalam uji hambatan namun berbeda sumber antibodinya terhadap MHC antara spesies yang sama atau hampir sama memberi hasil yang memuaskan dengan hanya membutuhkan konsentrasi antigen yang kecil untuk hambatan 50 % dari reaksi antigen-antibodi. Hasil ini menunjukkan urutan evolusi dari MHC otot kerangka. Afinitas yang baik terjadi pada sistem homolog.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Penggunaan ATP dalam preparasi dan isolasi miosin rantai panjang (MHC) ini memberi hasil isolat yang lebih banyak dibanding dengan metode dari Lied dan von der Decken (1985).

Myosin rantai panjang (MHC) otot kerangka sapi, kambing dan babi memiliki sifat antigenitas yang baik dengan menghasilkan antibodi poliklonal.

Saran

Untuk kajian imunologi yang lebih mendalam perlu dilanjutkan penelitian ini pada jenis hewan lain (liar) dan dengan ulangan yang lebih besar agar akurasi hasil lebih baik dan perlu dikembangkan antibodi monoklonal yang spesifik sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi jenis daging dari spesies hewan.

DAFTAR PUSTAKA

Black, J.L. 1983. Sheep Production. Editor W. Haresign. Univ. Nottingham. Butterworth, London.

Bodwell, C.E. and **P.E. McClain.** 1978. In the Science of Meat and Meat Product by J.F. Price and B.S. Schweigert. 2Ed. W.H. Freeman and company, San Fransisco.

Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.

Burrin, D.H. 1987. Immunochemical techniques. In K. Wilson and H. Goulding (Editor). A biologist's guide to principles and techniques of practical biochemistry. 3rd Ed. Edward Arnold Publishers Ltd, Baltimore, Maryland.

DeRobertus, E.D.P. and **E.M.F. DeRobertus.** 1981. Essential of Cell and Molecular Biology. Holt-Saunders Internationale Editions, Japan.

Engvall, E. and **P. Perlmann.** 1972. Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA III, Quantitation of Specific antibodies by Enzyme-labelled Anti-Immunoglobulin in Antigen-coated tubes. J. Immunol. 109 : 129-135.

Forrest, J.C., E.B. Aberle, H.B. Hedrick, M.D. Judge and R.A. Merkel. 1975. Principle of meat science. W.H. Freeman and Co, San Fransisco, California.

Gracey, J.F. and **D.S. Collins.** 1992. Meat Hygiene. Nine Edition. Bailliere Tindall, London.

Hames, B.D. 1983. An Introduction to Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: Electrophoresis of Proteins. B.D. Hames and D. Rickwood (Eds.), IRL Press, Oxford, pp. 1-91.

Lacapere, J.J., N. Bennet, Y. Dupont and F. Guillain. pH and Magnesium dependence of ATP binding to Sarcoplasmic Reticulum ATPase. Evidence that the catalytic ATP-binding site consist of two domains. J. of Biological Chemistry. 265 : 348-353.

Lawrie, R.A. 1979. Meat Science. 3rd Edition. Pergamon Press.

Lied, E. and **von der Decken.** 1985. Purification of Fish Muscle Myosin Heavy Chain and quantification of the Specific Polyribosome-Bound Polypeptide. Biochem. J. 232: 467-470.

Nazar, D.S., G. Persson, T. Olin, S. Waters and von der Decken. 1991. Sarcoplasmic and Myofibrillar Protein in White Trunk Muscle of Salmon (*Salmo salar*) After Estradiol Treatment. *Comp. Biochem. Physiol. J.* 98 B: 109-114.

Nazar, D.S., G. Cores de Vries dan D. Rahardjo. 1996. Isolasi dan antigenitas Myosin Heavy Chain (MHC) otot skelet hewan dengan teknik Gel Filtration Column dan ELISA. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.

Olin, T. and A. von der Decken. 1987. Estrogen Treatment and its Implication on Vitellogenin and Myosin Synthesis in Salmon (*Salmo salar*). *Physiol. Zool.* 60 : 346-351.

