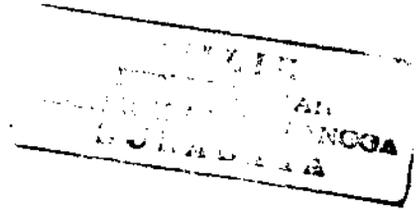


TESIS

IDENTIFIKASI PROTEIN DAGING SAPI DAN BABI DENGAN ELEKTROFORESIS GEL POLIAKRILAMID-SODIUM DODESIL SULFAT (SDS-PAGE)



ANING PURWANINGSIH

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**IDENTIFIKASI PROTEIN DAGING SAPI DAN BABI
DENGAN ELEKTROFORESIS GEL POLIAKRILAMID-SODIUM
DODESIL SULFAT (SDS-PAGE)**

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Farmasi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**ANING PURWANINGSIH
NIM. 099913391 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

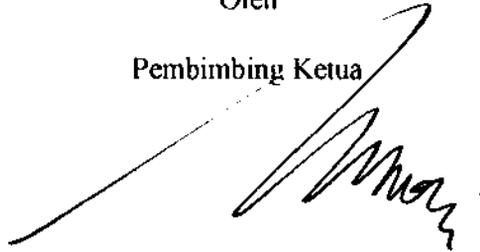
Tanggal 12 September 2003

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL, 5 SEPTEMBER 2003

Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Muhammad Zainuddin, Apt.

NIP. 130 517 154

Pembimbing,

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi

NIP. 131 653 457

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Farmasi
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga



Dr. DJoko Agus Purwanto, Apt., MSi

NIP. 131 653 457

Telah di uji pada

Tanggal 12 September 2003

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Sumadi Drs., Apt.

Anggota :

1. Prof. Dr. Muhammad Zainuddin, Apt
2. Drs..Haryana,MSc.
3. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., Msi
4. Dr. Bambang Prajogo E.W., Apt.,MS

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah saya panjatkan kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penelitian ini bisa diselesaikan.

Pada kesempatan ini saya juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Muhammad Zainuddin, Apt. sebagai Pembimbing Ketua, yang telah membimbing dengan sabar dan memberi saran mulai pelaksanaan penelitian sampai penyusunan naskah tesis.
2. Bapak Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi., sebagai Ketua Program Studi Ilmu Farmasi dan sekaligus sebagai pembimbing yang telah memberikan bimbingan, saran dan kebijaksanaannya.
3. Bapak Prof.Dr.Indrayana.N.S.,dr.,SpF.,DEM Kepala Laboratorium Dasar TDC, yang telah membantu meminjamkan peralatan elektroforesis dan mengajari cara penggunaan alat elektroforesis.
4. Dra. Afaf Baktir, MS. yang telah memberi inspirasi judul penelitian dan menyumbang beberapa bahan kimia serta meluangkan waktu untuk konsultasi tentang permasalahan penelitian.
5. Ketua Jurusan Kimia MIPA Universitas Airlangga dan Ketua Laboratorium Kimia Analitik yang telah mengizinkan untuk tugas belajar S2.
6. Suami yang telah membantu mempersiapkan peralatan dan memberi dorongan dan doa
7. Anak-anak yaitu Ainur Rahman, Lukman Hakim dan M.Yusuf Ihsan yang sering terganggu dengan kesibukan saya.

8. Teman-teman staf pengajar jurusan Kimia MIPA Universitas Airlangga yang telah memberi dorongan dan doa.
9. Teman-teman dari staf laboratorium yang telah membantu mempersiapkan bahan kimia, peralatan dan sampel.

Akhirnya semoga Allah senantiasa melimpahkan rahmat dan petunjukNya kepada kita semua, Amin.

Surabaya, 5 September 2003

Penulis

RINGKASAN

Adanya kandungan komponen bahan makanan yang mengandung babi dalam bahan dan produk pangan dapat diidentifikasi melalui lemak, protein maupun DNANYA. Dalam penelitian ini dilakukan analisis adanya protein daging babi menggunakan elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dengan sistem buffer diskontinyu. Sistem ini terdiri dari gel penumpuk (*stacking gel*) yang berpori besar dan gel pemisah (*separating gel*) yang berpori kecil. Gel penumpuk berada di atas gel pemisah yang mempunyai konsentrasi akrilamid, molaritas dan pH buffer yang lebih rendah dari pada gel pemisah. Keunggulan sistem ini adalah menghasilkan pemisahan profil pita protein yang lebih, tipis dan tajam.

Untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul dapat dilakukan dengan menambahkan suatu deterjen ionik yaitu *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS) dan β -Merkaptoetanol pada proses persiapan sampel. Kemudian dilakukan tahap denaturasi dengan pemanasan pada suhu 100 °C selama 5 menit. SDS akan menyelubungi rantai polipeptida sehingga bermuatan negatif dan β -Merkaptoetanol memutuskan ikatan disulfide (S-S) pada rantai polipeptida dengan cara mereduksi ikatan tersebut. Kompleks SDS - polipeptida berbentuk seperti batang dan bermuatan negatif. Dengan demikian akan menghilangkan perbedaan muatan dan perbedaan konformasi diantara protein-protein tersebut sehingga migrasi protein selama elektroforesis hanya berdasarkan berat molekulnya. Kecepatan migrasi protein selama elektroforesis akan berbanding terbalik dengan berat molekulnya, semakin besar molekul maka semakin lambat migrasinya.

Dengan menggunakan teknik pemisahan elektroforesis SDS-PAGE maka adanya perbedaan di dalam komposisi protein akan menghasilkan pemisahan dalam bentuk pita protein dengan berat molekul yang berbeda, dengan demikian bisa dicari pita protein pembeda tersebut.

Dari hasil penelitian untuk identifikasi protein daging sapi dan babi daging mentah ditemukan beberapa pita protein yang menjadi pita protein pembeda. Pada daging babi mentah ditemukan pita protein pembeda yang tidak ditemukan pada daging sapi pada Rf 0,0885; 0,1435; 0,296 dan 0,6825 dengan berat molekul berturut-turut 54,71 kD; 46,64 kD; 29,96 kD dan 9,76 kD. Sedangkan pada sapi ditemukan pita protein pembeda yang tidak ditemukan pada babi pada Rf 0,0965 dengan berat molekul 53,46 kD dan Rf 0,827 dengan berat molekul 6,42 kD. Untuk campuran daging sapi dan daging babi dengan perbandingan 50:50 % belum nampak adanya perbedaan pita protein yang muncul., hal ini terjadi karena konsentrasinya terlalu kecil sehingga intensitas pita protein yang muncul kecil sehingga tidak terlihat. Pada daging yang sudah direbus tidak bisa diidentifikasi dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE karena proteinnya sudah terdenaturasi

ABSTRACT

To get the detection method whether there is pork protein in food as the main material of meat, the research was carried out to analyse pork protein, beef protein and mixtures pork and beef in raw meat and boild meat using SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel*). This eletrophoresis method has one of the method for determining protein quantitatively, comparatively, characterization, accurately and fast, which separating protein based on the molecule weight. With composition difference of protein which can result the separating in protein band with different molecule weight, so we can find the marker band of the protein.

The research revealed that raw beef and pork meet it can be found some protein band which can be considered as marker. The protein marker was considered to be pork protein marker if the protein band can be found in pork but can' t be found in beef or vice versa. For the raw pork can find band marker in Rf 0.0885; 0.1435; 0.2960 and 0.6825 with the weight of the molecule in order 54.71 kD; 46.64 kD, 29.96 kD and 9.76 kD. While in beef it can be found protein band marker in Rf 0.0965 and 0.827 with the weight of the molecule 53.46 kD and 6.42 kD. For mixtures of pork and beef with the comparison of 50 : 50 % , did not found the difference band with can be told to be a marker. In the boild meat did not identified any of band by using SDS-PAGE electrophoresis because the protein has been denaturated.

Key words ; pork protein, beef protein, sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel (SDS-PAGE)

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan	viii
Abstrak.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Umum Penelitian	4
1.4 Tujuan Khusus Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Tentang Sapi.....	5
2.2 Tinjauan Tentang Babi.....	6
2.3 Tinjauan Tentang Urat Daging.....	7
2.4 Protein.....	9
2.5 Sintesis Protein.....	10
2.6 Sifat-sifat Fisikokimia Protein.....	11
2.7 Klasifikasi Protein Berdasarkan Kelarutannya.....	13
2.8 Struktur Protein.....	14
2.8.1. Struktur Primer.....	14
2.8.2 Struktur Sekunder.....	14
2.8.3. Struktur Tersier.....	15
2.8.4. Struktur Kuartener.....	15
2.9 Denaturasi Protein.....	16

2.10. Tinjauan Tentang Elektroforesis.....	18
2.10.1. Elektroforesis SDS-PAGE.....	20
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	24
3.1. Kerangka Konseptuan Penelitian.....	24
3.2. Hipotesis Penelitian.....	25
BAB 4 BAHAN, ALAT DAN METODOLOGI PENELITIAN	26
4.1 Bahan Penelitian.....	26
4.1.1. Sampel.....	26
4.1.2. Bahan Kimia.....	26
4.2 Alat Penelitian.....	27
4.3 Metodologi Penelitian.....	28
4.3.1 Rancangan Penelitian.....	28
4.3.2 Skema Kerja.....	28
4.3.3 Larutan Kerja.....	30
4.3.4 Pemurnian Protein.....	30
4.3.5 Penentuan Konsentrasi Protein.....	31
4.3.6 Perhitungan Larutan Stok Untuk Gel Pemisah Kadar X%.....	32
4.3.7 Pembuatan Gel Pemisah.....	32
4.3.8 Pembuatan Gel Penyusun.....	33
4.3.9 Preparasi Sampel.....	34
4.3.10 Perlakuan Perebusan.....	35
4.3.11 Cara Menuang Sampel (<i>loading</i>).....	35
4.3.12 Cara Menggunakan Alat Elektroforesis.....	35
4.3.13 Pewarnaan (<i>Staining</i>).....	36
4.3.14 Penghilangan Warna (<i>Destaining</i>).....	36
4.3.15 Cara Analisis Data.....	36
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	38
5.1 Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Sampel.....	38
5.2 Pemekatan Larutan Protein Sampel.....	39
5.3 Hasil Penentuan Sensitivitas.....	39
5.4 Optimasi Konsentrasi Akrilamid Gel Pemisah.....	40
5.5 Profil Pita Protein Dari Sampel Yang Direbus.....	43
5.6 Profil Pita Protein Dari Campuran Daging Sapi Dan Babi.....	44
5.7 Penentuan Pita Pembeda Dari Protein Daging Babi.....	44
5.8 Identifikasi Pita Protein Pembeda Daging Sapi Dan Babi Dengan TLC-Scanner.....	45
5.9 Penentuan Berat Molekul Dari Pita Protein Pembeda Daging Sapi Dan Babi.....	50
BAB 6 PEMBAHASAN	52
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	54
7.1 Kesimpulan.....	54
7.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Rasio yang khas dipeptida histidin dalam urat daging berbagai spesies	9
Tabel 4.1 Hitungan konsentrasi akrilamid gel pemisah 15%,17,5% dan 20 % untuk volume 10 ml	32
Tabel 5.1 Kadar protein dari sampel sapi, babi dan campurannya.....	38
Tabel 5.2 Konsentrasi sampel hasil pemekatan.....	39
Tabel 5.3 Pengenceran kadar protein untuk pengujian sensitivitas.....	39
Tabel 5.4 Rf profil pita protein dari daging sapi, babi dan <i>marker</i> standar	49
Tabel 5.5 Berat molekul dan Rf <i>marker</i> standar.....	50
Tabel 5.6 Berat molekul dari pita protein pembeda daging sapi dan babi	51

DAFTAR GAMBAR

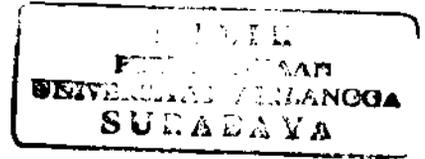
	Halaman
2.1 Sintesis Protein.....	11
2.2 Skema α - heliks.....	16
2.3 Sketsa proses denaturasi protein.....	17
2.4 Reaksi pembentukan poliakrilamid.....	20
2.5 Gel sistem diskontinyu yang terdiri dari staking gel dan separating Gel.....	21
2.6 Denaturasi protein dan reduksi ikatan disulfide dengan adanya SDS- β - Merkptoetanol.....	22
3.1 Skema kerangka konseptual.....	24
4.1 Skema kerja.....	29
4.2 Dasar pemisahan molekul berdasarkan berat molekul dengan dialisis	31
4.3 Cara menuang gel pemisah.....	33
4.4 Cara menuang gel penyusun.....	34
4.5 Cara memasukkan sampel protein.....	35
5.1 Penentuan sensitivitas profil pita protein.....	40
5.2 Profil pita protein yang dihasilkan dari gel pemisah dengan konsentrasi akrilamid 15%.....	41
5.3 Profil pita protein yang dihasilkan dari gel pemisah dengan Konsentrasi akrilamid 17,5 %.....	42
5.4 Profil pita protein yang dihasilkan dari gel pemisah dengan Konsentrasi akrilamid 20 %.....	42
5.5 Profil pita protein yang dihasilkan dari daging rebus pada Konsentrasi akrilamid 20%.....	43
5.6 Profil pita protein sapi, babi dan campuran pada gel pemisah dengan konsentrasi 20%.....	44
5.7 Profil pita protein sapi, babi dan <i>marker</i> standar penentu berat molekul pada gel pemisah dengan konsentrasi 20 %	45

5.8	Kromatogram profil pita protein daging sapi (SP4).....	46
5.9	Kromatogram profil pita protein daging sapi (SP3).....	46
5.10	Kromatogram profil pita protein <i>marker</i> standar.....	47
5.11	Kromatogram profil pita protein daging babi (Bb3).....	47
5.12	Kromatogram profil pita protein daging babi (Bb1).....	48
5.13	Grafik penentuan berat molekul dari pita protein pembeda daging sapi dan babi.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya (Sp4)	58
Lampiran 2 Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya (Sp3)	58
Lampiran 3 Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya (Bb1)	59
Lampiran 4 Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya (Bb3)	59
Lampiran 5 Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya (<i>marker</i>).....	60
Lampiran 6 Cara menghitung Rf dari data TLC –Scanner	61
Lampiran 7 Cara menghitung Rf <i>marker</i> protein standar.....	62

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Masalah

Menurut Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 69 Tahun 1999 (PP 69 / 1999) tentang label dan iklan pangan dalam pasal 1 ayat 5 disebutkan bahwa pangan halal adalah pangan yang tidak mengandung unsur atau bahan yang haram atau dilarang untuk dikonsumsi umat Islam, baik yang menyangkut bahan baku pangan, bahan tambahan pangan, bahan bantu dan bahan penolong lainnya termasuk bahan pangan yang diolah melalui proses rekayasa genetika dan iradiasi pangan dan yang pengelolaannya dilakukan sesuai dengan ketentuan hukum agama Islam.

Sertifikasi halal dilakukan oleh Lembaga Pengkajian Pangan, Obat-Obatan dan Kosmetika yang bekerja sama dengan Majelis Ulama Indonesia (LPPOM-MUI). Dalam kegiatan ini dilakukan penelitian produk makanan yang dikonsumsi oleh masyarakat luas tentang halal atau haramnya suatu produk untuk kemudian dikeluarkan sertifikat. Penelitian dimulai dengan melakukan pemeriksaan secara teknis oleh suatu tim yang antara lain meliputi penelusuran asal-usul bahan produk makanan, cara proses, dan pengemasannya. Namun dalam hal ini tentunya diperlukan kerja sama dan kejujuran dari produsen, terutama produk yang ada kemungkinannya dicampur dengan lemak atau daging babi. Maka dari itu mendeteksi dan menganalisis komponen haram yang berasal dari babi masih perlu dikaji dan dikuasai. Contoh produk-produk yang kemungkinan mengandung bahan berasal dari babi antara lain baso, sosis, mie basah dan produknya, ovalet yang merupakan bahan tambahan untuk pembuatan kue, produk yang mengandung gelatin seperti permen lunak (*soft candy*), *yoghurt*, es krim, coklat dan *coating* (pelapis) pada produk kue

seperti pie bahkan beberapa makanan ringan yang lain yang beredar di pasaran (Jurnal L.P.POM-MUI, 2000)

Adanya kandungan komponen bahan makanan babi dalam bahan dan produk pangan dapat diidentifikasi adanya lemak, protein dan DNANYA. Beberapa metode yang digunakan untuk analisis protein adalah metode elektroforesis, *Enzym Linked Immuno Assay* (ELISA) dan Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (KCKT). Keseluruhan metode ini tidak dapat digunakan apabila proteinnya sudah terdenaturasi atau sudah mengalami proses pemasakan. Untuk analisis lemak dan protein mempunyai banyak kendala karena dalam pengolahan makanan sering terjadi degradasi dan terjadi denaturasi. Perkembangan selanjutnya yaitu dengan uji DNA yang di amplifikasi dengan teknik *Polymerase chain reaction* (PCR) metode ini dapat digunakan untuk protein yang sudah terdenaturasi atau yang sudah mengalami proses pemasakan (Lawrie,1995)

Molekul DNA yang terdapat dalam inti sel mampu mensintesis molekul RNA yang merupakan cetakan bagi sintesis protein. Protein mempunyai urutan asam-amino yang tepat karena setiap molekul RNA membawa sandi yang diberikan oleh DNA pada saat mensintesis molekul RNA tersebut. Spesies yang berbeda mempunyai perbedaan susunan DNA, dengan demikian protein dari spesies yang satu dengan yang lain pasti mempunyai perbedaan. Untuk itu perlu di cari perbedaan profil pita protein antara daging sapi dan daging, babi. Dari hasil ini akan didapatkan pita protein pembeda untuk protein daging sapi dan babi .

