

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian ini termasuk kedalam eksperimental laboratorik. Dalam penelitian ini terdapat beberapa tahapan yaitu preparasi sampel, isolasi protein sampel daging dan produk olahannya serta analisis profil protein.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Juni sampai dengan Juli 2018 di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY), Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM Unit III dan di Pusat Laboratorium Biologi Kimia Radioputro Lantai 2, Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada (UGM).

C. Sampel

Sampel yang digunakan adalah protein dari daging sapi dan daging babi yang di beli dari Pasar X di kota Yogyakarta. Peneliti menggunakan produk olahan berupa sosis yang dibuat sendiri dengan bahan dasar dari daging sapi dan daging babi, serta pengambilan sampel sosis sapi (sosis komersil) yang ada di pasaran. Pada sampel dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :

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

3. Kelompok sebagai sampel sosis sapi dipasaran.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Penelitian

- 1.1 Variabel Terikat

Profil protein daging sapi dan daging babi.

- 1.2 Variabel Bebas

Metode SDS-PAGE.

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 di isolasi proteinnya agar dapat diketahui profil protein daging tersebut. Daging yang digunakan adalah daging babi dan daging sapi. Daging yang akan dianalisa masing-masing dibagi menjadi tiga kelompok yaitu, daging segar, produk olahan daging buatan sendiri dan produk olahan daging yang dibeli di pasaran.
 - c. Profil protein adalah hasil karakteristik protein dari metode SDS-PAGE, masing-masing daging tersebut akan menghasilkan berupa pita yang berbeda-beda.
 - d. SDS-PAGE adalah metode yang dipakai pada penelitian ini, untuk menganalisis profil protein masing-masing daging.

E. Instrumen Penelitian

a. Bahan

Daging sapi dan daging babi segar yang diperoleh dari Pasar Kranggan Yogyakarta. Bahan yang digunakan untuk isolasi protein adalah NaCl 0,09%; *phenylmethane sulfonyl fluoride* (PMSF). Bahan yang digunakan untuk pembuatan larutan pemisah dan penumpuk pada SDS-PAGE adalah *acrylamide* 30%; *bis-acrylamide* 0,8%; 0,5 M tris HCl pH 6,8 ; 1,5 M tris HCl pH 8,8 ; *aqua pro injection*, *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10%, *Ammonium Peroksida Sulfate* (APS) 10% dan *N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine* (TEMED) 100% merk BioRad. Bahan yang digunakan untuk *loading buffer* adalah SDS 10%, 1 M tris HCl pH 6,8 ; *glycerol*; β -*mercaptoethanol*; 1% *bromophenol blue* dan H₂O. Bahan yang digunakan untuk *running buffer* SDS-PAGE adalah tris; *glycine*; *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10%. Bahan yang digunakan untuk 5 ml dapar sampel adalah 0,5 M tris HCl pH 6,8 ; *glycerol* 70% (v/v), *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% (b/v); 2-merkaptanol dan biru bromfenol 1% (b/v). Bahan yang digunakan untuk 1 liter dapar elektroda adalah tris HCl 25 mM, glisin 250 mM pH 8,3 dan SDS 0,1%. Untuk larutan pewarna menggunakan *cromassie brilliant blue* R250 0,25%, metanol 50% (v/v), asam asetat glassal 10% (v/v), *aquadest* dan untuk larutan pencuci warna menggunakan gel methanol 30% (v/v), asam asetat glassal 10% (v/v) dan *aquadest*. Bahan yang digunakan untuk uji spektrofotometer UV-Vis adalah reagen *biuret* dan larutan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA).