Olin, T., D.S. Nazar and von der Decken. 1991. Respon of Epaxial Muscle and Liver to 17- β -Estradiol in Fed and Starved Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 99: 179-191.

Persson, G., E.H.A. Lofberg and A. von der Decken. 1992. Antigenicity of Myosin Heavy Chain from Skeletal Muscle of Fish Species and Humans as Determinated by ELISA Technique. In Press.

Soeparno. 1994. Ilmu dan Teknologi Daging. Edisi ke-2. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Swatland, H.J. 1984. Structure and Development of Meat Animals. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

von der Decken, A., T. Olin, S. Waters, D. S. Nazar, G. Persson and A. Westman. 1989. Response of Hepatic and Skeletal Muscle Proteins to the Onset of Vitello genesis Induced by Estradiol. *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish.* pp. 443-450.

Wray, W., T. Boulikas. V.P. Wray and R. Hancock. 1981. Silver staining of protein in Polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 118: 197-203.

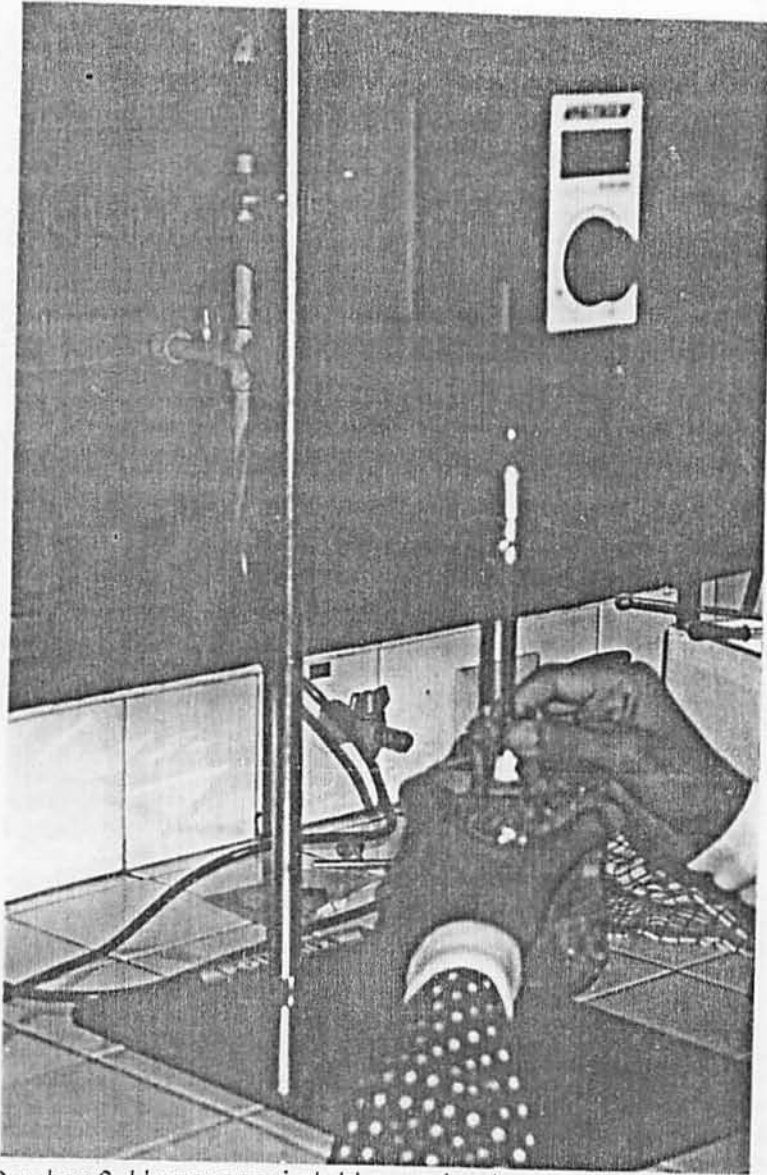
LAMPIRAN

Personalia Tenaga Peneliti

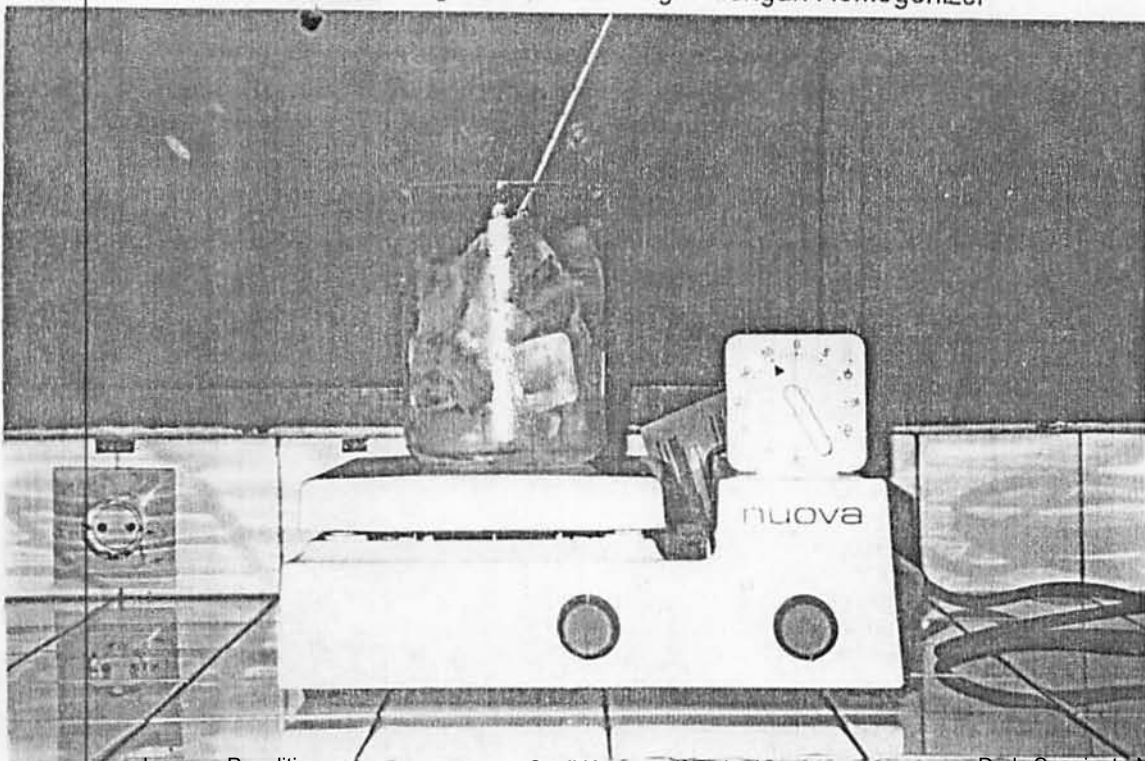
Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Diperoleh dari Institut
Dady Soegianto Nazar, MSc, Drh	Fish Physiology & Biology	University of Stockholm
Garry Cores de Vries, MS, MSc, Drh	Microbial Genetics & Epidemiology	Karolinska Institute, Stockholm
Achmad Sadik, Drh	Immunology & Biopathology	National Institute for Animals Health, Tokyo