Banyaknya makanan olahan dengan bahan utama atau bahan tambahan dari daging contoh baso, sosis, pangsit mie dan lain-lain maka perlu dilakukan penelitian pada daging mentah dan pada daging yang sudah diolah dengan pemanasan 5 menit

pada suhu 100 °C. Dari hasil ini diharapkan ada pita protein pembeda untuk daging sapi, dan babi baik sebelum maupun sesudah direbus.

Identifikasi adanya protein daging sapi dan babi menggunakan teknik elektroforesis. Teknik ini dapat digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan muatan dan ukuran. Untuk menghilangkan perbedaan muatan dan konformasi di antara protein tersebut dengan cara memberi muatan negatif yaitu dengan menambahkan SDS dan dipanaskan selama 2-10 menit pada suhu 100 °C. Dan dengan menambahkan tiol (β -mercaptoetanol) maka terjadi pemutusan ikatan disulfida (S-S) dengan cara mereduksi ikatan tersebut (Clark dan Switzer, 1977). Teknik elektroforesis seperti diatas dikenal nama elektroforesis kondisi denaturasi atau SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) yaitu metode elektroforesis untuk penentuan kuantitatif, komparasi dan karakterisasi protein yang akurat, dan cepat. Metode ini memisahkan protein berdasarkan berat molekul (Laemmli,1970). SDS-PAGE yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan sistem diskontinyu, yang terdiri dari gel penumpuk (*stacking gel*) yang berpori besar dan gel pemisah (*separating / resolving gel*) yang berpori kecil.

Identifikasi protein daging sapi dan babi dengan tujuan untuk mendapatkan metode deteksi adanya protein daging babi dalam bahan dan produk pangan dengan bahan utama daging, melalui identifikasi adanya protein pembeda. Dan hasil yang diperoleh diharapkan bermanfaat sebagai metode sederhana untuk identifikasi adanya daging babi dan campurannya dalam produk daging yang di duga mengandung babi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas maka permasalahan yang akan dipecahkan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

- 1 Apakah dapat diidentifikasi adanya protein pembeda antara daging sapi dan babi berdasarkan profil pita protein dari daging sapi dan daging babi mentah melalui teknik pemisahan elektroforesis SDS-PAGE.
- 2 Apakah dapat diidentifikasi adanya protein pembeda antara daging sapi dan babi berdasarkan profil pita protein dari daging sapi dan babi yang sudah direbus melalui teknik pemisahan elektroforesis SDS-PAGE

1.3 Tujuan Umum Penelitian:

Untuk mendapatkan metode deteksi adanya protein daging babi dalam produk pangan dengan bahan utama daging melalui identifikasi adanya pita protein pembeda.

1.4. Tujuan Khusus Penelitian :

Menentukan pita protein pembeda antara daging sapi dan babi baik yang mentah maupun yang sudah direbus.

1.5 Manfaat Penelitian:

Mendapatkan metode sederhana untuk identifikasi adanya daging babi dalam produk makanan dengan bahan utama daging yang diduga mengandung daging babi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Sapi

Klasifikasi sapi menurut Parker dan Haswell (1978) adalah sebagai berikut :

- Phylum : Chordata
Sub Phylum : Vertebrata
Class : Mamalia
Ordo : Artiodaktil
Familia : Bovidae
Genus : *Bos*
Species : ada dua yaitu :

1. *Bos taurus sp*

2 *Bos indicus sp*

Di daerah tropis dan daerah sedang, sapi dipelihara untuk produksi susu dan daging, bahkan sebelum ada mekanisasi sapi digunakan sebagai hewan ternak tarik. Di Indonesia terdapat 5 bangsa sapi utama yaitu (1) sapi Onggole, (2) sapi Bali, (3) sapi Madura, (4) sapi Grati dan (5) sapi Kelantan.

Sapi Onggole atau sapi Benggaia (*Bos indicus*) aslinya diimpor dari India. Keturunan Onggole yang kawin dengan sapi lokal di Indonesia dikenal sebagai jenis PO atau peranakan Onggole. Sapi jenis ini mempunyai ciri kulit didominasi warna putih, berleher pendek dengan punggung besar dan panjang (berpunuk), yang jantan mempunyai berat badan 800 kg atau lebih dan dapat menyesuaikan dengan lingkungannya dengan baik. Sapi Bali (*Bos javanicus*) bertubuh besar hampir sama dengan banteng liar, berat badannya 400 kg atau lebih, yang jantan berwarna hitam

dan betina berwarna merah dengan garis hitam yang jelas disepanjang punggungnya. Baik jantan maupun betina mempunyai pantat belang putih. Sapi Madura berwarna coklat sampai kemerahan dengan berat badan 300 - 350 kg. Sapi ini dipelihara secara tradisional di pulau Madura dan biasa digunakan untuk kerapan sapi. Sapi Grati berasal dari bangsa *Holstein-Friesian* dari daerah beriklim sedang. Sapi Grati sudah banyak yang disilangkan dengan sapi *Ongole*. Sapi Kedah Kelantan banyak ditemukan di Sumatra dengan ciri bertubuh kecil dan berwarna hitam sampai coklat muda. (Smith, 1988)

2.2 Tinjauan Tentang Babi

Klasifikasi babi menurut Parker dan Haswell (1978) adalah sebagai berikut :

Phylum : Chordata
Sub Phylum : Vertebrata
Class : Mamalia
Ordo : Artiodaktil
Familia : Suidae
Genus : *Sus*
Species : *Sus sp*

Meskipun Indonesia mempunyai penduduk sebagian besar beragama islam, tetapi Indonesia mempunyai populasi babi lebih kurang 3 juta terutama di daerah yang penduduk Kristen, Hindu dan keturunan Cina. Ada 3 tipe atau bangsa babi yang ada di Indonesia yaitu (1) babi Jawa lokal berwarna putih, (2) babi Cina dengan punggung melengkung terdapat di Bali dan (3) babi peliharaan di Sumatra berwarna hitam. Babi jawa lokal berwarna putih, pendek, gemuk dan mempunyai punggung sedikit melengkung. Babi ini berkembang lebih cepat setelah disilangkan dengan bangsa babi import yaitu *Landrace* atau *Yorkshire*. Babi Cina di Bali mempunyai tubuh

kecil, berwarna hitam dan putih. serta badan sangat melengkung. Badan bagian depan besar dan kulit tumbuh baik dan berlipat-lipat. Babi Bali hampir sepenuhnya pemakan bangkai, berkeliaran bebas di desa-desa. Babi hitam di Sumatra dipelihara oleh orang-orang Batak. Babi ini sangat mirip dengan babi liar dengan ciri tubuh kecil, kulit tanpa lipatan dan bahunya lebih besar (Smith, 1988).

2.3 Tinjauan Tentang Urat Daging (Lawrie, 1995)

Spesies adalah faktor yang paling mudah dimengerti dalam mempengaruhi komposisi urat daging, tetapi pengaruhnya tergantung pada kerja simultan dari banyak faktor yaitu faktor *intrinsik* (faktor dari dalam) dan faktor *ekstrinsik* (faktor dari luar) Faktor-faktor intrinsik adalah sebagai berikut : (i) spesies; (ii) bangsa; (iii) kelamin; (iv) umur; (v) lokasi anatomis urat daging; (vi) latihan atau olah raga (vii) tingkat pemberian nutrisi dan (viii) variabilitas dalam hewan yang sifatnya masih sedikit diketahui. Disamping itu ada beberapa faktor ekstrinsik yang dapat memodifikasi sifat-sifat urat daging segera setelah periode pascamati selama penyimpanan dan pengolahan, dan komposisinya sebagai daging. Faktor-faktor ekstrinsik tersebut antara lain : (i) bahan makanan; (ii) kelelahan; (iii) rasa takut; (iv) manipulasi sebelum dipotong dan (v) kondisi lingkungan pada saat dipotong, segera pada periode pascamati dan selama penyimpanan selanjutnya.

Warna urat daging dipengaruhi oleh kadar mioglobinnya, semakin rendah kadar mioglobinnya maka warna urat dagingnya semakin pucat contoh pada babi dan kelinci. Dan semakin besar kadar mioglobin pada urat daging maka warna daging kelihatan hampir hitam. Mioglobin urat daging babi lebih rendah dibandingkan dengan sapi, oleh karena itu warna daging sapi lebih merah dibandingkan dengan babi dan secara kualitatif urat daging babi berbeda dengan mioglobin urat daging sapi karena pada babi menunjukkan bahwa tingkat oksigenasi mioglobin lebih cepat dari

pada sapi. Hal yang spesifik dari babi ditemukan oleh Rangeley dan Lawrie (1976) yaitu adanya β -alanil-3-metil-histidine dalam urat daging babi dewasa, selanjutnya hanya sedikit sekali dalam urat daging sapi, domba dan ayam (Carnegie, Collins, dan Ilic, 1984). Rasio dipeptida-dipeptida histidin merupakan ciri khas dari spesies yang berbeda dan telah digunakan untuk mengidentifikasi spesies-spesies tersebut (Olsmann dan Slump, 1981).

Identifikasi untuk membedakan daging berdasarkan spesiesnya yang ada dalam produk-produk makanan memang penting guna menjamin kepercayaan konsumen, dan ada beberapa metode yang telah digunakan dalam menganalisis sampel-sampel yang belum dimasak. Hal ini telah diteliti oleh Winter, Thomsen dan Davis (1990) yang menemukan bahwa sensitivitas deteksi daging babi yang dicampur dengan daging sapi adalah 0,4 % dengan *countercurrent immunoelectrophoresis*, 0,5 % dengan *DNA hybridization*, 1,0 % dengan *immunodifusion* dan 5,0 % dengan *isoelectric focusing*. Pendekatan lain dengan menggunakan *direct probe mass spectrometry*. Ini serupa dengan *pyrolysis mass spectrometry* tetapi sampel diuapkan pada suhu 300°C terlebih dahulu yang dapat membedakan kuda, sapi pedaging, babi dan anak domba (Patterson, 1984). Problem utama selanjutnya dari metode-metode tersebut adalah ketidakmampuan untuk mengkuantitatifkan persen spesies dalam bahan-bahan makanan yang telah diproses. Kemudian King (1984) dapat membedakan perbedaan spesies pada daging yang dipanaskan sampai 120 °C dengan *isoelectric focusing* dan *aldehyde-kinase*. Pengembangan selanjutnya untuk mengatasi problem ini yaitu dengan metode *DNA hibridisasi* (Lawrie, 1995)

Tabel 2.1 Rasio yang khas dipeptida histidin dalam urat daging berbagai spesies (Carnegie et al., 1984)

Spesies	Balenine : Anserine	Carnosine : Anserine	Balenine : Carnosine*
Kuda	0	93	0
Babi	1	21	0.05
Sapi	0.03	6	0.005
Domba	0.02	1	0,02
Ayam	0.01	0.5	0.02
Kanguru	0	0.1	0

* Data ini dihitung dari kolom 2 dan 3

Daging babi mempunyai konsentrasi tenunan pengikat yang lebih besar dari pada daging sapi sehingga babi umumnya lebih empuk dibandingkan dengan sapi.

2.4 Protein

Secara kimia protein adalah heteropolimer dari asam-asam amino, yang terikat satu sama lain dengan ikatan peptide. Ada suatu universalisme di dalam molekul protein. Protein apapun dan berasal dari makhluk apapun juga ternyata hanya tersusun dari 20 macam asam amino saja. Perbedaan protein yang satu dengan yang lain disebabkan oleh jumlah dan kedudukan asam-asam amino tersebut di dalam tiap-tiap molekul. Kedua puluh asam amino itu mempunyai ciri umum sebagai berikut : (1) semuanya mempunyai konfigurasi L, (2). Sama-sama mempunyai gugus COOH dan 1 gugus NH₂ yang terikat ke atom C_α. Perbedaan individual dari asam-asam ini disebabkan oleh perbedaan rantai samping. Dengan adanya perbedaan antara asam-asam amino tersebut akhirnya menyebabkan terjadinya perbedaan sifat kimia dan biologis dari molekul protein yang disusunnya. Muatan suatu protein dalam suatu larutan ditentukan oleh gugus NH₂ bebas di suatu ujung dan gugus COOH bebas di ujung yang lain serta jumlah rantai yang bermuatan. (Soewoto, 2001)

Dengan ikatan hidrogen, molekul protein berinteraksi dengan molekul air membentuk mantel air. Karena molekulnya besar, di dalam air protein membentuk

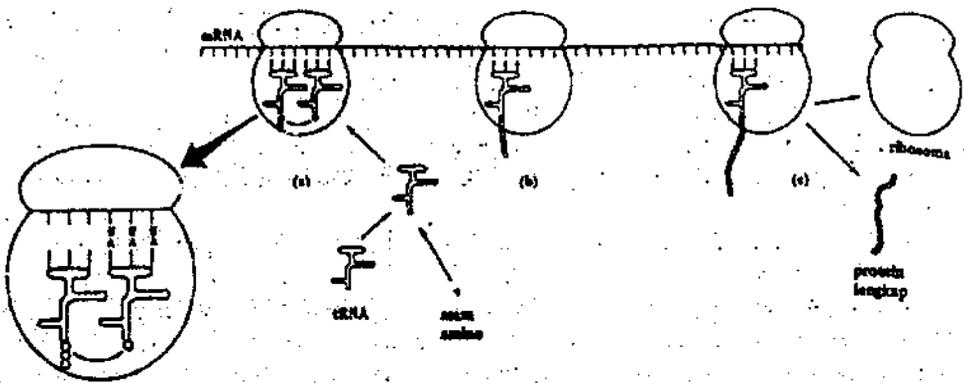
larutan koloid. Adanya sejumlah elektrolit dengan konsentrasi encer sangat meningkatkan kelarutan suatu protein (*salting in*). Protein yang satu dengan yang lain tidak sama muatan dan jumlah asam amino penyusunnya, sifat inilah yang bisa dimanfaatkan untuk pemisahan protein.

2.5 Sintesis Protein

Sintesis protein terjadi dalam sitoplasma, mula-mula molekul RNA – pembawa pesan atau mRNA (*messenger RNA*) disintesis pada sebagian untaian DNA dalam inti sel. Hal ini memungkinkan untuk terbukanya molekul DNA seperti apa yang terjadi pada proses replikasi DNA. Kemudian mRNA ke luar dari inti menuju sitoplasma. *Messenger RNA* mempunyai afinitas yang tinggi terhadap ribosom dan akan mengumpulkan organel ini di sepanjang rantainya. Gabungan antara mRNA dan ribosom disebut polisoma (*polysome*). RNA pemindah atau tRNA (*transfer RNA*) merupakan rantai RNA yang agak pendek dan masing-masing mampu mengikat hanya satu macam asam amino. Peranan tRNA adalah untuk membawa asam amino yang spesifik ke sisi ribosom di mana asam amino tersebut dapat membentuk ikatan peptida dan menjadi bagian dari rantai polipeptida yang sedang dibuat. Ribosom bergerak di sepanjang rantai mRNA dengan mengikat molekul tRNA dan menyatukan asam amino yang dibawanya menjadi rantai polipeptida. Setelah mencapai ujung mRNA, ribosom terlepas dan membebaskan molekul protein yang tidak selesai disintesis (Petrucci, 1993)

Sandi (kumpulan petunjuk dan pengarahan) yang menentukan runtunan asam amino secara tepat dalam sintesis suatu protein bersatu dalam DNA kromosom. Sandi ini terdapat dalam pola khusus dari molekul basa pada *heliks ganda*. Satu kelompok terdiri dari tiga molekul basa yang komplementer dari mRNA yang terbentuk pada untaian DNA tersebut. Triplet atau kodon (*codon*) pada mRNA yang harus cocok

dengan triplet komplementernya yang disebut anti kodon (*anti codon*) pada molekul tRNA. Transfer RNA tertentu dengan anti kodon ini membawa satu asam amino spesifik ke sisi di mana sintesis protein terjadi.



