

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian isolasi dan profil protein pada daging babi dan sapi serta produk olahannya (bakso) dengan metode SDS-PAGE ini dilakukan dengan menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorik yang terdiri dari berapa tahapan yaitu: preparasi sampel, isolasi protein, analisis profil protein, serta analisis kadar protein.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Lantai 2 di Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk analisis kadar protein serta di Laboratorium Terpadu Radioputro Lantai 2, Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada (UGM), selama tiga bulan, terhitung pada bulan April – Juni 2018.

#### **C. Sampel**

Pada penelitian ini sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah protein dari daging babi (*Sus scrofa domesticus*) dan sapi (*Bos taurus*) berserta produk olahannya yaitu bakso yang dibuat sendiri dengan konsentrasi yang berbeda-beda (bakso referensi) dan yang di dapat dari pasaran (bakso komersil). Daging Babi dan Sapi di beli dari Pasar Kranggan di kota Yogyakarta, serta produk olahan daging babi dan sapi, yaitu bakso (bakso komersil) di beli dari beberapa tempat makan di sekitar Universitas

Muhammadiyah Yogyakarta. Untuk sampel daging babi dan sapi dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu:

1. Kelompok sebagai sampel protein pada daging segar.
2. Kelompok sebagai bahan pencampuran dalam pembuatan bakso.

## **D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

### **1. Variabel Penelitian**

#### **1.1 Variabel Terikat**

Profil protein daging babi dan sapi.

#### **1.2 Variabel Bebas**

Daging babi dan sapi serta produk olahannya.

### **2. Definisi Operasional**

- a. Isolasi pada penelitian ini adalah proses pemisahan senyawa protein dengan senyawa lain yang tidak ingin dianalisis.
- b. Daging adalah sampel yang digunakan pada penelitian ini dengan diisolasi proteinnya. Daging yang digunakan pada penelitian ini adalah daging babi dan sapi. Daging yang akan dianalisa tersebut masing-masing dibagi menjadi tiga kelompok yaitu, daging segar, bakso referensi dan bakso komersil.
- c. Profil protein adalah hasil karakteristik protein dari metode SDS-PAGE, masing-masing daging tersebut akan menghasilkan berupa pita-pita yang berbeda.
- d. SDS-PAGE adalah metode yang dipakai pada penelitian ini, untuk menganalisis profil protein masing-masing daging.

## E. Instrumen Penelitian

### 1. Alat

Blender, pisau, timbangan, mikropipet, tabung eppendorf, tabung reaksi, tabung sentrifuge, sentrifuge dingin, sentrifuge, vortex. Seperangkat alat Elektroforesis SDS-PAGE (*Bio-Rad*), *Spectrophotometer UV-Vis*, kuvet, *Yellow tip*, *Blue tip*.

### 2. Bahan

Daging sapi segar serta olahannya (bakso) Daging babi segar serta olahannya (bakso); *Normal Saline*; *Extraction Reagent (EzWay Mammal Tissue Protein)*; PMSF (*Phenyl Sulfony Fluoride*); SDS 10% <sup>w/v</sup> (*Sodium Dodecyl Sulfate*); Larutan *Acrylamide/Bis* (30%T; 2,6%C); APS 10% (*Amonium Peroksida Sulfate*); TEMED (*N,N,N'N'-Tetramethylenediamine*); *Staining protein Coomasie brilliant blue* 0,1% (<sup>w/v</sup>); *Sample Buffer* (Tris HCl 150mM PH 6,8 SDS 6,25%,  $\beta$ -*merkapttoetanol*, gliserol 70% dan *Bromophenol Blue* 2,5mM); *Separating Buffer* (Tris HCl 1,5M PH 8,8 Bio-Rad, Larutan *Acrylamide/Bis* (30%T; 2,6%C), SDS 10% <sup>w/v</sup>, Aquadest Steril, APS, TEMED); *Stacking Buffer* (Tris HCl 0,5M PH 6,8 Bio-Rad, Larutan *Acrylamide/Bis* (30%T; 2,6%C), SDS 10% <sup>w/v</sup>, Aquades Steril, APS, TEMED); Reagen *Biuret*; Isobutanol; *Destaining Solution*; Larutan Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA).