Peralatan Penelitian

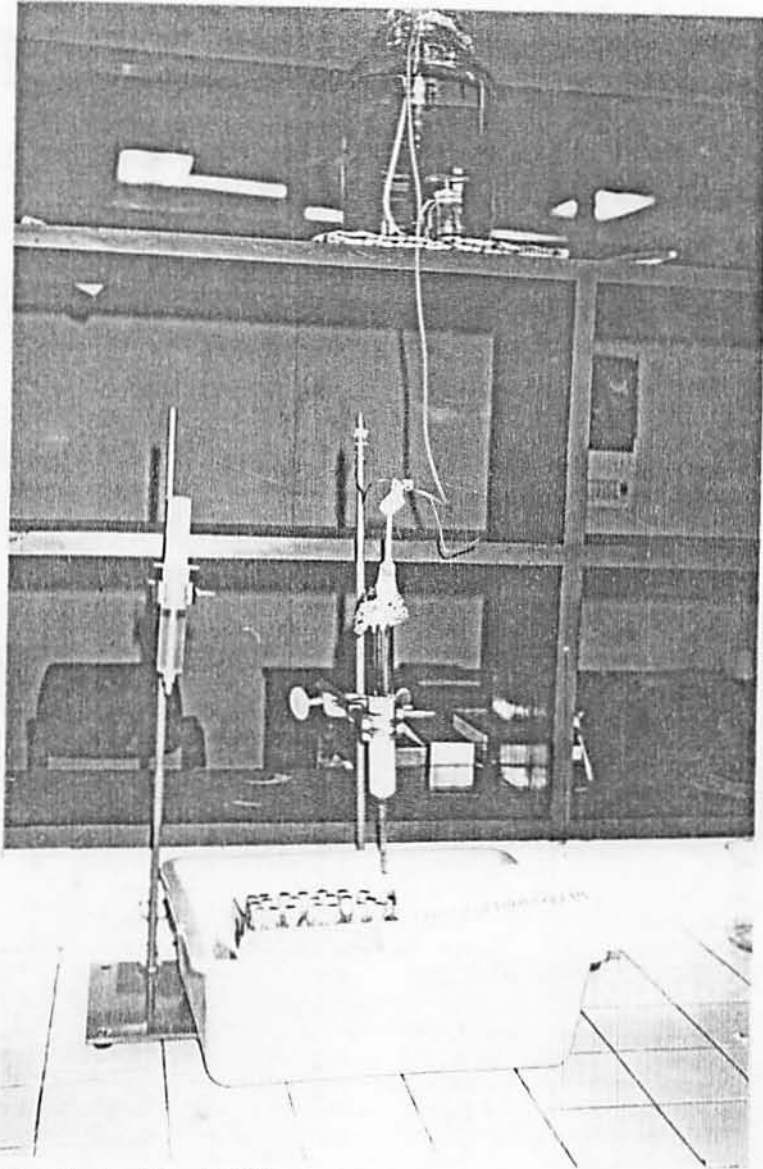
Gel Filtration Column
Electrophoresis Horizontal (Submarine)
Electrophoresis Vertical
Microplate Reader (ELISA)
Spectrophotometer UV-Vis
Centrifuge
Refrigerator
Micropipette adjustable 1-10 μ l
Micropipette adjustable 50-200 μ l
Magnetic Stirrer
Homogenizer