b. Alat

Pisau, Autoklav (*Hiclave HVE-50 Hirayama*), tabung reaksi *Pyrex*, blender *Miyako*, *Micropipet (Bio-Rad)*, tabung eppendorf (*Biologix*), tabung *sentrifuge*, *sentrifuge* dingin, *Sentrifuge (Hettich Zentrifugen EBA-20)*, *Yellow tip (Biologix)*, *White Tip (Biologix)*, *Blue tip (Biologix)*, mortir, *Kuvet (quartz glass Hellma)*, stemper, gelas ukur, timbangan analitik (*Mettler Toledo*), *Vortex (Super Mixer Gemmy Industrial)*, sarung tangan *latex*, lemari asam (*Robust Chemical*), (*Shimadzu Uvmini-1240*) *Spectrophotometer* untuk penentuan kadar protein, Seperangkat Aparatus elektroforesis (*Mini-PROTEAN Tetra System BioRad*) untuk pemisahan dan karakteristik protein.

F. Cara Kerja**1. Persiapan**

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

2. Pembuatan Sosis Daging

- a. Daging sapi dipotong kecil kecil kemudian digiling setengah halus dengan *meat grinder* atau blender.
- b. Daging giling ditambah dengan konsentrasi yang berbeda kemudian ditambah dengan tepung tapioca 10%, bawang putih dan garam.

Tabel 3. Komposisi Sosis.

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

- c. Homogenisasi daging giling dengan menggunakan blender.
- d. Adonan dimasukkan kedalam selongsong (*casing*) sosis.
- e. Sosis diproses dengan metode pemanasan kukus (*steaming*) pada suhu 100°C masing-masing selama 30 menit. Kemudian sosis diangkat dan diangin-anginkan untuk pengujian selanjutnya (Olympias S. & Suryanto, 2016).

3. Isolasi Protein

Masing-masing sampel (daging segar maupun olahan) babi dan sapi ditimbang 30 mg kemudian dihaluskan dan dicuci dengan larutan *normal saline*. Setelah itu ditambahkan reagen ekstraksi 300 µl, dihomogenkan menggunakan *vortex*. Setelah homogen ditambahkan PMSF 2 µl, dihomogenkan. Kemudian sampel *disentrifuge* dingin pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil secara perlahan kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf baru dan disimpan pada suhu 2-5°C (KOMA BIOTECH).

4. Penentuan Kadar Protein Sosis (Nurhanifah, 2009)

a. Pembuatan Kurva Baku

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

b. Preparasi Sampel

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

c. Pengukuran Absorbansi Sampel

Supernatan diambil sebanyak 1 ml kedalam tabung reaksi, tambahkan 4 ml reagen *biuret* dan diamkan selama 40 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Hasil konsentrasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus persamaan garis linier.

5. Preparasi Reagen SDS-PAGE

a. Larutan *Acrylamide* 30%

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

b. SDS 10%

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

c. 1,5 M Tris – HCl PH 8,8

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

d. 0,5 M Tris – HCl PH 6,8

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

e. *Loading Sample*

0,5 M Tris – HCl PH 6,8 sebanyak 0,5 ml ditambahkan SDS 10% 2 ml, lalu ditambahkan gliserol 1 ml, *β-mecaptoerhanol* sebanyak 1,25 ml dan *bromophenol blue* 1% sebanyak 250 µl , kemudian aquabides hingga volume total 5 ml.

f. APS 10%

100 mg *Ammonium Peroxide sulfat* 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 4. Komposisi Gel Elektroforesis.

No	Bahan	<i>Separating gel</i>	<i>Stacking gel</i>
1	Akrilamid/Bis-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 μ l	100 μ l
6	Ammonium Persulfat 10%	150 μ l	100 μ l
7	TEMED	6 μ l	10 μ 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. Preparasi Sampel

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

8. Prosedur Elektroforesis

Profil protein dari sampel dikarakterisasi dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) yang dilakukan dengan metode standar (Hemes, 1998). *Sandwich plate* dilepaskan dari *casting slot*, kemudian dipasang ke *aparatus elektroforesis* dan dituangkan elektroforesis *buffer* pada bagian tengah

dan luar aparatus. Perlahan sampel dimasukkan kedalam sumuran. Dilakukan *running* protein pada 80 *volt*, hingga sampel mencapai akhir dari *stacking gel*. Kemudian tegangan listrik dinaikkan menjadi 140 *volt*, sampai sampel mencapai ujung *separating gel* (Hermanto, 2009). Diakhir proses sumber listrik dilepas dan gel diambil dari *plates*. *Stacking gel* bagian sumuran dipotong secara perlahan.

