

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN & PEMBAHASAN

#### A. Analisis Berat Molekul Pita Protein

Protein terbentuk dari susunan asam amino yang terhubungkan oleh ikatan *peptide*. Ikatan *peptide* dibentuk dari asam amino yang saling berikatan dengan asam amino yang lain. Atom H yang terdapat pada gugus amina akan berikatan dengan atom OH yang terdapat pada gugus hidroksil menghasilkan air (Mustollah, 2016).

Enzim pepsin yang berfungsi sebagai biokatalisator akan mengkatalis pemotongan ikatan peptide tersebut. Enzim pepsin akan mengubah serta memecah molekul protein menjadi ikatan peptide yang lebih kecil dengan cara memutuskan ikatan peptide yang terdapat pada sisi  $\text{NH}_2$  bebas dari asam amino aromatik (fenilalanin, triptofan serta tirosin), hidrofobik (isoleusin, leusin serta metionin) dan dikarboksilat (*aspartate dan glutamate*). Tujuan kondisi lingkungan kerja enzim dibuat sedemikian untuk mendapatkan kinerja yang optimal dari enzim tersebut.

Analisa profil protein dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Duodecyl Sulphate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*). Metode ini memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya (BM). Metode elektroforesis tidak bersifat sensitif terhadap perbedaan berat molekul maupun muatan yang cukup kecil dan tidak mempengaruhi struktur biopolimer (Hemes, 1998). Medium yang mengandung medan listrik akan menggerakkan protein bermuatan, hal tersebut diakibatkan perbedaan polaritas.

Mobilitas molekul protein dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, ukuran molekul, bentuk molekul, konsentrasi gel, dan voltase elektroforesis yang digunakan dalam gel.

Elektroforesis diatur dengan kekuatan 80 volt pada *Stacking Gel* dan 140 volt pada *Separating Gel*. Pengaturan ini dapat dimodifikasi sesuai dengan kebutuhan. Pengaturan voltase tersebut dipilih dikarenakan memberikan hasil yang lebih baik dari pengaturan voltase yang sebelumnya. Sumber arus listrik yang stabil sangat diperlukan untuk menghasilkan aliran listrik dengan voltase yang baik dan konstan. Keuntungan elektroforesis dengan voltase yang tinggi adalah terjadinya pemisahan yang cepat (Bintang, 2010).

Hasil yang didapatkan setelah marker dan sampel dielektroforesis adalah berupa gel, dimana gel tersebut akan dilakukan pewarnaan terlebih dahulu dengan *Coomasie Brilliant Blue* 0,1%. Setelah didapatkan hasil berupa pita, kemudian pita-pita tersebut diukur panjang *tracking* pita dari atas hingga bawah, jarak *tracking* tiap *band* dari atas sampai tiap pita-pita yang terdeteksi. Hasil dari pita-pita tersebut dihitung dengan rumus persamaan regresi linear untuk mengetahui berat molekul masing-masing pita.

Pada penelitian ini terdiri dari 1 marker (*Dual Colors Standards*), DS (Daging Sapi), DB (Daging Babi), 7 sampel Bakso Referensi, serta 5 sampel Bakso Komersial yang dibagi menjadi 2 gel yang berbeda. Urutan memasukan ke dalam kolom atau sumuran gel adalah sebagai berikut:

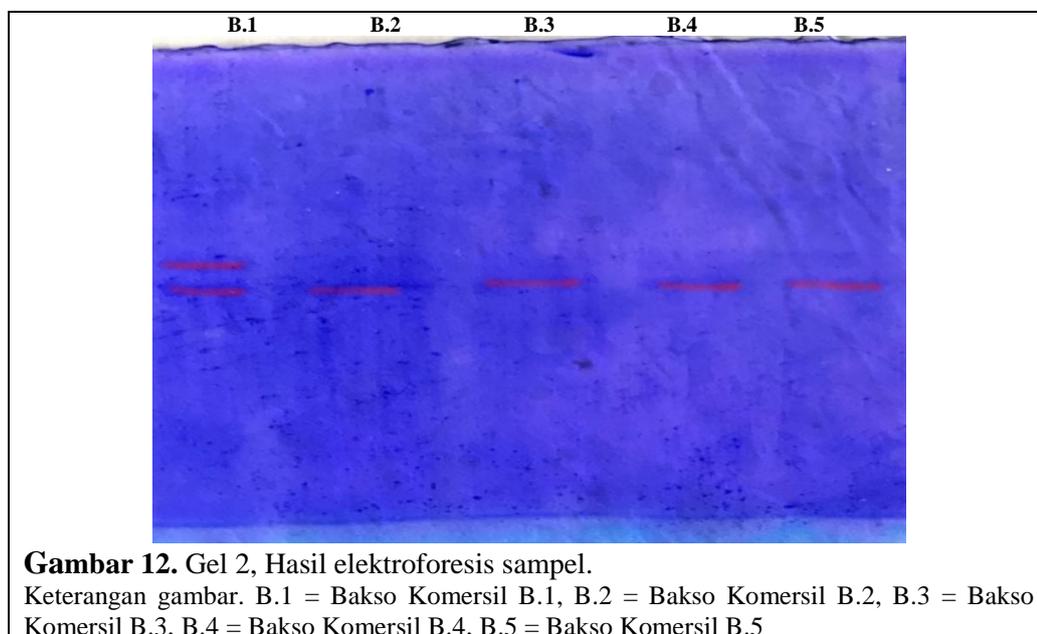
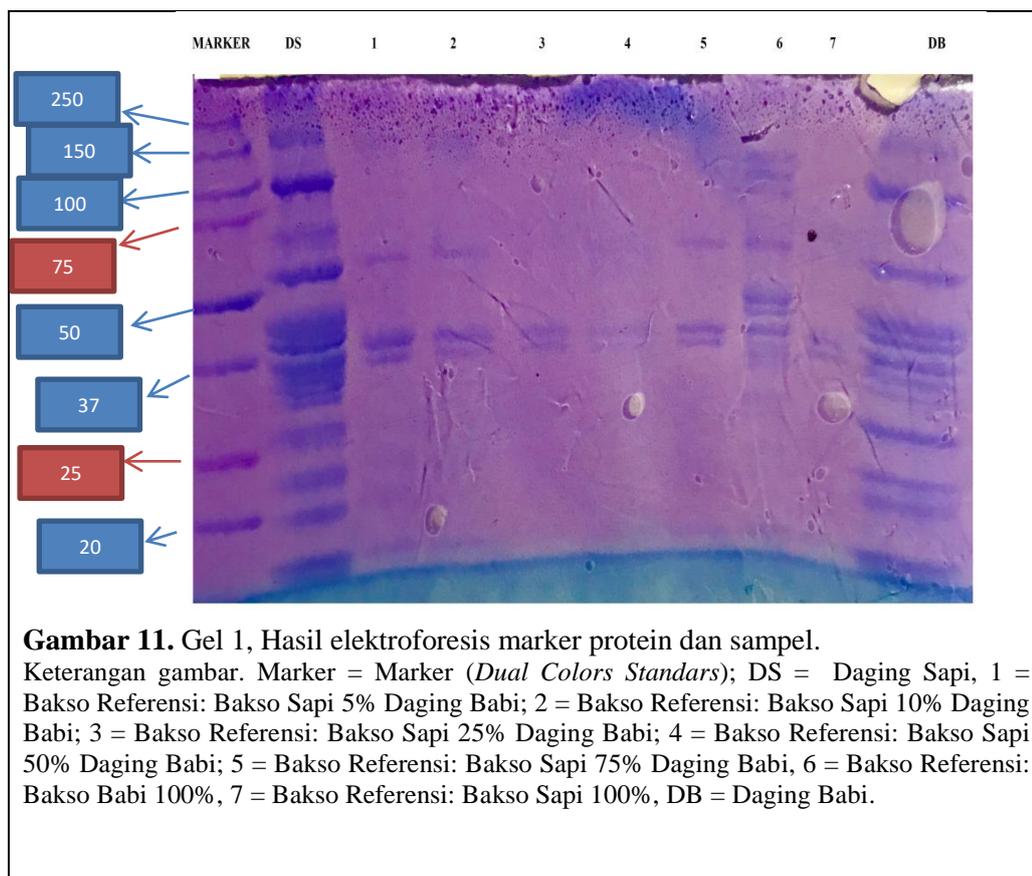
**Tabel 4. Gel 1**