## F. Cara Kerja

### 1. Persiapan

Semua alat yang akan digunakan pada penelitian ini, disterilisasi terlebih dahulu. Disterilisasi dengan metode panas basah dalam autoklav pada suhu 121 °C selama 20 menit.

### 2. Pembuatan bakso daging:

- a. Penggilingan daging setengah halus dengan *meat grinder*/ blender.
- b. Daging giling dengan konsentrasi yang berbeda-beda ditambah dengan 10% tepung tapioka, bawang putih, dan garam.

**Tabel 2.** Komposisi Bakso.

Sampel	Konsentrasi	Daging Sapi	Daging Babi	Bahan lainnya
DS	100% DS	25	-	-
DB	100% DB	-	25	-
1	BS 5% DB	21,375	1,125	2,5
2	BS 10% DB	20,25	2,25	2,5
3	BS 25% DB	16,875	5,625	2,5
4	BS 50% DB	11,25	11,25	2,5
5	BS 75% DB	5,625	16,875	2,5
6	BB 100%	-	22,5	2,5
7	BS 100%	22,5	-	2,5

Dalam satuan gram (g)

- c. Homogenisasi daging giling dengan menggunakan blender.
- d. Adonan dicetak bulat-bulat kemudian direbus pada air mendidih selama 25 menit.

### 3. Isolasi Protein

Masing-masing sampel (daging segar maupun olahan) babi dan sapi ditimbang 30 mg dihaluskan dan dicuci dengan larutan *normal saline*. Kemudian tambahkan reagen ekstraksi 300 µl, lalu di

homogenkan dengan vortex. Setelah itu tambahkan PMSF 2  $\mu$ l, homogenkan. Sentrifuge dingin sampel dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk disimpan dalam tabung eppendorf pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Biotech, 2017).

#### 4. Penentuan Kadar Protein Bakso (Rahmawati, 2011)

##### a. Pembuatan Kurva Baku

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

##### b. Preparasi Sampel

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

##### c. Pengukuran Absorbansi Sampel

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

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

## 5. Preparasi Reagen SDS-PAGE

### a. Larutan Akrilamid 30%

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

### b. SDS 10%

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

### c. 1,5 M Tris-HCl PH 8,8

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

### d. 0,5 M Tris-HCl PH 6,8

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

### e. *Loading Sample*

0,5 M Tris-HCl PH 6,8 sebanyak 0,5 ml ditambahkan SDS 10% 2 ml, lalu ditambahkan gliserol 1 ml,  $\beta$ -merkapttoetanol sebanyak 1,25

ml dan *bromophenol blue* 1% sebanyak 250  $\mu$ , kemudian aquabides hingga volume total 5 ml.

f. APS 10%

100 mg *Ammonium Persulfat* dilarutkan dalam 1 ml aquabides

g. *Staining Solution* (Larutan Pewarna)

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

h. *Destaining Solution* (Larutan Pencuci)

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

## 6. Preparasi Gel SDS-PAGE

- a. Kaca (*glass plate* dan *spacer*) untuk pencetak gel dibersihkan dengan etanol, dikeringkan. Kemudian pasang pada alatnya (*casting slot*).
- b. Pembuatan gel poliakrilamid 10% dengan menyiapkan larutan untuk *separating gel* (pemisah) dan *stacking gel* (penumpuk). Berikut ini komposisi pemisah dan penumpuk.