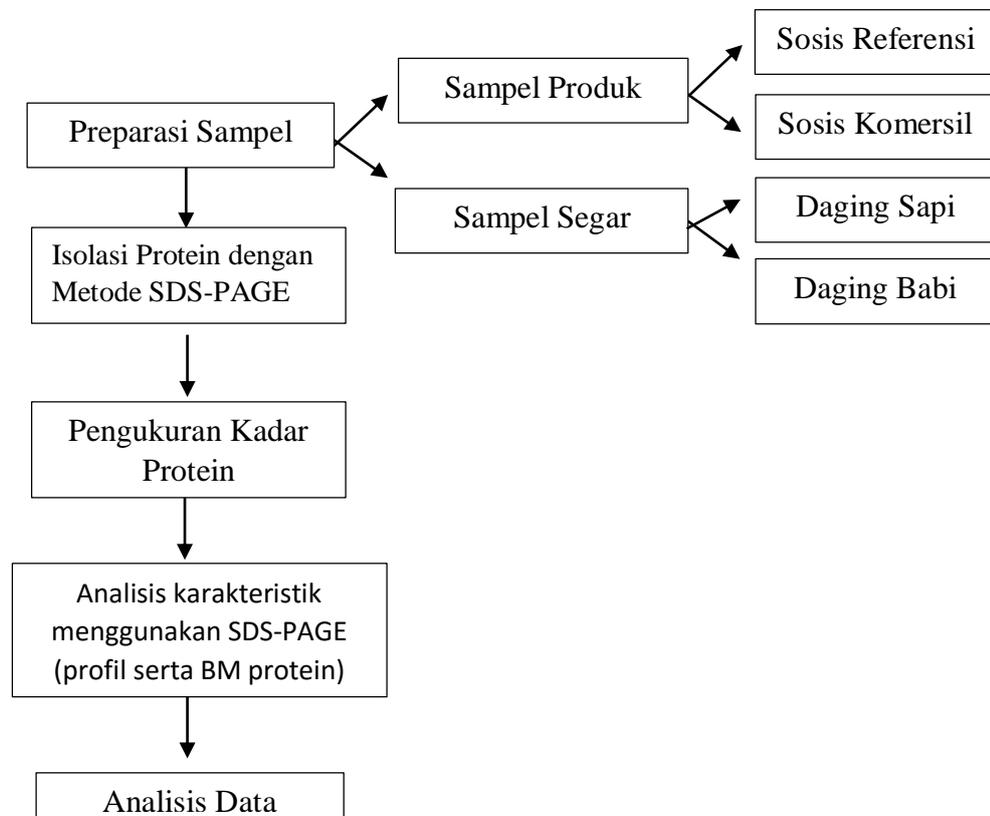
9. Proses Pewarnaan Gel

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

10. Analisis Bobot Molekul Protein hasil SDS-PAGE

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

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

Analisis data pada pita protein dengan cara membandingkan berat molekul pita protein, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis secara kualitatif yaitu dengan membandingkan posisi pita protein sampel dengan protein pita kontrol untuk mendapatkan berat molekul protein sample. Selain hal itu melakukan pembandingan ada atau tidaknya perbedaan ketebalan antar pita. Analisis secara kuantitatif yaitu menganalisis berat molekul protein dengan melakukan pengukuran nilai mobilitas *relative* atau *retension factor* (Rf) (Shourie dan Chopadgaonkar, 2015). Nilai Rf diperoleh dengan cara membagi jarak pita protein dari titik

awal migrasi dengan jarak migrasi *loading dye*. Berikut rumus yang digunakan:

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

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