No	Sumuran	Keterangan
1.	Sumuran 1	Marker ( <i>Dual Colors Standars</i> )
2.	Sumuran 2	Daging Sapi
3.	Sumuran 3	Bakso Referensi: Bakso Sapi 5% Daging Babi
4.	Sumuran 4	Bakso Referensi: Bakso Sapi 10% Daging Babi
5.	Sumuran 5	Bakso Referensi: Bakso Sapi 25% Daging Babi
6.	Sumuran 6	Bakso Referensi: Bakso Sapi 50% Daging Babi
7.	Sumuran 7	Bakso Referensi: Bakso Babi 75% Daging Sapi
8.	Sumuran 8	Bakso Referensi: Bakso Babi 100%
9.	Sumuran 9	Bakso Referensi: Bakso Sapi 100%
10.	Sumuran 10	Daging Babi

**Tabel 5. Gel 2**

No	Sumuran	Keterangan
1.	Sumuran 1	Bakso Komersil: B.1
2.	Sumuran 2	Bakso Komersil: B.2
3.	Sumuran 3	Bakso Komersil: B.3
4.	Sumuran 4	Bakso Komersil: B.4
5.	Sumuran 5	Bakso Komersil: B.5

Dari hasil penelitian tersebut, diperoleh pita-pita dari masing-masing marker dan sampel. Pita-pita tersebut akan dianalisis untuk menentukan nilai faktor retensi (Rf) dan berat molekulnya (BM). Penentuan nilai Rf didapatkan dari membagi jarak pita protein dari titik awal migrasi dengan jarak migrasi *loading dye* (jarak dari atas sampai bawah garis elektroforesis). Pada marker protein terdapat 8 pita dengan berat molekul 250 KDa, 150 KDa, 100 KDa, 75 KDa, 50 KDa, 37 KDa, 25 KDa, dan 20 KDa. Hasil elektroforesis protein marker dan sampel pada gel 1 dan 2 dapat dilihat pada gambar berikut:



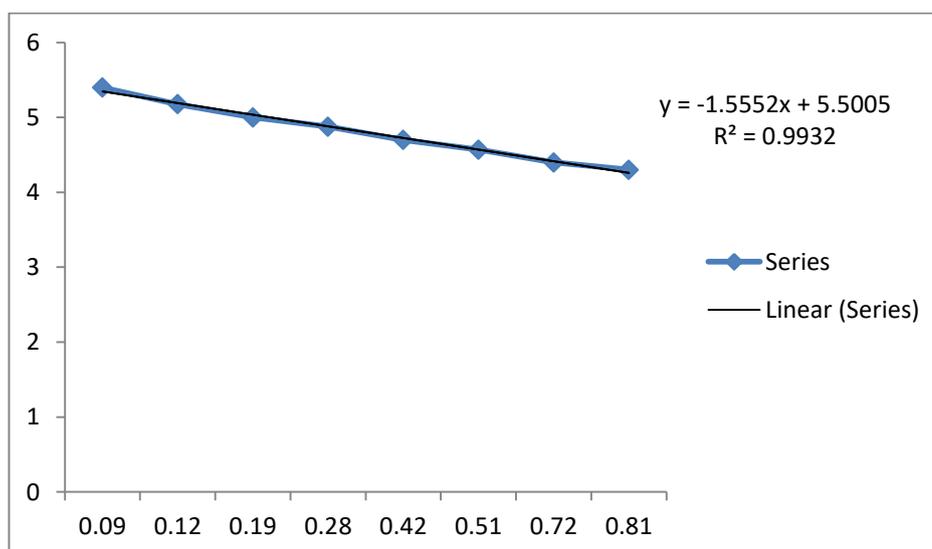
Analisa pita-pita protein diawali dengan perhitungan regresi linear dengan nilai Log BM sebagai sumbu Y dan nilai Rf sebagai sumbu X.