Gambar 2.1. Sintesis Protein (Petrucci, 1993)

- (a). Dengan bantuan Enzim maka molekul tRNA membawa asam amino ke sisi ribosom. Anti kodon tRNA (contoh di atas adalah AAA) haruslah komplementer dengan kodon mRNA (UUU), sedangkan asam amino yang dibawa oleh tRNA tersebut adalah fenilalanin. Penambahan asam amino terjadi seperti gambar diatas, rantai bergerak dari tRNA sebelah kiri ke tRNA di sebelah kanannya.
- (b). Sewaktu ribosom bergerak di sepanjang mRNA, makin banyak unit asam amino yang ditambahkan, berdasarkan kecocokan antara molekul tRNA dengan sandi pada mRNA.
- (c) Bila ribosom telah mencapai ujung mRNA maka organel dan protein yang sudah terbentuk kemudian dibebaskan. Ribosom dapat mengulangi proses ini lagi.

2.6 Sifat-sifat Fisikokimia Protein

Sifat fisikokimia setiap protein tidak sama, tergantung dari jumlah dan jenis asam aminonya. Berat molekul protein sangat besar sehingga bila protein dilarutkan dalam air akan membentuk suatu dispersi koloidal. Molekul protein tidak dapat melalui membran semipermeabel, tetapi masih dapat menimbulkan tegangan pada membran tersebut.

Ada protein yang larut dalam air, ada pula yang tidak larut dalam air, tetapi semua protein tidak larut dalam pelarut lemak. Bila dalam suatu protein ditambahkan garam, daya larut protein akan berkurang, akibatnya protein akan terpisah sebagai endapan, peristiwa pemisahan protein ini disebut *salting out*. Garam-garam logam berat dan asam-asam mineral kuat ternyata baik digunakan untuk mengendapkan protein.

Apabila protein dipanaskan atau ditambah alkohol maka protein akan menggumpal. Hal ini disebabkan alkohol menarik mantel air yang melingkupi molekul-molekul protein. Penggumpalan protein bisa juga disebabkan oleh aktivitas enzim-enzim proteolitik.

Adanya gugus amino dan karboksil bebas pada ujung-ujung rantai molekul protein, menyebabkan protein mempunyai banyak muatan (*polielektrolit*) dan bersifat *amfoter* (dapat bereaksi dengan asam maupun dengan basa). Kereaktifan berbagai jenis protein terhadap asam dan basa tidak sama tergantung dari jumlah dan letak gugus amino dan karboksil dalam molekul. Dalam larutan asam (pH rendah), gugus amino bereaksi dengan H^+ , sehingga protein bermuatan positif. Bila pada kondisi ini dilakukan elektrolisis, molekul protein akan bergerak ke arah katoda. Sebaliknya dalam larutan basa (pH tinggi) molekul protein akan bereaksi sebagai asam atau bermuatan negatif sehingga molekul protein akan bergerak ke arah anoda. Pada pH tertentu, yang disebut titik isoelektrik (*pI*), muatan gugus amino dan karboksil bebas akan saling menetralkan sehingga molekul bermuatan nol. Tiap jenis protein mempunyai titik isoelektrik yang berlainan. Pengendapan paling cepat terjadi pada titik isoelektrik ini dan prinsip ini digunakan dalam proses-proses pemisahan serta pemurnian protein (Winarno, 1991)



2.7 Klasifikasi Protein Berdasarkan Kelarutannya (Winarno, 1991)

Menurut kelarutannya, protein globuler dapat dibagi dalam beberapa grup yaitu :

- a. Albumin : larut dalam air dan terkoagulasi oleh panas. Contohnya albumin telur, albumin serum dan laktalbumin dalam susu.
- b. Globulin : tidak larut dalam air, terkoagulasi oleh panas, larut dalam larutan garam encer, dan mengendap dalam larutan garam konsentrasi tinggi (*salting out*). Contoh globulin : miosinogen dalam otot, ovoglobulin dalam kuning telur, amandin dari buah almond, legumin dalam kacang-kacangan.
- c. Glutelin : tidak larut dalam pelarut netral tetapi larut dalam asam atau basa encer. Contohnya glutelin dalam gandum dan orizenin dalam beras.
- d. Prolamin atau Gliadin : larut dalam alkohol 70-80 % dan tak larut dalam air maupun alkohol absolute. Contohnya : gliadin dalam gandum, hordain dalam barley, dan zein pada jagung.
- e. Histon : larut dalam air dan tidak larut dalam ammonia encer. Histon dapat mengendap dalam pelarut protein lainnya. Histon yang terkoagulasi karena pemanasan dapat larut lagi dalam larutan asam encer. Contohnya globin dalam hemoglobin.
- f. Protamin adalah protein paling sederhana dibandingkan protein-protein yang lain, tetapi lebih kompleks dari pada peptone dan peptide. Protein ini larut dalam air dan tidak terkoagulasi oleh panas. Larutan protamin encer dapat mengendapkan protein lain, bersifat basa kuat membentuk garam kuat. Contohnya Salmin dalam ikan salmon, klupein pada ikan herring , skombrin pada ikan mackerel dan siprinin pada ikan kaper.

2.8 Struktur Protein

Struktur protein ternyata dapat dibagi menjadi beberapa bentuk yaitu struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener.

2.8.1 Struktur Primer

Susunan linier asam amino dalam protein merupakan struktur primer. Susunan tersebut merupakan suatu rangkaian unik dari asam amino yang menentukan sifat dasar dari berbagai protein, dan secara umum menentukan bentuk struktur sekunder dan tersier.

Bila protein mengandung banyak asam amino dengan gugus hidrofobik, daya kelarutannya dalam air kurang baik dibandingkan dengan protein yang banyak mengandung asam amino dengan gugus hidrofil.

2.8.2. Struktur Sekunder

Bila hanya struktur primer yang ada dalam protein, maka molekul protein tersebut mempunyai bentuk yang sangat panjang dan tipis. Struktur tersebut memungkinkan terjadinya banyak sekali reaksi dengan senyawa yang lain, yang kenyataannya hal tersebut tidak terjadi di alam. Kenyataannya protein merupakan polipeptida yang terlipat-lipat, merupakan bentuk tiga dimensi dengan cabang-cabang rantai polipeptidanya tersusun saling berdekatan. Struktur yang demikian disebut struktur sekunder. Contoh bahan yang memiliki struktur ini ialah bentuk α -heliks pada wol, bentuk lipatan-lipatan (wiru) pada molekul-molekul sutera, serta bentuk heliks pada kolagen.

Dalam bentuk lipatan-lipatan, kerangka peptida protein mempunyai bola zig-zag dengan gugus R mencuat ke atas dan ke bawah. Struktur sekunder terdiri dari satu rantai polipeptida.

2.8.3 Struktur tersier

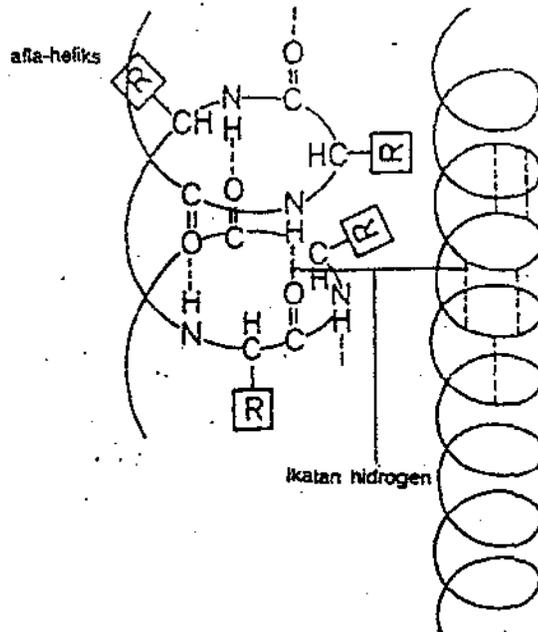
Bentuk penyusunan bagian terbesar rantai cabang disebut struktur tersier. adalah susunan dari struktur sekunder yang satu dengan struktur sekunder bentuk lain. Contoh beberapa protein yang mempunyai bentuk α -heliks dan bagian yang tidak berbentuk α heliks .

Biasannya bentuk-bentuk sekunder ini dihubungkan dengan ikatan hidrogen, ikatan garam, interaksi hidrofobik dan ikatan disulfida. Ikatan disulfida merupakan ikatan yang terkuat dalam mempertahankan struktur tersier protein.

Ikatan hidrofobik terjadi antara ikatan-ikatan nonpolar molekul-molekul sedang ikatan-ikatan garam ternyata tidak begitu penting peranannya terhadap struktur tersier molekul. Ikatan garam mempunyai kecenderungan bereaksi dengan ion-ion lain sekitar molekul.

2.8.4 Struktur Kuartener

Struktur primer, sekunder, dan tersier umumnya hanya melibatkan satu rantai polipeptida. Tetapi bila struktur ini melibatkan beberapa polipeptida dalam membentuk suatu protein, maka disebut struktur kuartener. Pada umumnya ikatan-ikatan yang terjadi sampai terbentuknya protein sama dengan ikatan-ikatan yang terjadi pada struktur tersier.



Gambar 2.2 Skema α - heliks (Read , 1981)

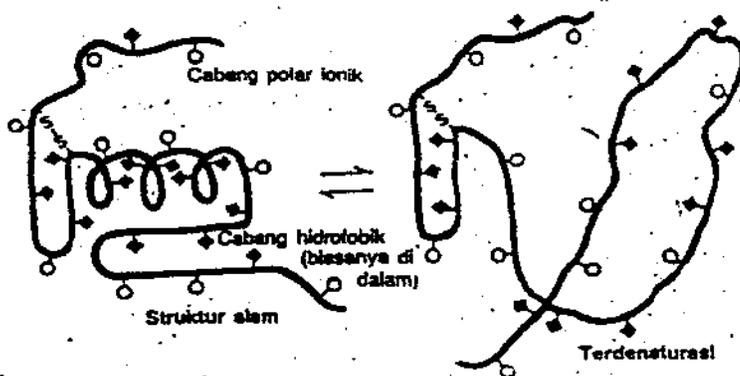
2.9 Denaturasi Protein

Bila susunan ruang atau rantai polipeptida suatu molekul protein berubah, maka dikatakan protein itu terdenaturasi. Sebagian besar protein globuler mudah mengalami denaturasi. Jika ikatan-ikatan yang membentuk konfigurasi molekul tersebut rusak, molekul akan mengembang. Kadang-kadang perubahan ini memang dikehendaki dalam pengolahan makanan, tetapi sering pula dianggap merugikan sehingga perlu dicegah.

Ada dua macam denaturasi, yaitu pengembangan rantai peptida dan pemecahan protein menjadi unit yang lebih kecil tanpa disertai pengembangan molekul. Terjadinya kedua jenis denaturasi ini tergantung pada keadaan molekul. Yang pertama terjadi pada rantai polipeptida sedangkan yang ke dua terjadi pada bagian-bagian molekul yang tergabung dalam ikatan sekunder. Ikatan - ikatan yang dipengaruhi oleh proses denaturasi ini adalah : (a) ikatan hidrogen ; (b). Ikatan

hidrofobik misalnya pada leusin, valin, fenilalanin, triptofan yang saling berlekatan membentuk *micelle* dan saling tidak larut dalam air; (c) ikatan ionik antara gugus bermuatan positif dan negatif (d) ikatan intramolekul seperti yang terdapat pada gugus disulfida dalam sistin. (Winarno, 1991)

Denaturasi dapat diartikan suatu perubahan atau modifikasi terhadap struktur sekunder, tersier dan kuartener terhadap molekul protein, tanpa terjadinya pemecahan ikatan-ikatan kovalen. Karena itu denaturasi dapat pula diartikan suatu proses terpecahnya ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, ikatan garam dan terbukanya lipatan atau wiru molekul.



Gambar 2,3 Sketsa proses denaturasi protein (Winarno, 1991)

Pemekaran atau pengembangan molekul protein yang terdenaturasi akan membuka gugus reaktif yang ada pada rantai polipeptida, selanjutnya akan terjadi pengikatan kembali pada gugus reaktif yang sama atau berdekatan. Bila unit ikatan yang terbentuk cukup banyak sehingga protein tidak lagi terdispersi sebagai suatu koloid, maka protein tersebut mengalami koagulasi. Apabila ikatan-ikatan antara gugus-gugus reaktif protein tersebut menahan seluruh cairan, akan terbentuklah gel. Sedangkan bila cairan terpisah dari protein yang terkoagulasi itu, protein akan mengendap.

Protein yang terdenaturasi berkurang kelarutannya. lapisan molekul protein bagian dalam yang bersifat hidrofobik berbalik ke luar, sedangkan bagian luar yang bersifat hidrofil telipat ke dalam. Pelipatan atau pembalikan terjadi khususnya bila larutan protein telah mendekati pH isoelektrik, dan akhirnya protein akan menggumpal dan mengendap. Viskositas akan bertambah karena molekul mengembang dan menjadi asimetrik, demikian juga sudut putaran optik larutan protein akan meningkat. Denaturasi protein dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu oleh panas, pH, bahan kimia, mekanik dan sebagainya. Masing-masing cara mempunyai pengaruh yang berbeda-beda terhadap denaturasi protein.

Senyawa kimia urea dan garam guanidine dapat memecah ikatan hidrogen yang akhirnya menyebabkan denaturasi protein. Dengan cara tersebut, urea, garam guanidine dapat memecah interaksi hidrofobik dan meningkatkan daya kelarutan gugus hidrofobik dalam air.

Deterjen atau sabun dapat menyebabkan denaturasi protein, karena senyawa ini dapat membentuk jembatan antara gugus hidrofobik dengan hidrofilik sehingga terdenaturasi. Di samping itu, aseton dan alkohol dapat pula menyebabkan terdenaturasi.