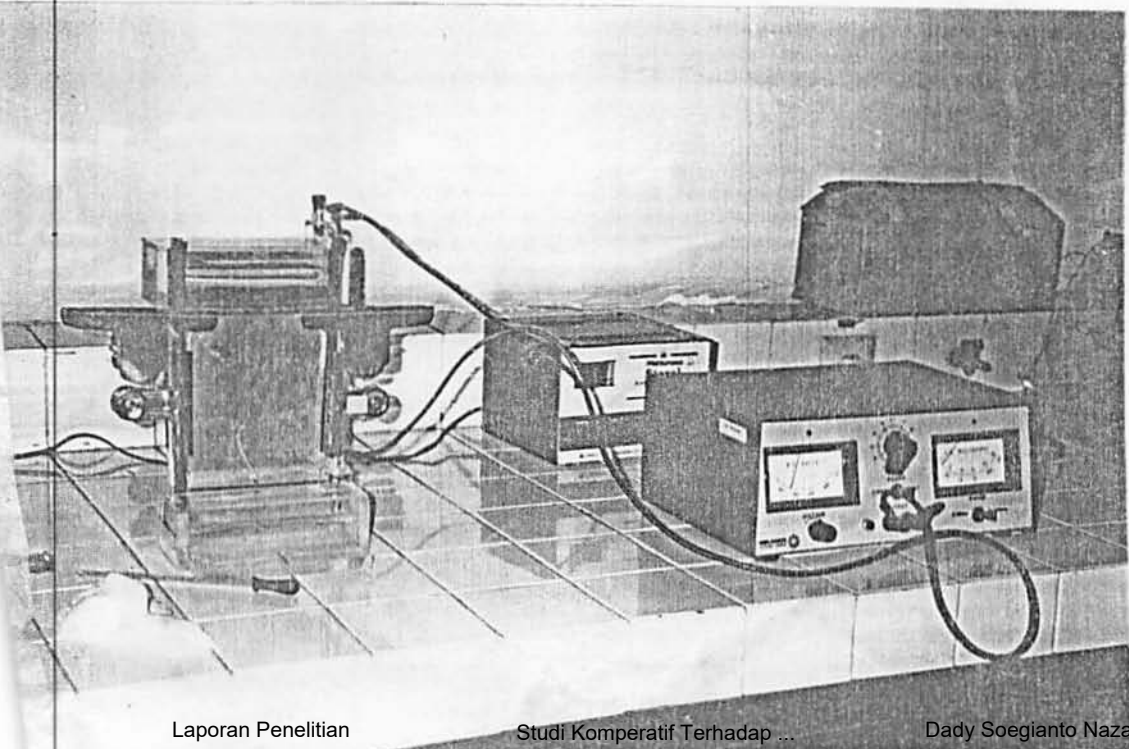
Gambar 6. Homogenasi otot kerangka dengan Homogenizer



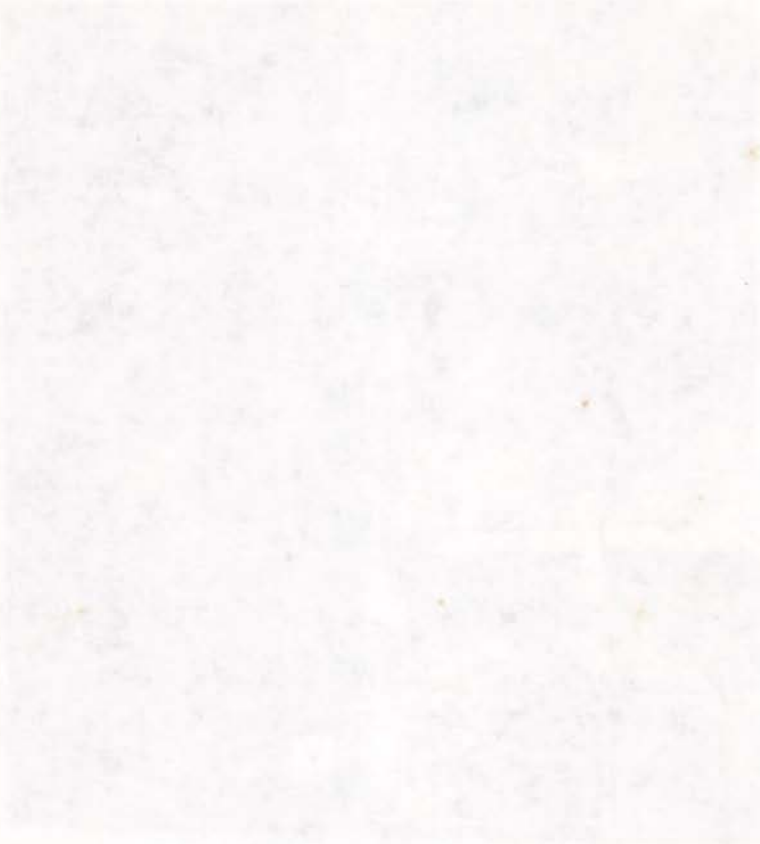
Gambar 7. Pengadukan suspensi daging dalam larutan K-Na buffer dengan Stirer



Gambar 8. Purifikasi MHC di dalam Gel Filtration Column yang berisi Sepharose CI-2B



Gambar 9. Analisis MHC dengan SDS-PAGE



[Handwritten signature]

Tanda tangan
Peminjam