**Tabel 6.** Nilai Log BM dan Rf Marker Protein (*Dual Colors Standards*)

No	BM	Log BM	Run (cm)	Band (cm)	Rf
1.	250000	5,39794	4,3	0,4	0,09302
2.	150000	5,176091	4,3	0,5	0,11627
3.	100000	5	4,3	0,8	0,18604
4.	75000	4,875061	4,3	1,2	0,27906
5.	50000	4,69897	4,3	1,8	0,41860
6.	37000	4,568202	4,3	2,2	0,51162
7.	25000	4,39794	4,3	3,1	0,72093
8.	20000	4,30103	4,3	3,5	0,81395

Keterangan : Satuan BM dalam Dalton (D)

Kemudian dibuat dalam kurva standar nilai Rf yang diperoleh terhadap nilai Log BM yang dapat dilihat pada gambar di bawah ini:

**Gambar 13.** Kurva Regresi Linear Standar Marker Protein (*Dual Colors Standards*)

Hasil regresi linear yang didapatkan, kemudian digunakan untuk menghitung bobot molekul pita-pita pada sampel serta standar sampel. Berdasarkan perhitungan diperoleh nilai  $a = -1,5552$ ,  $b = 5.5005$  dan  $r = 0.9932$ , maka rumus yang diperoleh adalah  $y = -1,5552x + 5,5005$ . Rumus tersebut dapat digunakan untuk menentukan nilai BM dari pita protein yang terbentuk.

**Tabel 7.** Berat Molekul Sampel pada Gel 1 dan 2 dalam satuan KDa.

No.	Berat Molekul (KDa)													
	DS	DB	1	2	3	4	5	6	7	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5
1.	245,1	229,0	102,3	102,3	54,9	54,9	102,3	177,8	50,1	63	57,5	57,5	57,5	57,5
2.	206,5	162,1	54,9	54,9	46,7	46,7	54,9	169,8	42,6	57,5	-	-	-	-
3.	159,9	97,7	46,7	46,7	-	-	46,7	158,4	-	-	-	-	-	-
4.	104,4	64,5	10,4	10,4	-	-	-	102,3	-	-	-	-	-	-
5.	88,1	60,2	-	-	-	-	-	60,2	-	-	-	-	-	-
6.	57,4	50,1	-	-	-	-	-	54,9	-	-	-	-	-	-
7.	52,7	46,7	-	-	-	-	-	46,7	-	-	-	-	-	-
8.	44,5	40,7	-	-	-	-	-	42,6	-	-	-	-	-	-
9.	40,9	30,9	-	-	-	-	-	37,1	-	-	-	-	-	-
10.	37,1	21,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	34,6	18,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.	24,5	13,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	19,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.	15,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.	10,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan gambar. DS = Daging Sapi; DB = Daging Babi; 1 = Bakso Referensi: Bakso Sapi 5% Daging Babi; 2 = Bakso Referensi: Bakso Sapi 10% Daging Babi; 3 = Bakso Referensi: Bakso Sapi 25% Daging Babi; 4 = Bakso Referensi: Bakso Sapi 50% Daging Babi; 5 = Bakso Referensi: Bakso Sapi 75% Daging Babi; 6 = Bakso Referensi: Bakso Babi 100%, 7 = Bakso Referensi: Bakso Sapi 100%; B.1 = Bakso Komersil 1; B.2 = Bakso Komersil 2; B.3 = Bakso Komersil 3; B.4 = Bakso Komersil 4; B.5 = Bakso Komersil 5.