2.10 Tinjauan Tentang Elektroforesis

Suatu molekul yang bermuatan akan bergerak dalam medan listrik. Fenomena ini dikenal dengan elektroforesis, dapat digunakan untuk memisahkan protein atau makromolekul yang lain seperti DNA dan RNA. Kecepatan migrasi (v) protein molekul (makromolekul yang lain) dalam medan listrik tergantung pada kekuatan medan listrik (E), muatan protein (z) dan koefisien gesekan (f).

$$v = \frac{Ez}{f}$$

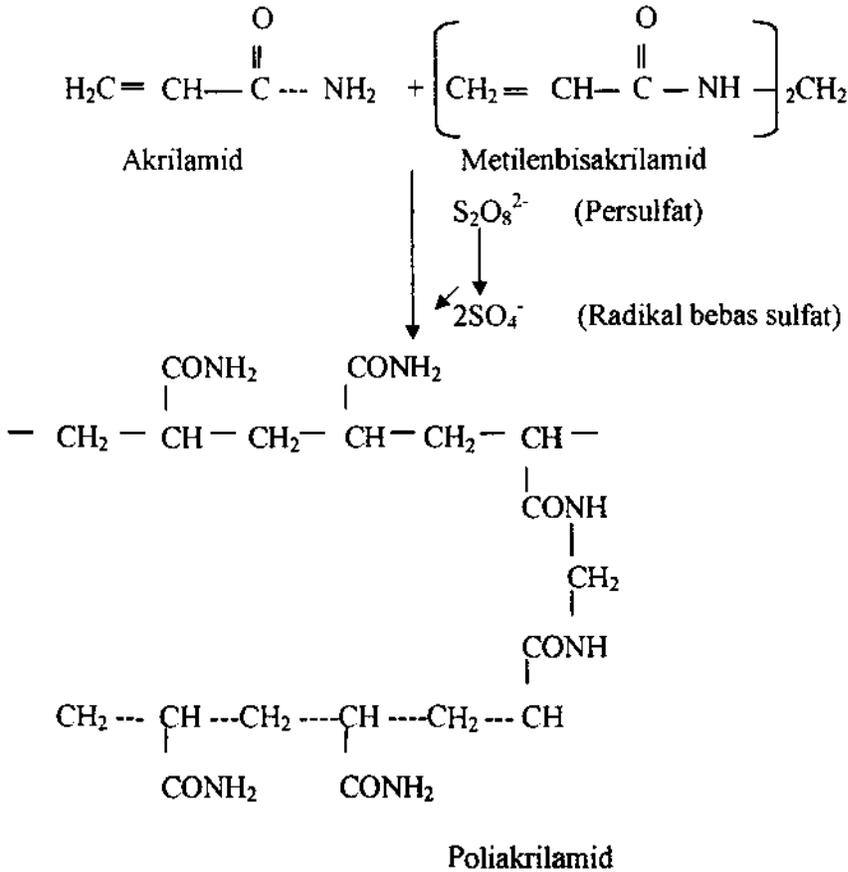
Kekuatan listrik E_z yang menggerakkan molekul ke arah elektroda yang bermuatan berlawanan dihambat oleh f_v yang timbul akibat gesekan molekul pada medium. Koefisien gesekan f tergantung pada massa dan bentuk molekul yang bergerak dan viskositas (η) medium. Untuk molekul bulat dengan radius r , maka

$$f = 6 \pi \eta r$$

Pemisahan secara elektroforesis hampir selalu dilakukan dalam gel (atau pada penunjang padat seperti kertas), tidak dalam larutan, dengan dua alasan : pertama gel mengurangi arus listrik yang timbul akibat perbedaan suhu yang kecil, yang diperlukan agar pemisahan menjadi efektif. Kedua, gel yang bertindak sebagai saringan molekul yang meningkatkan pemisahan. Molekul yang lebih kecil dari pori-pori gel dapat lebih mudah bergerak di dalam gel sedangkan molekul yang lebih besar hampir tidak bergerak. Molekul dengan ukuran sedang dapat bergerak di dalam gel sesuai dengan ukurannya. Media pilihan pada elektroforesis adalah gel poliakrilamida, sebab secara kimia bersifat inert dan dapat dengan mudah dibentuk dari polimerisasi akrilamida. Selain itu, ukuran pori dapat diatur dengan memilih berbagai konsentrasi akrilamid dan metilen bisakrilamida (reagent pengikat) pada saat polimerisasi (Stryer, 2000)

Reaksi pembentukan polimer ini diawali oleh suatu sistem yang menghasilkan radikal bebas. Umumnya, polimerisasi diawali dengan menambahkan ammonium persulfat (APS), sebagai inisiator, dan tetrametilendiamin (TEMED) sebagai akselerator. Pada sistem ini TEMED mempercepat pemecahan molekul APS menjadi sulfat radikal bebas, yang selanjutnya akan mengawali reaksi polimerisasi akrilamid dan bisakrilamid. Tanpa adanya bisakrilamid akan terbentuk rantai polimerisasi akrilamid yang panjang, yang menghasilkan larutan kental namun bukan berupa gel. Dengan penambahan bisakrilamid, pada rantai akrilamid tersebut akan terbentuk

ikatan lintas silang (*cross-link*) pada interval tertentu sehingga terbentuk suatu jaringan dengan besar pori tertentu. Konsentrasi akrilamid menentukan ukuran pori-pori gel yang terbentuk sehingga ukuran pori dapat diatur dengan mengatur konsentrasi akrilamid. Makin rendah konsentrasi akrilamid yang digunakan makin besar ukuran pori-pori gel, namun gel menjadi lunak dan mudah patah.

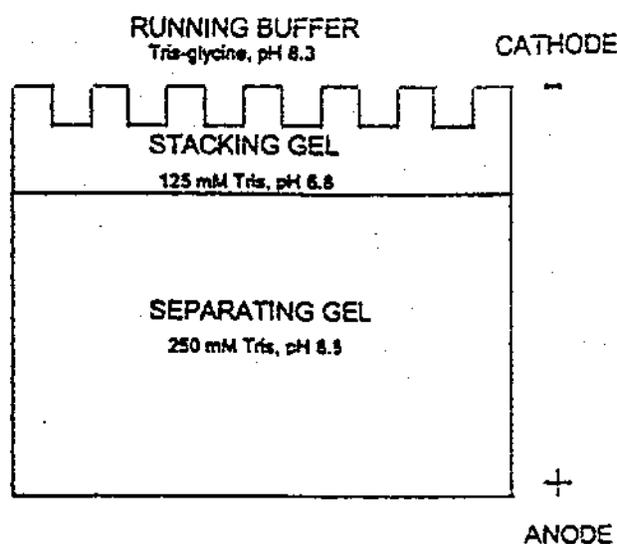


Gambar 2.4 Reaksi pembentukan poliakrilamid (Stryer, 2000)

2.10.1 Elektroforesis SDS - PAGE

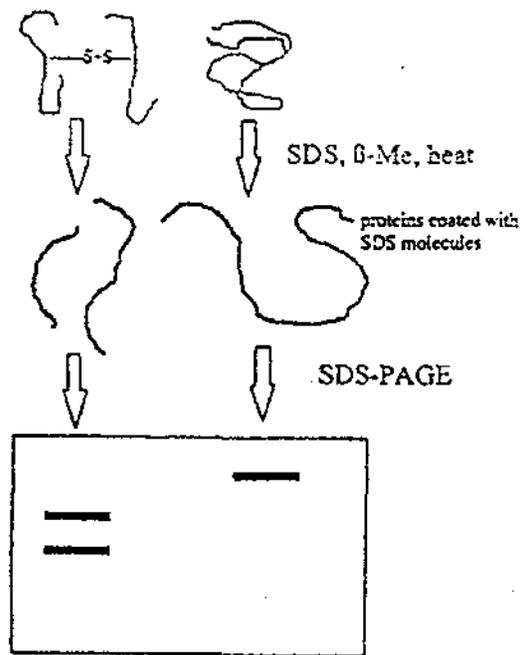
Teknik operasional SDS-PAGE meliputi gel lempeng (*slab gel*) dan gel tabung (*tube gel*). Pada teknik gel lempeng, gel yang digunakan berupa irisan lapisan tipis yang diapit oleh dua buah pelat gelas. Pada teknik gel tabung, gel yang digunakan dibentuk dengan pendukung tabung gelas.

Sistem buffer yang umumnya digunakan pada elektroforesis protein dengan gel SDS-PAGE adalah sistem buffer diskontinyu. Keunggulan sistem ini adalah menghasilkan profil pita yang lebih baik dan lebih tajam. Gel yang digunakan pada sistem ini terdiri dari gel penumpuk (*stacking gel*) yang berpori besar dan gel pemisah (*separating / resolving gel*) yang berpori kecil. Gel penumpuk berada diatas gel pemisah mempunyai konsentrasi akrilamid, molaritas dan pH buffer yang lebih rendah dari pada gel pemisah.



Gambar 2.5 Gel sistem diskontinyu yang terdiri dari staking gel dan separating gel (DeCourcy, 2000)

Sampel diletakkan diatas gel penumpuk yang berpori besar dengan cepat akan tertumpuk dalam suatu zona yang sangat sempit (*stack*) kemudian masuk ke gel pemisah berpori kecil sebagai suatu pita yang tipis. Setelah memasuki gel pemisah molekul sampel terpisah berdasarkan muatan dan ukuran (berat molekul).



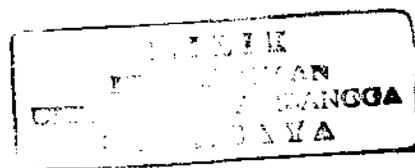
Gambar. 2.6 Denaturasi protein dan reduksi ikatan disulfide dengan adanya SDS dan β - Mercaptoetanol (DeCourcy, 2000)

Untuk memisahkan protein hanya berdasarkan berat molekul dapat dilakukan dengan menambahkan suatu deterjen anionik dan menambahkan tahap denaturasi. Pada proses persiapan sampel ditambahkan suatu deterjen ionik seperti sodium dodesil sulfat (SDS) dengan pemanasan 100°C selama 2 – 10 menit. Dengan cara ini sebagian besar polipeptida diselubungi oleh SDS yang akan menghilangkan perbedaan muatan dan perbedaan konformasi di antara protein-protein tersebut dengan memberi muatan negatif. Kompleks SDS polipeptida berbentuk seperti batang dan bermuatan negatif, dan muatan ini tidak dipengaruhi oleh pH pada kisaran pH 7-10 . Dengan demikian migrasi polipeptida dalam gel poliakrilamid hanya berdasarkan berat molekulnya. Kecepatan migrasi protein selama elektroforesis akan berbanding terbalik dengan berat molekulnya. Semakin besar molekul maka semakin lambat migrasinya. Setelah terjadi pemisahan, protein dalam gel dapat terlihat setelah

diwarnai dengan perak atau zat pewarna seperti biru Coomassie, yang akan terlihat sebagai pita-pita.

Protein juga dapat dipisahkan secara elektroforesis berdasarkan muatan relative residu asam dan basa. Titik isoelektrik (pI) suatu protein menunjukkan pH protein bila protein tersebut tidak bermuatan. Pada pH ini, pergerakan elektroforetik adalah nol sebab muatan protein adalah nol. Apabila campuran protein yang terdiri dari sitokrom c dengan pI 10,6 dan albumin dengan pI 4,8 dilakukan elektroforesis dengan gradient pH menggunakan gel tanpa SDS, maka tiap protein akan bergerak sampai pada posisi pH sama dengan pI tiap protein. Pemisahan isoelektrik dapat memisahkan protein dengan perbedaan pI sekecil 0,01, berarti protein yang berbeda satu muatannya dapat dipisahkan.

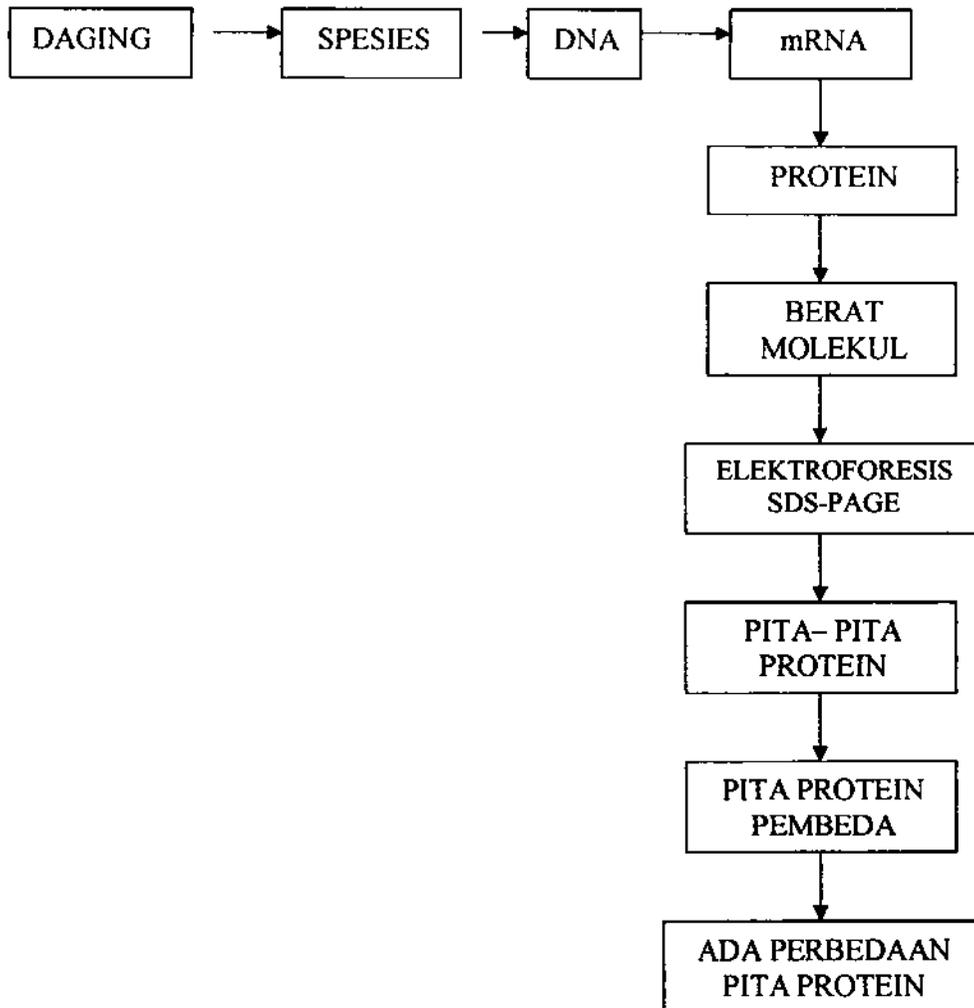
Pemisahan isoelektrik dapat dikombinasikan dengan elektroforesis SDS-gel poliakrilamida dan akan menghasilkan pemisahan yang sangat baik. Pada satu sampel dilakukan teknik pemisahan isoelektrik, kemudian gel diletakkan horizontal sehingga pita yang telah terbentuk terletak dibagian atas SDS-poliakrilamida. Di bagian atas gel akan terbentuk protein yang terpecah tergantung pergerakannya pada pemisahan isoelektrik. Kemudian dilakukan elektroforesis dengan arah tegak lurus untuk mendapat pola titik dua-dimensi. Dalam gel ini, protein telah dipisahkan dengan arah horizontal berdasarkan titik isoelektrik dan dengan arah vertical berdasarkan massa protein. Dengan cara satu kali elektroforesis dua dimensi ini, lebih dari seribu protein bakteri *Escherichia coli* dapat dipisahkan.



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

Molekul DNA yang terdapat dalam inti sel mampu mensintesis molekul RNA yang merupakan cetakan bagi sintesa protein. Protein mendapatkan urutan asam amino yang tepat, karena setiap molekul RNA membawa sandi yang diberikan oleh DNA pada saat mensintesis molekul RNA tersebut.

Ada perbedaan susunan DNA dari spesies yang satu dibandingkan dengan yang lain. Dengan demikian protein daging yang ada pada spesies yang satu dengan yang lain diduga mempunyai perbedaan.

Dengan menggunakan teknik pemisahan elektroforesis SDS-PAGE maka adanya perbedaan di dalam komposisi protein akan menghasilkan pemisahan dalam bentuk pita protein dengan berat molekul yang berbeda, dengan demikian bisa di cari pita yang menjadi pita protein pembeda untuk penentuan daging babi dan campurannya baik sebelum direbus maupun sesudah direbus.

3.2 Hipotesis

Adanya pita protein pembeda sebagai petunjuk adanya daging babi baik sebelum maupun sesudah direbus berdasarkan perbedaan pita protein hasil pemisahan dengan elektroforesis SDS-PAGE antara daging sapi dan babi.

BAB 4

BAHAN, ALAT DAN METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian terdiri dari sampel yang berupa daging dan bahan kimia yang merupakan reagent yang di pakai untuk penelitian ini.

4.1.1 Sampel

Sampel berupa daging yang diambil dari 4 ekor sapi dan 4 ekor babi pada bagian yang kurang mengandung lemak yaitu pada lula dalam . Sapi yang diambil dagingnya merupakan sapi bangsa peranakan Ongole (PO) dan babi Tulungagung (babi lokal) . Daging langsung di ambil dari rumah potong hewan (RPH) di Pegirian Surabaya. Selama preparasi sampel dan selama pengerjaan daging disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C

4.1.2 Bahan Kimia

Jika tidak disebutkan lain maka bahan yang digunakan mempunyai derajat kemurnian *electrophoresis grade*. Bahan yang digunakan adalah sebagai berikut :

1. Akrilamid
2. Bis- akrilamid (N,N' – metilenbisakrilamid)
3. Tris (2 – hidroksimetil –2- metil –1,3 – propanediol)
4. SDS (sodium dodecyl sulfate atau sodium lauryl sulfate)
5. APS (Ammonium persulfat) (pa)
6. 2- Merkptoetanol (biologi molekuler)
7. Gliserol (pa)

8. Bromfenol biru
9. Glisin
10. Metanol (pa)
11. Komasi biru R-250, HCl (pa)
12. NaCl (pa)
13. Asam asetat glasial (pa)
14. Perak nitrat (pa)
15. *Rainbow coloured protein molecular weight markers*

4.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan berupa alat gelas dan non gelas antara lain :

- (1). Seperangkat alat elektroforesis Bio Rad PAC 300
- (2). Hot plate LABINCO
- (3). Refrigerated Centrifuge Hitachi Himac SCR 20 B
- (4). Mikropipet Eppendorf dengan tipnya untuk loading
- (5). Tabung Eppendorf 1,5 ml
- (6). Water Bath shaker Taitec Personal -11
- (7). Tabung dialisis
- (8). Freeze drying EYELA FD-1
- (9). Chromato Scanner Dual Wavelength CS-930 Shimadzu
- (10) Spectrofotometer UV-Visible UV-1601 Shimadzu.