**Tabel 3.** Komposisi Gel Elektroforesis.

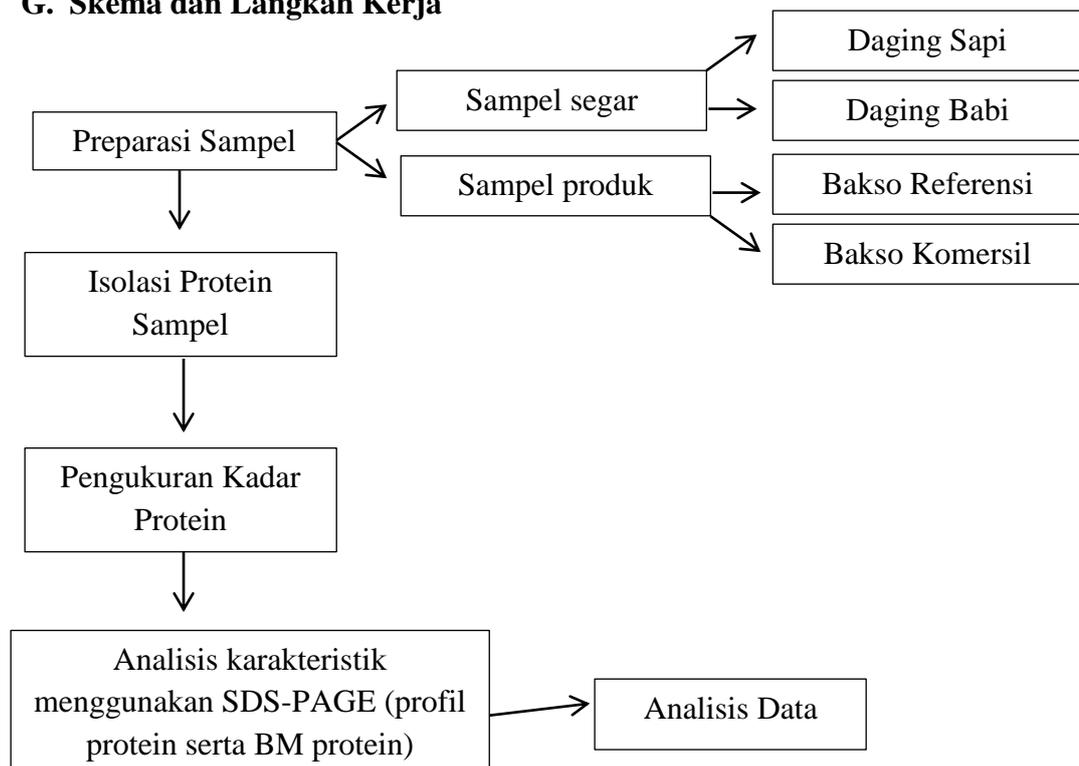
No	Bahan	<i>Separating gel</i>	<i>Stacking gel</i>
1	Akrilamid 30%	5 ml	1,7 ml
2	1,5 M Tris-HCl PH 8,8	3,8 ml	-
3	0,5 M Tris-HCl PH 6,8	-	1,25 ml
4	Aquadest Steril	5,9 ml	6,8 ml
5	SDS 10%	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l
6	<i>Ammonium Persulfat</i> 10%	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l
7	TEMED	6 $\mu$ l	10 $\mu$ l

- c. Tuangkan pemisah pada cetakan, jika terdapat gelembung teteskan isobutanol untuk menghilangkannya. Biarkan gel berpolimerasi.
- d. Bersihkan isobutanol, tuangkan penumpuk, sisipkan sisir, tunggu gel berpolimerasi.

## 7. Analisis Karakteristik dengan SDS-PAGE

Profil protein dikarakteristikan dengan SDS-PAGE (Hames, 1998). Sampel protein didenaturasi dengan *Sample Buffer* (Tris HCl 150mM PH 6,8 SDS 6,25%,  $\beta$ -merkaptoetanol, gliserol 70% dan *Bromophenol Blue* 2,5mM) dan dididihkan selama 1-2 menit. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 80 volt pada *Stacking Gel* dan 140 volt pada *Separating Gel*. Untuk *Staining* protein digunakan *Coomasie brilliant blue* 0,1% ( $^{w/v}$ ). Setelah itu dilakukan analisa berat molekul antara pita sampel dan marker dalam satuan KDa.

### G. Skema dan Langkah Kerja



## H. Analisis Data

Analisis data pada pita protein yaitu dengan cara membandingkan berat molekul pita protein, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis secara kualitatif yaitu dengan cara membandingkan posisi pita protein sampel dengan protein pita kontrol untuk mendapatkan berat molekul protein sample. Selain hal tersebut dibandingkan juga ada atau tidaknya perbedaan ketebalan antar pita. Analisis secara kuantitatif yaitu menganalisis berat molekul protein dengan melakukan pengukuran nilai mobilitas relatif atau fakto retensi (RF) (Shourie *et al.*, 2015). Nilai RF dapat diperoleh dengan cara membagi jarak pita protein dari titik awal migrasi dengan jarak migrasi *loading dye*. Berikut ini rumus yang dipakai:

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

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