Dari hasil berat molekul pada tabel 7, dapat kita ketahui terdapat beberapa pita yang menjadi pembeda antara daging sapi segar dan daging babi segar yaitu pada pita 104,4 KDa dan 44,5 KDa yang hanya terdapat pada daging sapi, sedangkan yang hanya terdapat pada daging babi yaitu 64,5 KDa. Pada sampel bakso referensi di gel 1 tidak memperlihatkan hasil yang sangat berbeda antara bakso sapi, babi dan campuran dikarenakan protein yang digunakan sudah rusak terdenaturasi oleh pemanasan saat pembuatan tetapi, pada bakso komersial di gel 2 yang mana perusahaan tersebut menyatakan bahwa bakso yang mereka produksi adalah bakso daging sapi, terdapat pita yang hanya dimiliki oleh daging babi pada sampel bakso komersial B.I dengan berat molekul 63 KDa (*unknown protein*).

## B. Analisis Profil Protein

Penelitian bertujuan untuk mengetahui perbedaan profil protein antara daging babi dan sapi serta produk olahannya yaitu bakso. Penelitian ini sudah pernah dilakukan oleh Edy Susanto pada tahun 2010, tetapi penelitian ini memiliki perbedaan dengan penelitian sebelumnya yaitu pada penelitian sebelumnya hanya melakukan metode SDS-PAGE daging tepatnya pada bagian daging *Longissimus dorsi* dan pada bakso referensi memiliki konsentrasi yang berbeda pada penelitian kali ini, terdapat juga perbedaan dengan penelitian ini yaitu pada penelitian ini menambah sampel bakso komersil yang di jual di pasaran sekitar Yogyakarta.

Perbedaan pola protein yang dapat kita lihat pada gambar 7 dan gambar 8 menyatakan bahwa pada sampel daging segar banyak pita protein yang terlihat dan cukup jelas. Sedangkan pada produk olahan daging yaitu bakso, lebih sedikit pita protein yang terlihat. Hal tersebut dikarenakan pada proses pembuatan bakso, sebagian myofibril hilang akibat proses pemanasan serta penghancuran daging (Susanto, 2010). Hasil pita yang di dapat pada daging sapi segar sebanyak 16 pita, daging babi segar sebanyak 12 pita, sampel 1 sebanyak 4 pita, sampel 2 sebanyak 4 pita, sampel 3 sebanyak 2 pita, sampel 4 sebanyak 2 pita, sampel 5 sebanyak 3 pita, sampel 6 sebanyak 9 pita, sampel 7 sebanyak 2 pita, sampel B.1 sebanyak 2 pita, sampel B.2 sebanyak 1 pita, sampel B.3 sebanyak 1 pita, sampel B.4 sebanyak 1 pita, dan sampel B.5 sebanyak 1 pita. Berdasarkan pita yang telah dianalisis sehingga mendapatkan berat molekul pada tabel 7 maka dapat kita ketahui perkiraan

fraksi protein yang terkandung dalam sampel. Berikut ini standar fraksi standar protein yang terdapat dalam daging menurut Price dan Schweigert (1987):

**Tabel 8.** Fraksi Standar Protein (Price dan Schweigert, 1987)

No.	Protein	BM (KDa)	Range ≤ 10 % (KDa)
Miofibril			
1.	Miosin	200	180-220
2.	Aktin	42	37,8-46,2
3.	Tropomiosin	33	29,7-36,3
4.	Troponin C	18	16,2-19,8
5.	Troponin I	23	20,7-25,3
6.	Troponin T	38	34,2-41,8
Aktinin			
7.	$\alpha$ aktinin	95	85,5-103,5
8.	$\beta$ aktinin	37	33,3-40,7
9.	$\gamma$ aktinin	35	31,5-38,5
10.	Eu aktinin	42	37,8-46,2
Yang lain			
11.	Desmin	55	49,5-60,5
12.	Miosin Cleaving Enzim (LC <sub>1</sub> )	26-27	26-27

Berikut ini perkiraan fraksi protein pada sampel gel 1 dan gel 2:

**Tabel 9.** Fraksi Protein pada Sampel Gel 1.

No.	Protein	BM (KDa)	Range ≤ 10 % (KDa)	Sampel								
				DS	DB	1	2	3	4	5	6	7
Miofibril												
1.	Miosin	200	180-220	x	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	Aktin	42	37,8-46,2	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3.	Tropomiosin	33	29,7-36,3	x	x	-	-	-	-	-	-	-
4.	Troponin C	18	16,2-19,8	x	x	-	-	-	-	-	-	-
5.	Troponin I	23	20,7-25,3	x	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	Troponin T	38	34,2-41,8	x	x	-	-	-	-	-	-	-
Aktinin												
7.	$\alpha$ aktinin	95	85,5-103,5	-	x	x	x	-	-	x	x	-
8.	$\beta$ aktinin	37	33,3-40,7	x	x	-	-	-	-	-	x	-
9.	$\gamma$ aktinin	35	31,5-38,5	x	x	-	-	-	-	-	-	-
10.	Eu aktinin	42	37,8-46,2	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Yang lain												
11.	Desmin	55	49,5-60,5	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12.	Miosin Cleaving Enzim (LC <sub>1</sub> )	26-27	26-27	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: x = terdeteksi dan - = tidak terdeteksi

**Tabel 10.** Fraksi Protein pada Sampel Gel 2.

No.	Protein	BM (KDa)	Range $\leq$ 10 % (KDa)	Sampel				
				B.1	B.2	B.3	B.4	B.5
Miofibril								
1.	Miosin	200	180-220	-	-	-	-	-
2.	Aktin	42	37,8-46,2	-	-	-	-	-
3.	Tropomiosin	33	29,7-36,3	-	-	-	-	-
4.	Troponin C	18	16,2-19,8	-	-	-	-	-
5.	Troponin I	23	20,7-25,3	-	-	-	-	-
6.	Troponin T	38	34,2-41,8	-	-	-	-	-
Aktinin								
7.	$\alpha$ aktinin	95	85,5-103,5	-	-	-	-	-
8.	$\beta$ aktinin	37	33,3-40,7	-	-	-	-	-
9.	$\gamma$ aktinin	35	31,5-38,5	-	-	-	-	-
10.	Eu aktinin	42	37,8-46,2	-	-	-	-	-
Yang lain								
11.	Desmin	55	49,5-60,5	x	x	x	x	x
12.	Miosin Cleaving Enzim (LC <sub>1</sub> )	26-27	26-27	-	-	-	-	-

Keterangan: x = terdeteksi dan - = tidak terdeteksi

Dari tabel 9 dan tabel 10 dapat dilihat perbedaan antara daging sapi dan daging babi, pada daging sapi terdapat troponin I dengan BM 24,5 KDa yang tidak terdapat pada daging babi, sedangkan pada daging babi terdapat hasil yang sama seperti penelitian sebelumnya bahwa pada daging babi terdeteksi pita  $\alpha$  aktinin dengan BM 97,7 KDa (Susanto, 2010). Pada sampel bakso referensi 1, 2, 5, dan 6 yang mana pada bakso tersebut terdapat daging babi masih terdeteksi pita pita  $\alpha$  aktinin, tetapi pada sampel 3 dan 4 yang mana bakso tersebut masih terdapat campuran daging babi tidak terdeteksi pita  $\alpha$  aktinin. Hal tersebut bisa dikarenakan preparasi sampel yang kurang maksimal dan saat pembuatan bakso, protein mengalami denaturasi protein saat pemanasan. Tingkat pemanasan dapat berpengaruh terhadap protein. Protein  $\alpha$  aktinin bersifat lebih labil dan tidak larut pada kisaran 50 °C (Susilo,

2003; Susanto, 2010). Pada sampel bakso komersial, dari sampel B.1 sampai B.5 hanya terdeteksi desmin saja dengan berat molekul 57,5 KDa.

### C. Kadar Protein

Penentuan kadar protein dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode biuret dengan *spechtrophotometer UV-Vis* pada panjang gelombang 540 nm. Panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang yang paling optimal dalam pengukuran kadar protein. Berikut ini hasil pengukuran kadar protein.