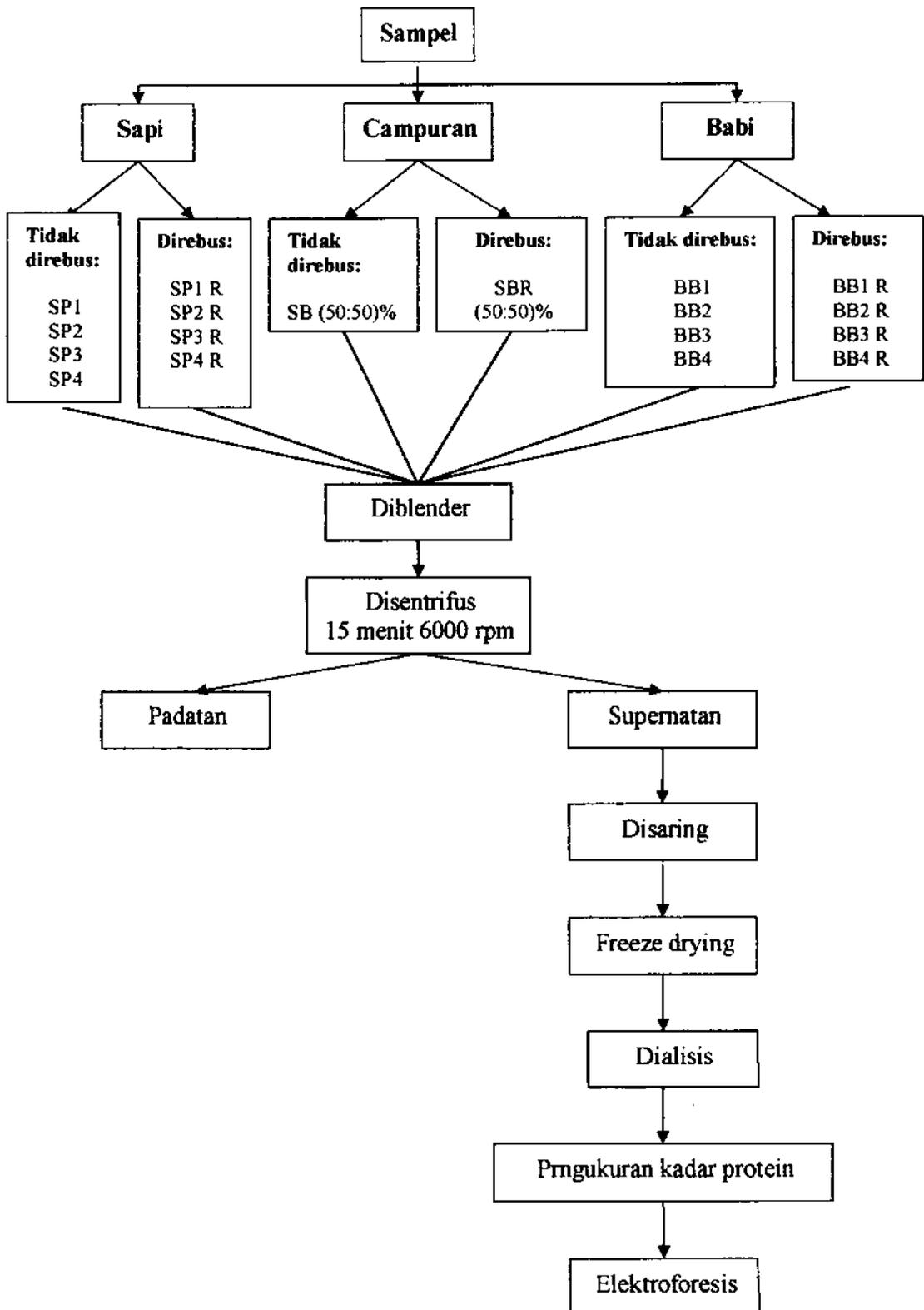
4.3 Metodologi Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif dengan mencari data untuk menentukan marker protein daging babi, sapi dan campurannya. Analisis data diuraikan secara diskriptif dari data-data yang diperoleh selama penelitian di laboratorium.

4.3.2 Skema Kerja

Sampel daging yang diambil dari 4 sapi dan 4 babi masing-masing ditimbang dengan berat yang sama \pm 30 gram. Kemudian dilakukan ekstraksi protein terlarutnya dengan menambahkan 60 ml NaCl 0,9 % dan diblender selama 5 menit. Untuk campuran ditimbang daging sapi dan babi dengan perbandingan (50:50) % dan selanjutnya dikerjakan seperti diatas. Hasil dari ekstraks kasar dari protein yang diperoleh kemudian disentrifus 6000 rpm selama 15 menit, dan selanjutnya disaring. Supernatan yang dihasilkan dikumpulkan, kemudian dilakukan dialisis untuk memperoleh kandungan protein yang lebih murni karena partikel-partikel kecil dan ion-ion akan melewati pori-pori selaput semipermeabel tersebut akan keluar dari kantong dialisis. Setelah dialisis selesai maka sampel siap untuk dipakai elektroforesis, dan sebelum dilakukan elektroforesis dilakukan pengukuran konsentrasi protein dari masing-masing ekstrak protein yang diperoleh Untuk lebih jelasnya bisa dilihat skema kerja pada gambar 4.1



Gambar 4,1 Skema kerja

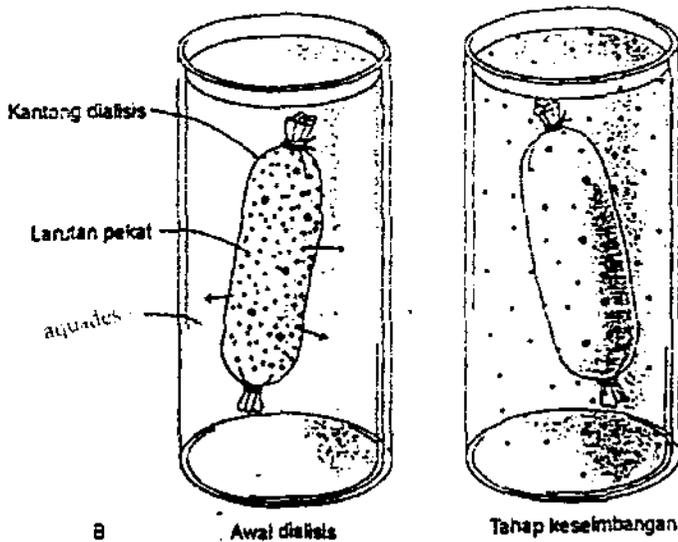
4.3.3 Larutan Kerja

- (1) Larutan A terdiri dari : Akrilamid 29,2 gram (30 % b/v) , Bis-akrilamid 0,8 gram (0,8 % b/v), dan akuades sampai 100 ml .
- (2) Larutan B terdiri dari (buffer gel pemisah 4 x) terdiri dari: Tris HCl 2 M pH 8,8 75 ml, SDS 10 % 4 ml dan akuades 21 ml
- (3) Larutan C (buffer gel penyusun 4x) terdiri dari : Tris HCl 1 M pH 6,8 50 ml, SDS 10 % 4 ml, dan akuades 46 ml
- (4) Amonium persulfat 10 % terdiri dari : Ammonium persulfat 0,5 gram dan akuades 5 ml
- (5) Bufer Elektroforesis terdiri dari : Tris 3 gram, Glisin 14,4 gram SDS 1 gram dan akuades 1 liter
- (6) Bufer sampel (5 x) terdiri dari : Tris HCl 1 M pH 6,8 0,6 ml, Gliserol 50 % 5 ml, SDS 10 % 2 ml, 2 – Merkaptoetanol 0,5 ml, Bromfenol Biru 0,1 % 1 ml dan akuades 0,9 ml.
- (7) Larutan pewarna gel komasi terdiri dari : 1,0 gr komasi biru R-250 , metanol 450 ml akuades 450 ml dan asam asetat glacial 100 ml.
- (8) Larutan penghilang warna gel terdiri dari : metanol 100 ml, asam asetat glacial 100 ml dan akuades 800 ml.

4.3.4 Pemurnian Protein

Pemurnian protein dilakukan dengan cara dialisis yaitu dengan merendam kantong dialisis yang sudah terisi supernatan dari ekstraks protein dalam beaker glass besar yang diisi akuades sebanyak 3 liter . Dialisis dikerjakan di dalam lemari es dan dilakukan pengadukan perlahan selama pengerjaan berlangsung menggunakan magnet *stirrer*. Akuades diganti setiap 2 jam sekali dan setiap penggantian dilakukan

pengetesan adanya ion Cl^- menggunakan perak nitrat. Dialisis diakhiri sampai tes adanya ion Cl^- hasilnya negatif.



Gambar 4.2 Dasar pemisahan molekul berdasarkan besar molekul dengan dialisis; molekul protein yang tertahan dalam kantong dialisis, sedangkan molekul kecil berdifusi ke medium (Stryer, 2000).

4.3.5 Penentuan Konsentrasi Protein

Untuk menentukan konsentrasi protein secara cepat dan larutan sampel yang mengandung protein yaitu dengan cara mengukur absorbansi pada λ 280 nm . Pada pengujian ini didasarkan pengukuran residu penillalanin, tirosin dan triptofan sehingga kalau protein tersebut tidak mengandung residu tersebut maka tidak akan terdeteksi. Koreksi untuk asam nukleat yang terukur (Schleif and Wesink, 1981), maka konsentrasi protein bisa dihitung dengan rumus di bawah ini :

$$\text{Konsentrasi protein (mg / ml)} = 1,5 \times A_{280} - 0,75 \times A_{260}$$

4.3.6 Perhitungan jumlah larutan stok untuk gel pemisah dengan kadar akrilamid X % adalah sebagai berikut :

Larutan A	X/3 ml
Larutan B	2,5 ml
Akuades	(7,5 - X/3) ml
APS 10 %	50 μ l
TEMED	5 μ l

Volume total 10 ml

Tabel.4.1 Hitungan konsentrasi akrilamid gel pemisah 15 %, 17,5 % dan 20 % dalam volume 10 ml

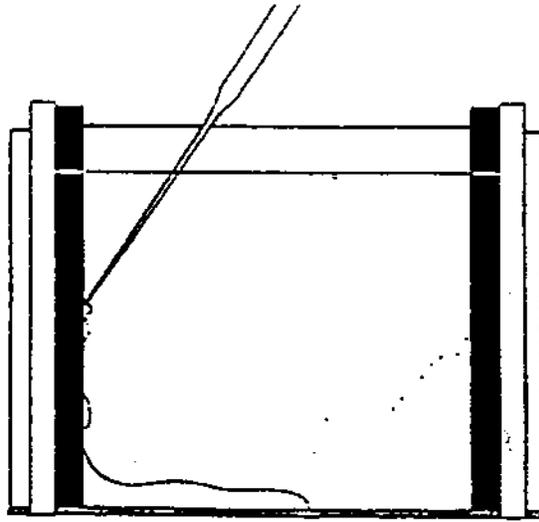
Nama Bahan	Konsentrasi 15 %	Konsentrasi 17,5 %	Konsentrasi 20 %
Larutan A	5 ml	5,83 ml	6,67 ml
Larutan C	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Akuades	2,5 ml	1,67 ml	0,83 ml
APS 10 %	50	50	50
Temed	5	5	5

Untuk membuat gel penyusun memakai rumus yang sama tetapi untuk larutan B diganti dengan larutan C. Gel penyusun yang dipakai mempunyai konsentrasi 5%.

4.3.7 Pembuatan gel pemisah

- 1) Mempersiapkan pelat kaca dengan ukuran 10x10 cm, tebal gel 0,75 mm yang terdiri dari 10 sumur dan diisi air terlebih dahulu untuk menguji adanya kebocoran.
- 2) Larutan A dan B dicampur dalam beaker glass kecil dan ditambahkan air suling

- 3) Kemudian ditambahkan ammonium persulfat dan TEMED ke dalam campuran, sambil diaduk perlahan dan segera tuang ke dalam cetakan gel menggunakan pipet yang disandarkan pada bagian tepi
- 4) Penuangan gel sampai 1,5 cm dari bagian atas pelat kemudian dilapiskan air suling 1-5 mm dan selanjutnya gel dibiarkan terpolimerisasi.

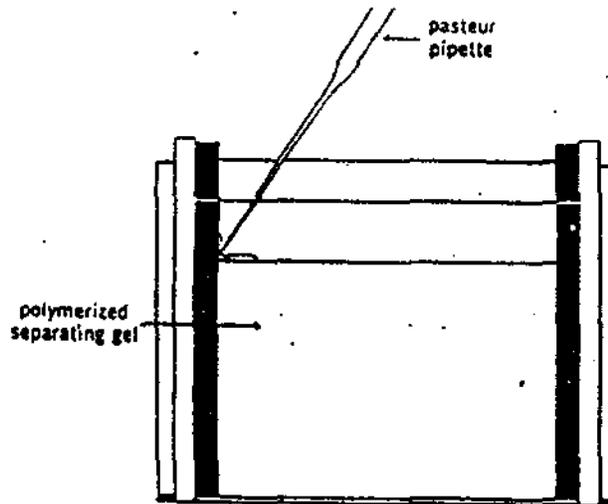


Gambar 4.3 Cara menuang gel pemisah

4.3.8 Pembuatan gel penyusun

- 1) Air yang melapisi gel pemisah dibuang
- 2) Larutan A dan C dicampur dan ditambah air suling
- 3) Ditambahkan ammonium persulfat dan TEMED, dengan pengadukan perlahan
- 4) Larutan gel penyusun dituang diatas gel pemisah menggunakan pipet sampai penuh
- 5) Cepat-cepat sisir dimasukkan ke dalam gel penyusun sebelum gel memadat
- 6) Gel penyusun dibiarkan selama 30 menit sampai terpolimerisasi sempurna

- 7) Sisir diambil dengan cara diangkat secara hati-hati
- 8) Gel beserta cetakannya diposisikan pada sistem elektroforesis
- 9) Bufer elektroforesis dimasukkan ke dalam *reservoir* atas dan bawah
- 10) Sumur-sumur perlu diperiksa apakah terdapat gelembung udara atau terdistorsi umbainya, hal ini bisa dihindarkan dengan menggunakan alat injeksi Hamilton .



Gambar 4.4 Cara menuang gel penyusun

4.3.9 Preparasi Sampel

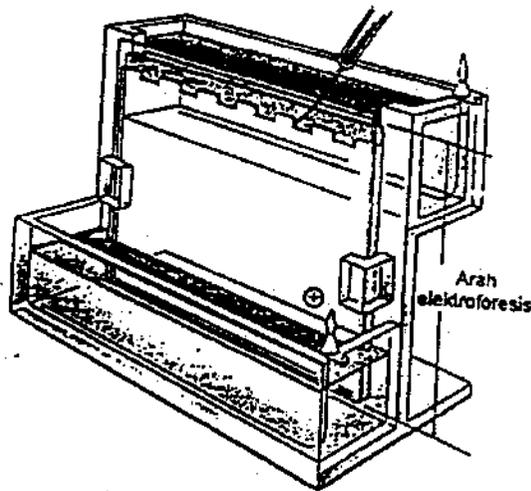
Larutan sampel protein sebanyak 20 μ l dicampur dengan 5 μ l buffer sampel 5x dalam tabung Eppendorf, dipanaskan pada 100 °C selama 5 menit kemudian disentrifus pada mikrofuga selama 1 detik untuk menghilangkan *debris*. Apabila banyak *debris* perlu waktu lebih lama untuk sentrifus.

4.3.10 Perlakuan Perebusan

Untuk perebusan dilakukan terhadap daging babi ,sapi dan campuran sapi dan babi dipanaskan 100 °C selama 5 menit . Untuk selanjutnya dilakukan preparasi sampel seperti prosedur diatas..

4.3.11 Cara Menuang sampel (*loading*)

Sampel dimasukkan ke dalam sumur menggunakan alat injeksi Hamilton atau tip *dispusibel* . Sampel diteteskan pada bagian dasar sumur, alat injeksi diangkat perlahan bersamaan dengan naiknya permukaan larutan sampel dalam sumur.



Gambar 4,5 Cara memasukkan sampel protein

4.3.12 Cara Menggunakan Alat Elektroforesis

- 1) *Plug elektrode* ditancapkan pada elektroda yang sesuai
- 2) Sumber arus dinyalakan pada 200 V dengan voltase konstan , arus akan menunjukkan 110 mA

- 3) Elektroforesis dilangsungkan sampai permukaan pewarna bermigrasi 1-5 mm dari dasar gel.
- 4) Sumber arus dimatikan, *plug elektrode* dicabut, dan gel dikeluarkan dari sistem elektroforesis. Kemudian gel siap untuk diberi pewarna.

4.3.13 . Pewarnaan (*Staining*)

Gel diangkat dari sistem elektroforesis dengan menggunakan sarung tangan dan dimasukkan ke dalam kontainer berisi 20 ml larutan pewarna gel komasi kemudian diagitasi selama 30 menit pada *rocking shaker* dengan kecepatan rendah. Selama agitasi kontainer dalam keadaan tertutup

4.3.14 Penghilangan Warna (*Destaining*)

Larutan pewarna gel komasi dikeluarkan dari kontainer gel dibilas cepat-cepat dengan akuades, setelah itu akuades dibuang dan selanjutnya dicuci dengan larutan penghilang warna gel sekitar 50 ml kemudian diagitasi beberapa saat dalam kontainer tertutup. Untuk menghilangkan warna secara sempurna perlu diagitasi semalam dengan beberapa kali mengganti larutan penghilang warna gel.

4.3.15 Cara Analisis Data

1. Untuk melihat perbedaan profil pita-pita protein antara daging sapi dan babi dilakukan dengan cara membandingkan profil pita protein yang muncul pada sapi dan babi pada daging mentah.

2. Menentukan pita pembeda antara protein daging sapi dan babi yaitu pita protein yang ada pada babi tetapi tidak ditemukan pada sapi atau sebaliknya. .
3. Menentukan pita protein pembeda pada campuran antara daging sapi dan babi pada daging mentah.
4. Langkah yang sama pada no 1,2 dan 3 dilakukan pada daging yang direbus.
- 5 Menentukan Rf dari pita protein pembeda daging sapi dan babi dengan menggunakan TLC-Scanner
6. Menentukan berat molekul pita protein pembeda dibandingkan dengan pita protein *marker* standar.

BAB 5**ANALISIS HASIL PENELITIAN****5.1 Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Sampel.**

Pengukuran konsentrasi protein dilakukan untuk mengetahui konsentrasi protein dari masing-masing sampel. Hal ini perlu dilakukan agar kadar protein dalam setiap *ranning* kurang lebih sama sehingga tidak mempengaruhi profil pita hasil elektroforesis. Table 5.1 berikut ini mencantumkan kadar protein sampel.

$$C \text{ (mg / ml)} = 1,5 \times A_{280} - 0,75 \times A_{260}$$

Tabel 5.1 Kadar protein dari sampel sapi, babi dan campurannya.

No.	Nama Sampel	A pada λ 280 nm	A pada λ 260 nm	Kadar Protein terukur (mg/ml) pada pengenceran 70 kali	Kadar Protein (mg/ml)
1	Sp1	0,349	0,292	0,305	21,350
2	Sp2	0,406	0,314	0,374	26,180
3	Sp3	0,473	0,325	0,466	32,620
4	Sp4	0,430	0,405	0,341	23,870
5	Bb1	0,523	0,506	0,405	28,350
6	Bb2	0,772	0,636	0,681	47,670
7	Bb3	0,482	0,376	0,441	30,870
8	Bb4	0,615	0,611	0,464	32,480
9	Sp1R	0,268	0,378	0,119	8,330
10	Sp2R	0,281	0,427	0,101	7,070
11	Sp3R	0,320	0,236	0,303	21,210
12	Sp4R	0,234	0,322	0,109	7,630
13	Bb1R	0,331	0,493	0,127	8,890
14	Bb2R	0,317	0,366	0,201	14,070
15	Bb3R	0,311	0,423	0,149	10,430
16	Bb4R	0,287	0,451	0,092	6,440
17	SB	0,521	0,475	0,425	29,750
18	SBR	0,201	0,200	0,150	10,500

Keterangan Tabel 5.1 Sp = Sapi ; Bb = Babi ; SpR = Sapi Rebus ; BbR = Babi Rebus ; SB = Campuran Sapi dan Babi (50:50) % ; dan SBR = Campuran Sapi dan Babi Rebus (50:50)%

5.2 Pemekatan Larutan Protein Sampel

Hasil pengukuran kadar protein sampel sangat bervariasi. Untuk itu perlu pemekatan sampel Sp1R, Sp2R, Sp4R, Bb1R, Bb2R, Bb3R, Bb4R dan SBR, dengan menggunakan *freeze drying* sampai kadar protein sampel dalam setiap ml kurang lebih sama.

Tabel 5.2 Konsentrasi sampel hasil pemekatan

No	Nama Sampel	Kadar Protein mg/ml
1	Sp1R	20,734
2	Sp2R	18,956
3	Sp4R	19,530
4	Bb1R	20,685
5	Bb2R	25,263
6	Bb3R	19,586
7	Bb4R	17,938
8	SB	22,624

Kadar protein dari 18 sampel setelah pemekatan masih bervariasi yaitu dengan nilai rata-rata 25,981 mg/ml dan KV 27,897 %. Untuk memperoleh kadar sampel yang kurang lebih sama maka sebelum *running* dilakukan pengenceran.

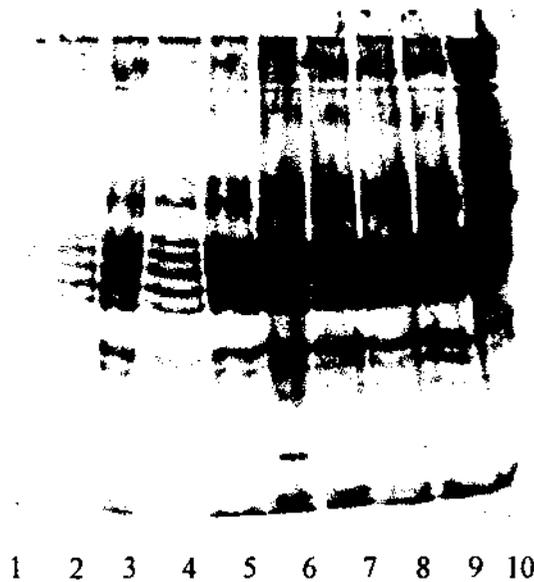
5.3 Hasil penentuan sensitivitas

Kadar protein untuk pengujian sensitivitas dari profil pita protein pada tabel 5.3

Tabel 5.3 Pengenceran kadar protein untuk pengujian sensitivitas.

NO	Volume Sampel μ l	Volume Akuades μ l	Kadar Protein mg/ml
1	100	900	4,767
2	200	800	9,534
3	300	700	14,301
4	400	600	19,068
5	500	500	23,835
6	600	400	28,602
7	700	300	33,369
8	800	200	38,136
9	900	100	42,903
10	1000	0	47,670

Hasil penentuan sensitivitas konsentrasi sampel terhadap profil pita protein dari sampel daging babi (Bb2) dengan konsentrasi sampel 47,670 mg/ml dapat dilihat pada gambar 5.1. Pita protein sampel 1 dan 2 bagian atas yang tidak nampak karena konsentrasinya terlalu kecil sehingga intensitas dari pita protein tersebut lemah. Sampel dengan no 3 sampai no 9 menghasilkan profil pita protein yang lebih bagus dan hampir sama. Sedangkan untuk sampel dengan no 10 menghasilkan profil pita protein yang kurang memisah (*tailing*), karena konsentrasi dari sampel terlalu pekat sehingga sulit terjadinya pemisahan. Dengan hasil yang diperoleh maka untuk *running* harus menggunakan konsentrasi mulai 14,301 mg/ml sampai dengan 42,903 mg/ml.

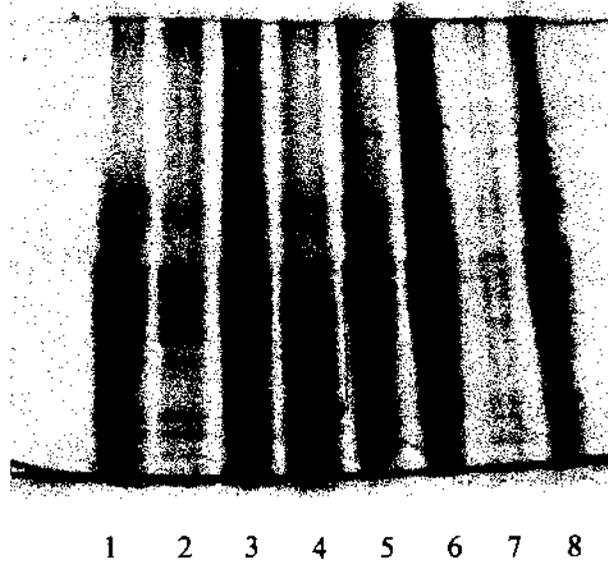


Gambar 5.1 Penentuan sensitivitas profil pita protein (pengenceran no 1 sampai dengan 10)

5.4 Optimasi konsentrasi akrilamid gel pemisah

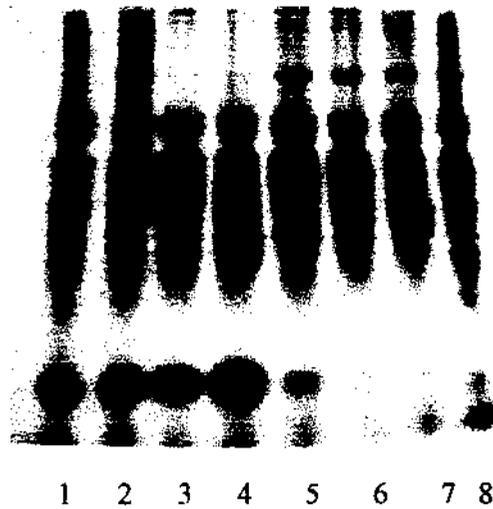
Optimasi gel pemisah dengan 3 variasi kadar akrilamid yaitu 15%, 17,5% dan 20%. Dari ketiga kondisi tersebut dipilih kadar akrilamid gel pemisah yang optimal yaitu yang dapat memberikan hasil resolusi yang paling baik dengan yang

memunculkan banyak pita protein yang tipis, tajam dan tidak terjadi *overlab*. Profil pita protein daging sapi dan daging babi mentah hasil elektroforesis pada gel pemisah 15% , 17,5% dan 20 % bisa dilihat pada gambar 5.2 gambar 5.3 dan gambar 5.4.



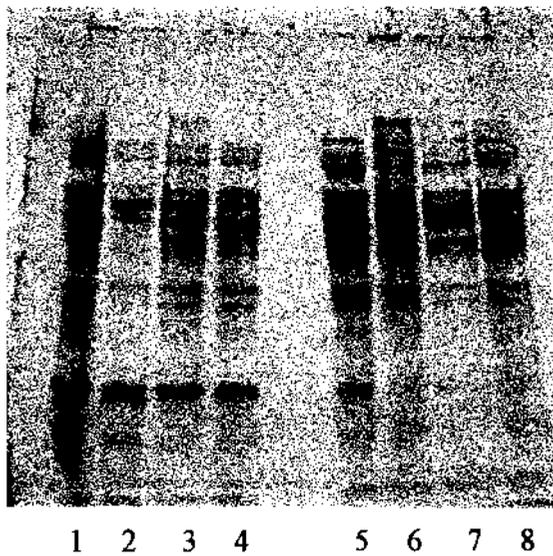
Gambar 5.2 Profil pita protein yang dihasilkan dari gel pemisah dengan konsentrasi akrilamid 15% (1=Sp1; 2=Sp2; 3=Sp4; 4=Sp5; 5=Bb1; 6=Bb2; 7=Bb3; dan 8 = Bb4)

Gel pemisah dengan konsentrasi akrilamid 15% menghasilkan sedikit profil pita protein karena sebagian pita protein sudah lepas dari gel. Hal ini terjadi karena semakin kecil kadar akrilamid maka semakin besar pori-pori akrilamid sehingga molekul protein berjalan lebih cepat. Selain itu profil pita protein yang dihasilkan antara molekul protein yang mempunyai berat molekul berdekatan masih belum memisah (*overlab*) sehingga pita proteinnya melebar.



Gambar 5.3 Profil pita protein yang dihasilkan dari gel pemisah dengan konsentrasi akrilamid 17,5% (1=Sp1; 2=Sp2; 3=Sp3; 4=Sp4; 5=Bb1; 6=Bb2; 7=Bb3 dan 8=Bb4)

Gel Pemisah dengan konsentrasi akrilamid 17,5% menghasilkan profil pita protein yang lebih banyak tetapi masih melebar dan *overlab*. Pada kondisi ini sudah terlihat adanya pita beda pada babi dengan intensitas yang kuat dibandingkan dengan daging sapi yang intensitasnya lemah.

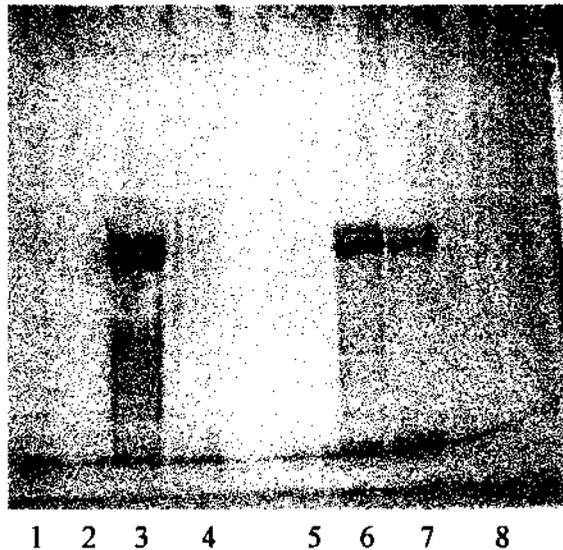


Gambar 5.4 Profil pita protein daging sapi dan daging babi pada gel pemisah dengan konsentrasi akrilamid 20% (1=Sp1; 2=Sp2; 3=Sp3; 4=Sp4; 5=Bb1; 6=Bb2; 7=Bb3 dan 8=Bb4)

Elektroforesis pada gel pemisah dengan konsentrasi akrilamid 20% menghasilkan profil pita protein yang lebih banyak, tipis dan tajam. Selain itu ditemukan adanya satu pita beda pada babi yang tidak ditemukan pada sapi. Dengan hasil tersebut bisa disimpulkan bahwa kondisi optimum dari konsentrasi akrilamid gel pemisah adalah 20%. Untuk selanjutnya *running* dilakukan pada gel pemisah dengan konsentrasi akrilamid 20%.