**Tabel 11.** Hasil Pengukuran Kadar Protein

No	Sampel	Kadar Protein
1.	Daging Babi	1,501
2.	Daging Sapi	1,2719
3.	Bakso Sapi 5% Daging Babi (1)	0,3179
4.	Bakso Sapi 10% Daging Babi (2)	0,323
5.	Bakso Sapi 25% Daging Babi (3)	0,3415
6.	Bakso Sapi 50% Daging Babi (4)	0,3541
7.	Bakso Babi 75% Daging Sapi (5)	0,3718
8.	Bakso Babi 100% (6)	0,4868
9.	Bakso Sapi 100% (7)	0,3103
10.	Bakso (B.1)	1,0933
11.	Bakso (B.2)	0,6693
12.	Bakso (B.3)	0,5051
13.	Bakso (B.4)	0,2441
14.	Bakso (B.5)	0,211

Dari tabel diatas dapat dilihat hasil pengukuran kadar protein pada sampel bakso menunjukkan bahwa kadar protein yang paling besar yaitu pada sampel bakso babi 100% yaitu 0,4868. Kemudian kadar protein bakso yang paling kecil yaitu pada sampel bakso sapi 100 % yaitu 0,3103. Hasil tersebut menyatakan bahwa kadar protein pada daging babi lebih besar dari pada daging sapi. Selain itu penambahan daging babi pada sampel bakso sapi dapat

meningkatkan konsentrasi kadar protein pada bakso. Pada sampel bakso referensi dapat terlihat semakin tinggi konsentrasi daging babi, semakin tinggi pula kadar protein sampel yaitu sekitar 0,3179-0,3718, sedangkan pada bakso komersil kadar protein yang paling tinggi adalah 1,0933 pada sampel bakso B.I dan yang paling rendah adalah 0,211 pada bakso B.C. Kadar protein daging sapi 1,2719 dan kadar protein pada daging babi 1,501. Konsentrasi pada sampel daging lebih tinggi dari pada sampel bakso, dikarenakan sampel daging masih dalam bentuk segar dan belum mengalami proses pengolahan yang dapat menyebabkan denaturasi protein (Susanto, 2010).

Menurut hasil penelitian tersebut peningkatan kadar protein dengan penambahn konsentrasi daging babi menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Faktor yang dapat menjadi penyebab adalah adanya degradasi sampel oleh panas saat pemasakan, yaitu berkaitan dengan temperature yang tidak konstan.

Pada penelitian sebelumnya kadar protein pada sampel bakso merupakan kadar protein yang paling rendah dibandingkan produk olahan lainnya. Hal ini dikarenakan protein pada bakso mengalami perubahan yang signifikan. Penurunan kadar protein bakso mencapai 10% selama pembuatan. Penurunan ini dapat disebabkan oleh pemanasan serta penambahan bahan tambahan dalam proses pembuatan bakso (Riyanto, 2010). Penentuan kadar ini digunakan untuk mengukur kadar sampel yang akan dianalisis.

#### **D. Isolasi Protein**

Isolasi adalah pemisahan senyawa yang diinginkan dengan senyawa yang tidak diinginkan dalam analisa. Pada penelitian ini dilakukan isolasi protein terlebih dahulu, untuk memisahkan protein dengan senyawa-senyawa lain agar dapat dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE.

Sampel dicuci menggunakan larutan *normal saline* terlebih dahulu. *Normal saline* adalah larutan yang memiliki komposisi *Sodium* dan *Chloride*, larutan ini memiliki sifat garam atau netral (PH = 7) (Salam, 2016). *Normal saline* berfungsi untuk mengkondisikan sel atau jaringan yang ada di dalam sampel ke kondisi normal agar tidak adanya kerusakan. Setelah itu sampel diberi reagen ekstraksi (*EzWay Mammal Tissue Protein*) yang berfungsi memisahkan senyawa protein dengan senyawa yang tidak diinginkan (Biotech, 2017). Sampel yang sudah diberi reagen ekstraksi ditambahkan PMSF (*Phenyl Sulfony Fluoride*) yang berfungsi untuk pemurniaan protein (Nurhayati *et al.*, 2010). Hasil dari isolasi protein tersebut disimpan di suhu -20°C agar tidak terjadi kerusakan pada protein.