5.5 Profil pita protein dari sampel yang direbus

Ekstrak protein yang dihasilkan dari sampel protein yang direbus kadarnya lebih rendah dan hasil elektroforesisnya bisa dilihat pada gambar 5.5

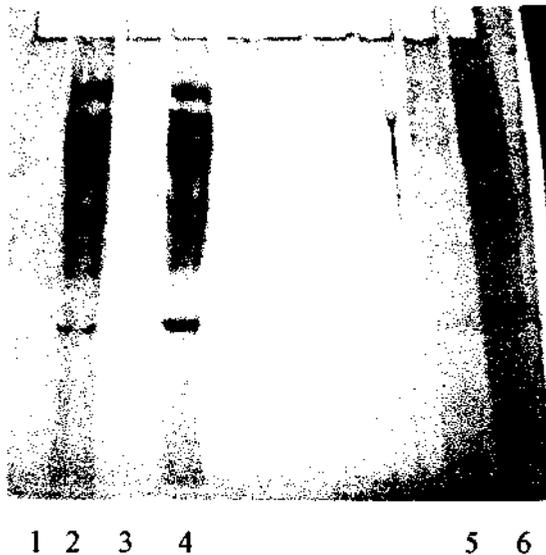


Gambar 5.5 Profil pita protein yang dihasilkan dari daging rebus pada konsentrasi akrilamid 20% (1=Sp1R, 2=Sp2R, 3=Sp3R, 4=Sp4R, 5=Bb1R, 6=Bb2R, 7=Bb3R dan 8=Bb4R)

Hasil elektroforesis daging rebus hanya muncul dua pita protein yang sama pada satu sampel sapi (Sp3R), dan dua sampel babi (Bb2R dan Bb3R) sedangkan yang lain tidak muncul pita protein. Pada daging rebus proteinnya terdenaturasi sehingga kelarutannya berkurang dan sulit untuk bereaksi dengan SDS dan β -Merkaptoetanol

5.6 Profil pita protein dari campuran daging sapi dan babi

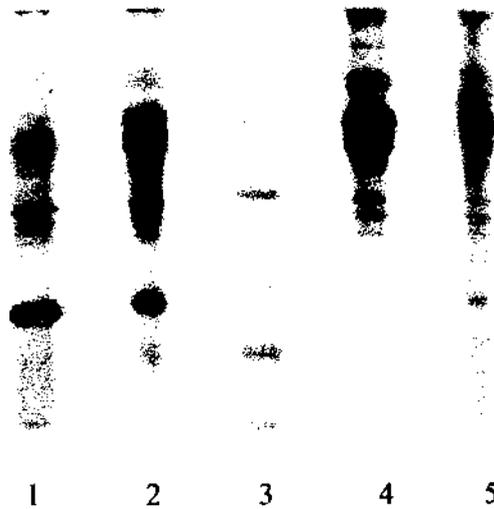
Hasil elektroforesis campuran dari daging sapi dan babi pada daging mentah dan daging yang direbus dengan perbandingan 50:50% dapat dilihat pada gambar 5.6 Profil pita protein campuran pada daging mentah muncul profil pita protein yang sama pada daging sapi (Sp1) dan protein daging babi (Bb1). Dan untuk daging rebus campuran tidak muncul pita protein, demikian juga pada sapi rebus (Sp1R) dan babi rebus (Bb1R)



Gambar 5.6 Profil pita protein daging sapi, babi dan campuran (1=Sp1R; 2=Sp1; pada gel pemisah dengan konsentrasi akrilamid 20% 1=Sp1R; 2=Sp1; 3=Bb1R;4= Bb1; 5=SBR dan 6=SB)

5.7 Penentuan pita pembeda dari protein daging babi

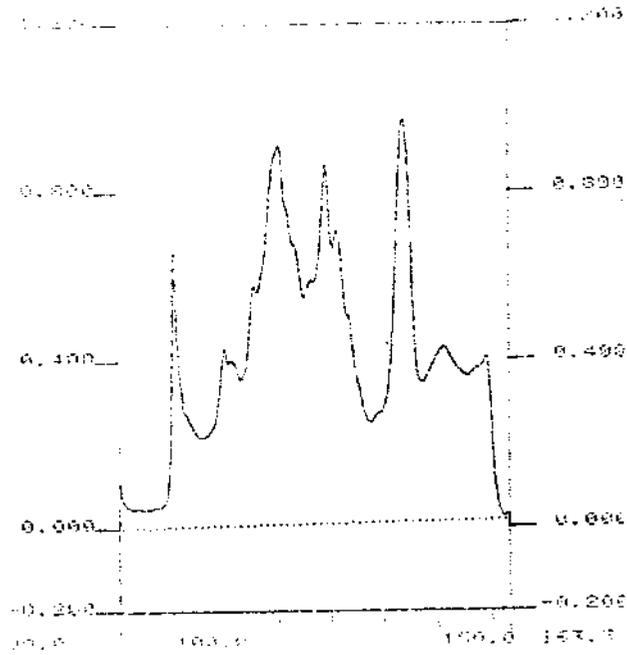
Hasil running penentuan marker protein daging babi bisa dilihat pada gambar 5.7. Dari profil pita protein yang muncul bisa dilihat adanya pita beda pada babi yang tidak ditemukan pada sapi dengan harga Rf 0,152 untuk Bb3 dan 0,148 untuk Bb1. Pita beda tersebut kemudian dianggap sebagai pita protein pembeda daging babi dengan Rf rata-rata 0,15.



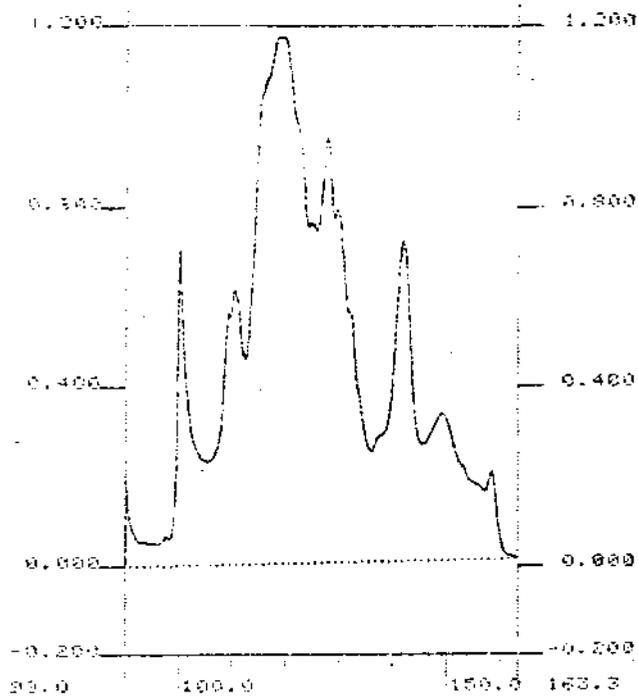
Gambar 5.7 Profil pita protein daging sapi, daging babi dan *marker* protein penentu berat molekul pada gel akrilamid dengan konsentrasi 20% (1=Sp4; 2=Sp3 ; 3=*marker* protein penentu BM , 4= Bb3; dan 5=Bb1)

5.8 Identifikasi pita protein daging sapi dan babi dengan TLC-Scanner

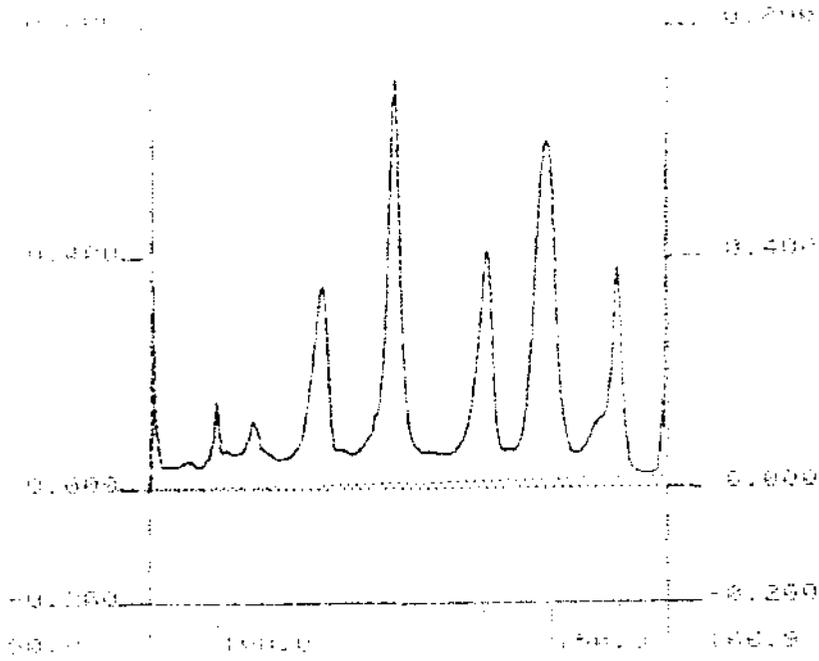
Untuk mempertajam analisis profil pita protein maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan TLC-Scanner. Hasil kromatogram TLC-Scanner bisa dilihat pada gambar 5.8, 5.9, 5.10, 5.11, dan gambar 5.12.



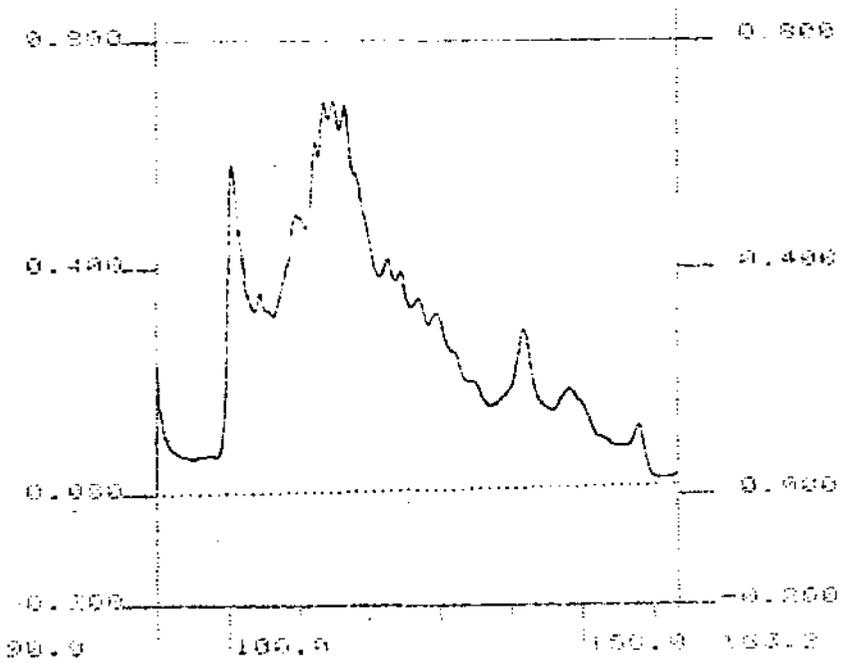
Gambar 5.8 Kromatogram profil pita protein daging sapi (Sp4)



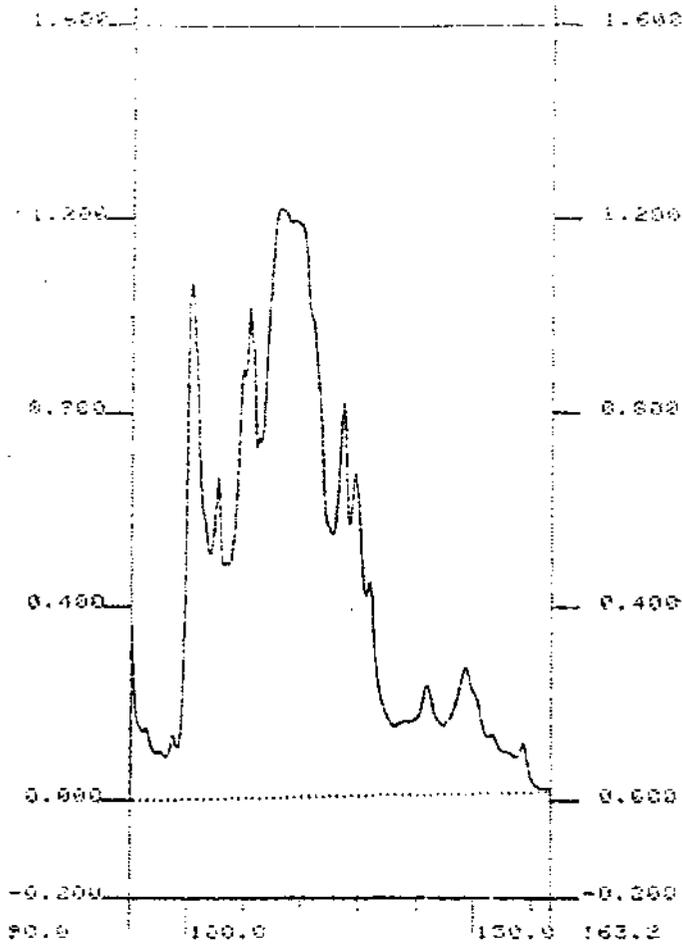
Gambar 5.9 Kromatogram profil pita protein daging sapi (Sp3)



Gambar 5.10 Kromatogram profil pita protein *marker* standar



Gambar 5.11 Kromatogram profil pita protein daging babi (Bb3)



Gambar 5.12 Kromatogram profil pita protein daging babi (Bb1)

Dari kromatogram profil pita protein di atas dapat diidentifikasi adanya profil pita protein dengan mencari harga Rfnya. Harga Rf dihitung dengan cara merubah harga posisi pita dibagi dengan batas akhir *tracking dye*. Data jarak pita protein dengan luas areanya pada lampiran 1 sampai lampiran 5.

$$R_f = \frac{\text{Jarak (cm) pita-pita protein dari batas atas gel pemisah}}{\text{Jarak (cm) tracking dye dari batas atas gel pemisah}}$$

Tabel 5.7 Rf profil pita protein dari daging sapi, babi dan *marker* standar .

Rf Sp4	Rf Sp3	Rf Marker	Rf Bb3	Rf Bb1
-	-	0,056	-	-
-	-	-	0,089	0,088
0,094	0,099	0,095	-	-
-	-	0,116	-	-
-	-	-	0,146	0,141
0,159	-	-	-	-
-	-	0,164	-	-
-	-	-	0,171	-
-	0,183	-	-	-
0,199	-	-	0,199	0,192
-	0,235	-	0,235	-
0,249	-	-	-	0,246
-	-	-	0,256	-
-	-	-	-	0,269
-	-	0,274	-	-
0,288	-	-	-	-
-	-	-	0,299	0,293
-	0,343	-	-	0,346
-	-	0,356	-	-
0,375	-	-	-	-
-	-	-	0,391	-
-	-	-	-	0,404
-	-	-	-	0,425
-	0,441	0,446	-	-
0,452	-	-	-	-
			0,467	
	0,477			0,473
0,490				
			0,509	
	0,521	0,529		
		0,538		0,531
		0,549		
		0,562		
0,569				
		0,574		
				0,596
	0,672			
			0,684	0,681
0,692				
		0,706		
			0,755	
		0,783		
				0,811
0,827	0,827			
0,903				
		0,931		
	0,943			
0,952				

Perbedaan profil ditentukan jika 2 sampel sapi muncul pita sedangkan sampel babi tidak muncul atau sebaliknya. Dari tabel tersebut diatas perbedaan profil pita protein babi pada Rf 0,089 (Bb3), Rf 0,088 (Bb1), Rf 0,146 (Bb3), Rf 0,141 (Bb1), Rf 0,299 (Bb3), Rf 0,293(Bb1), Rf 0,684 (Bb3) dan Rf 0,681 (Bb1) sedangkan pada sapi tidak ditemukan. Selain itu perbedaannya juga dapat dilihat pada Rf 0,094 (Sp4) Rf 0,099 (Sp3), dan Rf 0,827 (Sp4 dan Sp3) sedangkan pada babi tidak ditemukan. Perbedaan profil tersebut ditentukan jika 2 sampel sapi muncul pita sedangkan sampel babi tidak muncul atau sebaliknya.

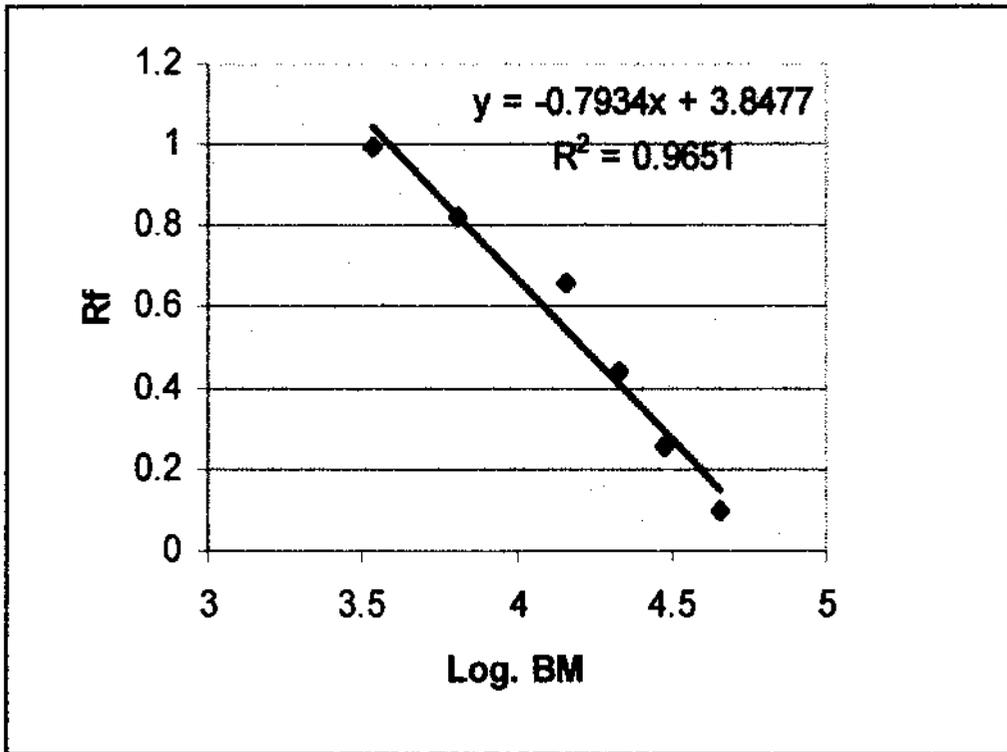
5.9 Penentuan berat molekul pita protein pembeda dari daging babi

Berat molekul ditentukan dengan memasukkan harga Rf kedalam persamaan garis regresi linier marker standar.

Tabel 5.6 Berat Molekul dan Rf Marker Standar

No	Berat Molekul (Dalton)	Wama pita	Rf marker
1	3400	Biru	0,996
2	6500	Biru tua	0,822
3	14300	Magenta	0,661
4	21500	Biru	0,441
5	30000	Oranye	0,258
6	46000	Kuning	0,097

Kurva standar marker protein pada kertas grafik semilog dengan sumbu x berat molekul dan sumbu y mobilitas relatif molekul (Rf).



Gambar 5.13 Grafik Penentuan BM Pita Protein Pembeda Dari Daging Sapi Dan Babi

Dari persamaan garis regresi linier pada gambar 5.7, selanjutnya hasil identifikasi pita protein dengan TLC –Scanner dapat dihitung berat molekulnya.

Tabel 5.7 Berat molekul pita protein pembeda dari daging sapi dan babi

Rf Sapi			BM kD	Rf Babi			BM kD
Sp4	Sp3	Rata-rata		Bb3	Bb1	Rata-rata	
0,094	0,099	0,0965	53,46	0,089	0,088	0,0885	54,71
0,827	0,827	0,827	6,42	0,146	0,141	0,1435	46,64
				0,299	0,293	0,296	29,96
				0,684	0,681	0,6825	9,76

BAB 6

PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi protein dari daging mentah mempunyai kadar protein yang lebih tinggi dari pada daging yang direbus. Pada sampel yang mentah banyak protein yang larut sedangkan yang direbus sedikit protein yang terlarut karena pada pemanasan terjadi denaturasi yang selanjutnya protein tersebut mengalami koagulasi (Winarno,1991).

Dari hasil penentuan sensitivitas profil pita protein diketahui bahwa untuk menghasilkan profil pita protein yang kurang lebih sama maka diperlukan konsentrasi sampel antara 14,301 mg/ml sampai 42,903 mg/ml. Dengan demikian intensitas profil pita protein ditentukan oleh konsentrasi sampel yang digunakan *running*. Untuk sampel dengan konsentrasi terlalu kecil maka profil pita protein tidak muncul atau kemunculannya dengan intensitas yang lemah sehingga sulit diamati. Sampel dengan konsentrasi yang terlalu pekat sulit untuk dipisahkan sehingga hasilnya berekor dan resolusinya tidak baik.

Optimasi gel pemisah didapatkan bahwa konsentrasi akrilamid 20% adalah kondisi yang paling baik karena menghasilkan pita protein yang tipis dan tajam. Semakin rendah kadar akrilamid yang dipakai pada gel pemisah maka semakin besar pori-pori dari akrilamid sehingga protein yang dipisahkan juga bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan kadar akrilamid yang lebih tinggi (DeCourcy. 2000) Karena migrasi protein yang dipisahkan lebih cepat maka pemisahan protein yang mempunyai berat molekul berdekatan masih belum memisah sempurna sehingga pita protein yang dihasilkan melebar dan banyak protein yang sudah keluar dari gel. Untuk mengatasi hal ini gel pemisah yang digunakan harus lebih panjang atau menggunakan

akrilamid dengan konsentrasi yang lebih besar. Gel Pemisah dengan konsentrasi akrilamid yang lebih tinggi mempunyai pori-pori yang lebih kecil sehingga molekul protein berjalan lebih lambat dan memisah dengan sempurna. Dengan demikian banyak memunculkan pita protein yang tipis dan tajam dengan resolusi yang baik.

Untuk sampel yang direbus terlebih dahulu hanya dua profil pita protein yang muncul pada daging sapi dan daging babi. Dari 8 sampel hanya 3 sampel yang muncul 2 pita protein tersebut. Hal ini bisa terjadi karena untuk sampel yang direbus proteinnya mengalami denaturasi sehingga terjadi koagulasi. Dengan penambahan β -Merkaptoetanol dan SDS tidak mampu untuk mengurai struktur protein tersebut menjadi protein yang larut.

Untuk campuran masih belum nampak adanya marker protein babi hal ini mungkin terjadi karena konsentrasi protein daging babi dalam campuran terlalu kecil sehingga intensitas profil babi terlalu lemah.

Dari hasil TLC Scanner di dapat data bahwa pita protein pembeda pada daging babi mempunyai rata-rata Rf 0,0885; 0,1435; 0,296 dan 0,6825 dengan berat molekul berturut turut 54,71; 46,64; 29,96 dan 9,76 kD dan untuk daging sapi mempunyai rata-rata Rf 0,0965 dengan berat molekul 53,46 kD dan 0,827 dengan berat molekul 6,42 kD. Kecepatan migrasi protein selama elektroforesis berbanding terbalik dengan berat molekulnya., makin besar molekul makin lambat migrasinya (Stryer, 2000).

Pita protein pembeda hanya ditemukan pada daging yang masih mentah sedangkan daging yang sudah direbus belum ditemukan karena proteinnya sudah terdenaturasi.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

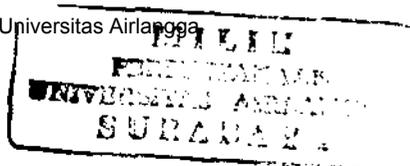
Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Analisis protein daging sapi, babi dan campurannya dapat dilakukan melalui teknik pemisahan elektroforesis SDS-PAGE pada daging mentah diperoleh komponen yang khas yang menjadi pita protein pembeda untuk identifikasi protein daging babi pada Rf 0,0885; 0,1435; 0,296 dan 0,6825 dengan berat molekul berturut turut 54,58; 46,54; 29,92 dan 9,76 kD.
2. Untuk daging sapi ditemukan komponen yang khas tidak ditemukan pada babi pada Rf rata-rata 0,0965 dengan berat molekul 53,33 kD dan 0,827 dengan berat molekul 6,43 kD.
3. Sampel daging yang sudah direbus tidak bisa langsung dianalisis melalui teknik pemisahan elektroforesis SDS-PAGE karena proteinnya sudah terdenaturasi sehingga kurang larut .

7.2 Saran

1. Penggunaan metode SDS-PAGE untuk analisis protein daging sapi, babi dan campurannya yang sudah direbus perlu dicari pelarut untuk melarutkan protein yang sudah terdenaturasi.

2. Untuk memperoleh pemisahan yang lebih spesifik perlu dicoba elektroforesis dua dimensi dengan arah vertikal berdasarkan titik isoelektrik dan dengan horizontal berdasarkan massa protein..
3. Metode yang digunakan pada penelitian ini belum bisa digunakan sebagai metode sederhana identifikasi adanya daging babi karena hanya bisa dipakai untuk daging mentah sedangkan daging yang sudah diolah perlu dicari pelarut untuk melarutkan protein yang sudah terdenaturasi.



DAFTAR PUSTAKA

- Bennion, M., 1980, **The Science of food**, New York, John Wiley & Sons, pp 371-379
- Bollag, DM , Rozycki, M.D. and Stuart,J. 1996. **Protein Methods** , 2nd Edition, New York, A John Willey and Sons.Inc.Publication, pp1-27, 27-57,83-107.
- Boyer, Rodney, F., 1993, **Modern Experimental Biochemistry**, 1993, pp 115-141.
- Branden, Carl and Tooze,John, 1991 , **Introduction to Protein Structure**, New York and London, Garland Publishing, Inc.pp 3-30.
- Carnegie, P.,R., Collins, M.C.and Ilic, M.Z., 1984, **Meat Science**, 10,145
- Clark, Jonh M., Jr and Switzer,Robert L, 1977, **Experiment Biochemistry**, San Francisco, W.H.Freeman and Company, pp 43-57, 67-81.
- DeCourcy, Kristi,2000, **Protein Electrophoresis Kit**, Virginia, Fralin Biotechnology Center, pp 4-30
- Francisco, W.H.Freeman and Company, pp 43-57, 67-81.
- Hames,B.,D. and Rickwood, D., 1990, **Gel Electrophoresis of Protein : A Practical Approach**, Second Edition, Oxford University Press, London, pp 1-16.
- Holme, DJ, and Peck, H, 1993, **Analytical Biochemistry**, Singapore,Longman Scientific and Technical. 399-421
- Jurnal L.P. POM –MUI Halal, **Memahami Komposisi Makanan** N0 35 Desember 2000 hlm 10-11
- Lawrie,R.A, 1995, **Ilmu Daging**, edisi ke 5, penerjemah Aminuddin Prakkasi, Jakarta, UI, hlm 1-7, 34-53, 63-69.
- Lehninger, L.A., 1994, **Principles of Biochemistry**, jilid 3 , terjemahan oleh Maggy Tenawijaya, Jakarta.,Erlangga.
- Martin, R, Wardale, R.J., Jones, S.J., Hernandez, P.E., 1991, **Monoclonal Antibody Sandwich Elisa for the Potential Detection Of Chicken Meat in Mixture of Raw Beef and Pork**, **Meat Science**, 30, 1, pp 23-31
- Parker, T.J., Haswell, W.A., 1978., **Textbook of Zoology**, Vol II, 7 th Edition, England.,The Macmillan Press LTD London and Basingstoke.

Payne,W.J.A., Williamson,G.,1993, **Pengantar Peternakan Di Daerah Tropis** , Penerjemah Darmadja, Djiwa, edisi ke 3, Yogyakarta, Gajah Mada University Press, hlm 241-307,684-696.

Peraturan Pemerintah RI NO 69 Tahun 1999 Tentang Label dan Iklan Halal

Philipp, H., Wolf, C., Rentsch, J. 1999, PCR-RFLP Analysis Of Mitochondrial DNA: A Reliable Methode for Species Identification, J. Agric. Food Chem., 47, 1350-1355.

Pomeranz,Y, and Meloan, C.E,1987, **Food Analysis Theory and Practice**, New York, Published by Van Nostrand Reinhold Company, pp 753-761

Sinell, H.J. , Mentz, Kleer.,1991, **J. Semi Quantitative Determination of pork and Beef in meet Mixtures by Elisa**, Arch Lebensmittelhyg, 42, 2, pp 42-46

Scopes, R.K., 1982, **Protein Purification**, Springer-Verlag, New York, pp150-260.

Soewoto,H dkk.,2001, **Biokimia Eksperimen Laboratorium** , Jakarta, Widya Medika, hlm 13-45.

Stryer,L, 2000, **Biokimia Vol. I**, penerjemah Bagian Biokimia FKUI, Jakarta , Penerbit Buku Kedokteran EGC, hlm 18-42,45-68,418-434,876-889.

Sudarmadji, S,1996, **Teknik Analisis Biokimia**, Yogyakarta, Liberty,hlm184-222.

Walker, JM,1996, **The Protein Protocols Handbook** , Humana Press, Totowa, Newjersey

Winarno,F.G.,1991, **Kimia Pangan Dan Gizi**, edisi ke 5, Jakarta, PT. Gramedia Pustaka Utama , hlm 50 – 80.

Lampiran 1

Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya untuk sampel Sp4

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	91.4	189.281	U	0.0
2	101.4	64225.14	U	6.2
3	105.9	5485.87	U	0.5
4	108.6	44188.36	U	4.3
5	112.0	31251.44	U	3.0
6	114.7	48543.36	U	4.7
7	120.6	235744.4	U	23.1
8	125.9	35174.82	U	3.4
9	128.5	94158.3	U	9.2
10	133.9	116182.5	U	11.3
11	142.3	174579.1	U	17.1
12	151.5	112537.4	U	11.0
13	156.7	24405.06	U	2.3
14	160.0	32862.10	U	3.2
TOTAL		1010850.4		

Lampiran 2

Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya untuk sampel Sp3

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	101.6	60836.63	U	6.2
2	107.5	42938.56	U	4.4
3	111.1	53473.93	U	5.1
4	118.4	413661.6	U	42.4
5	125.1	43687.34	U	4.4
6	127.6	99456.9	U	10.2
7	130.6	64790.49	U	6.6
8	140.9	123208.6	U	12.6
9	151.5	72199.3	U	7.4
10	159.4	3561.684	U	0.3
TOTAL		974815.1		

Lampiran 3**Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya untuk sampel Bb1**

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	181.8	51869.22	U	11.3
2	184.6	13818.38	U	3.0
3	188.1	43573.77	U	9.6
4	111.8	33201.89	U	7.3
5	113.4	31751.86	U	7.0
6	115.8	36925.44	U	8.1
7	118.6	93442.4	U	20.7
8	122.6	25811.56	U	5.7
9	124.9	24517.93	U	5.4
10	127.3	20054.35	U	4.4
11	131.3	32959.88	U	7.3
12	135.7	7941.27	U	1.7
13	141.5	27464.11	U	6.0
14	158.4	7999.94	U	1.7
TOTAL		450478.3		

Lampiran 4**Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya untuk sampel Bb3**

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	91.1	996.173	U	0.1
2	181.1	188263.6	U	12.2
3	185.8	36552.83	U	4.4
4	186.7	11569.25	U	1.4
5	188.6	56535.68	U	6.9
6	111.1	62133.88	U	7.6
7	112.5	16761.62	U	2.0
8	115.4	184213.9	U	22.5
9	121.7	224781.9	U	27.5
10	126.9	57319.48	U	7.0
11	129.8	44891.13	U	5.4
12	133.7	14915.97	U	1.8
13	141.7	113.257	U	0.0
14	148.6	5599.34	U	0.6
TOTAL		816567.8		

Lampiran 5

Data TLC-Scanner posisi pita protein dan luas areanya dari *marker* standar

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	92.8	29.574	U	0.0
2	94.6	476.789	U	0.1
3	98.8	5143.33	U	1.7
4	101.3	1746.188	U	0.5
5	102.9	944.195	U	0.3
6	106.2	8987.99	U	3.0
7	113.7	39891.64	U	13.4
8	119.3	2254.543	U	0.7
9	125.5	70992.1	U	23.8
10	131.1	797.367	U	0.2
11	131.8	490.738	U	0.1
12	132.5	851.667	U	0.2
13	133.4	789.132	U	0.2
14	134.2	712.738	U	0.2
15	138.6	43560.38	U	14.6
16	143.2	1197.270	U	0.4
17	148.5	85234.3	U	28.6
18	158.6	33335.60	U	11.2
TOTAL		297386.6		

Lampiran 6

Cara Menghitung Rf dari TLC –Scanner

Jarak pita pita protein dari tepi atas gel pemisah dihitung dengan cara mengurangi 5 cm dari data posisi pita protein TLC-Scanner, yang merupakan jarak staking gel (aslinya 0,5 cm). Jarak pita-pita protein dari batas bawah gel pemisah dengan cara mengurangi data posisi maksimum dengan posisi pita protein hasil TLC, kemudian hasilnya dikurangi 5 cm .

Contoh pada sampel SP4

Posisi maksimum 163,3

Posisi pita 101,4

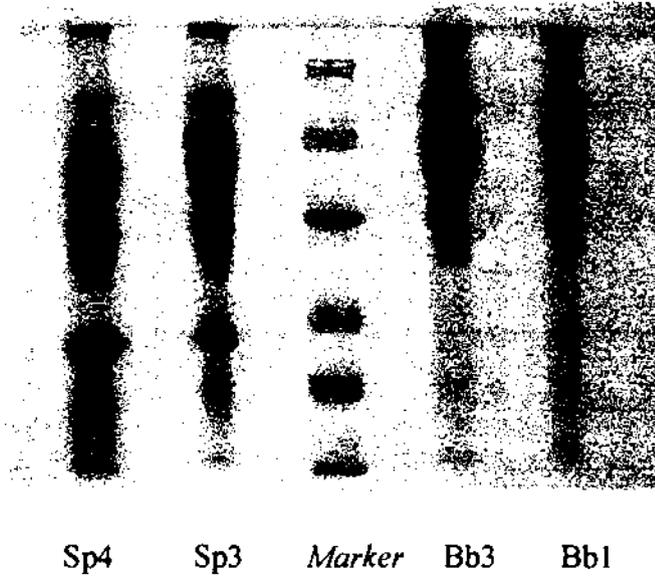
Jarak awal 90

$$Rf = \frac{(101,4-90)-5}{(163,3 - 90)-5} = \frac{6,4}{68,3} = 0,094$$

Lampiran 7

Cara menghitung Rf *marker* protein standar sbb

Dari gambar diperoleh data sebagai berikut :



Jarak *tracking dye* dari batas atas gel pemisah 5,9 cm

No	Berat Molekul	Hitungan Rf
1	3400	$5,875/5,9 = 0,996$
2	6500	$4,850/5,9 = 0,822$
3	14300	$3,9/5,9 = 0,661$
4	21500	$2,6/5,9 = 0,441$
5	30000	$1,525/5,9 = 0,258$
6	46000	$0,575/5,9 = 0,097$

Rf pita protein pembeda daging babi :

$$\text{Bb3 } 0,475/5,9 = 0,152$$

$$\text{Bb1 } 0,525/5,9 = 0,148$$