

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium untuk mengetahui profil protein hasil isolasi pada sampel daging ayam segar, daging babi segar dan bakso referensi atau buatan sendiri dengan perbandingan komposisi penyusunnya. Profil protein yang didapat berupa pita spesifik dan berat molekul masing-masing sampel. Adapun metode analisis yang digunakan pada penelitian ini adalah elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).

B. Tempat dan Waktu

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Sleman, DI.Yogyakarta dan Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Bantul, DI.Yogyakarta. Kemudian waktu penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari sampai Mei 2018.

C. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daging ayam segar dan daging babi segar didapatkan dari pasar Pathuk Yogyakarta. Sampel selanjutnya adalah bakso referensi dari hasil buatan sendiri. Pembuatan bakso referensi dibagi dalam beberapa kelompok dengan perbedaan komposisi daging penyusunnya. Bakso referensi merupakan sampel bakso ayam yang mengandung daging babi. Dibuat dengan seri konsentrasi 0, 5, 10, 15, 25, 50,

dan 100% atas daging babi terhadap daging ayam. Sedangkan bahan baku pembuatan bakso juga berasal dari pasar Pathuk Yogyakarta.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel terikat

Profil protein hasil isolasi

2. Variabel bebas

Daging ayam segar, daging babi segar dan bakso referensi atau buatan sendiri dengan perbandingan komposisi penyusunnya.

E. Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan dan alat elektroforesis di Laboratorium Terpadu, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada. Kemudian bahan dan alat penentuan kadar protein di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Bahan-bahan yang digunakan adalah daging ayam segar, daging babi segar, tepung tapioka, garam, bawang putih, aquabides, *normal saline*, *Radioimmunoprecipitation assay* (RIPA buffer); *phenylmethane sulfonyl fluoride* (PMSF); *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% dalam aquades; *Bisakrilamide* 30% merk BioRad; Tris-HCl 3M pH 8,8; Tris-HCl 0,5M pH 6,8; *Ammonium peroxydisulfate* (APS) 10%; N,N,N',N'-*Tetramethylethylenediamine* (TEMED) 100% merk BioRad; 10x buffer elektroforesis pH 8,7 ; *loading sampel*; Isobutanol dalam aquades; aquades;

Coomasie brilliant blue; destaining solution; reagen biuret; larutan standar Bovine Serum Albumin (BSA).

Alat-alat yang digunakan meliputi autoklav *Hiclave HVE-50 Hirayama*, *beaker glass Pyrex*, penangas air *Memmert*, *blender Miyako*, *Sentrifuge Hettich Zentrifugen EBA-20*, *Pisau*, timbangan analitik *Mettler Toledo*, tabung eppendorf *Biologix*, *Vortex Super Mixer Gemmy Industrial*, tabung reaksi *Pyrex*, *Micropipet Bio-Rad*, *Blue tip Biologix*, *Yellow tip Biologix*, *White tip Biologix*, tabung *conical Biologix*, *Kuvet quartz glass Hellma*, *Shaker Dragonlab*, *Refrigerated Centrifuge Thermo Fisher* untuk isolasi protein dari jaringan hewan. *Aparatus elektroforesis Mini-PROTEAN Tetra System BioRad* untuk pemisahan dan karakterisasi protein. *Shimadzu UVmini-1240 Spectrophotometer* untuk penentuan kadar protein.

F. Cara Kerja

1. Persiapan

Semua alat yang akan digunakan selama proses disterilisasi terlebih dahulu. Bahan sekali pakai yang terbuat dari bahan plastik dan gelas disterilisasi dengan metode panas basah dalam autoklav pada suhu 121° C selama 20 menit.

2. Pembuatan Bakso Referensi

Pembuatan sampel bakso referensi dibuat dari daging ayam, campuran daging ayam dan babi, serta daging babi. Masing-masing sampel bakso terdiri dari 90% daging dan 10% bahan lainnya seperti tepung dan bumbu. Daging ayam dan daging babi segar dicuci bersih lalu ditiriskan. Daging

ayam, daging babi dan campuran keduanya masing-masing ditimbang, direbus, digepuk, dikecilkan ukurannya dan dicampur dengan bumbu kemudian dibuat bakso. Komposisi bakso terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi sampel bakso referensi

No	Sampel	Babi	Ayam	Tepung dan bumbu lain
1	Bakso ayam tanpa babi	0%	90%	10%
2	Bakso ayam dengan 5 % daging babi	5%	85%	10%
3	Bakso ayam dengan 10 % daging babi	10%	80%	10%
4	Bakso ayam dengan 15% daging babi	15%	75%	10%
5	Bakso ayam dengan 25 % daging babi	25%	65%	10%
6	Bakso ayam dengan 50 % daging babi	50%	40%	10%
7	Bakso ayam dengan 100 % daging babi	90%	0%	10%

3. Isolasi Protein dari Jaringan Daging dan Bakso

Masing-masing sampel daging dan bakso yang telah dibuat dicuci dalam larutan *normal saline*. Kemudian dihaluskan dan ditimbang sebanyak 30 mg sampel. Dimasukkan kedalam eppendorf lalu ditambahkan 300 μ l buffer RIPA dan 2 μ l PMSF. Selanjutnya dicampur dengan *vortex* selama 2 menit dan dilakukan sentrifugasi menggunakan *refrigerated centrifuge* 14.000 g selama 4 menit. Setelah itu diambil supernatan dan dimasukkan kedalam tabung eppendorf yang telah diberi label. Dapat disimpan dalam suhu -20°C (KOMA BIOTECH).

4. Penentuan Kadar Protein Bakso (Nurhanifah. 2009 *cit.* Rahmawati. 2011 dengan modifikasi)

a. Pembuatan kurva baku

Larutan standar yang digunakan adalah baku albumin atau *bovine serum 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 didiamkan selama 40 menit. Absorbansi diukur menggunakan *spectrophotometer UV-Vis* pada λ 540 nm. Hasil absorbansi larutan standar dan konsentrasi standar dibuat grafik untuk menentukan persamaan garis linier.

b. Preparasi sampel

Sampel yang akan diukur kadarnya adalah bakso referensi dengan perbedaan komponen penyusunnya. Sebanyak 2 gram sampel yang telah dihaluskan dilarutkan dalam 2 ml aquades. Campuran tersebut kemudian dilakukan sentrifugasi pada 250 rpm selama 10 menit sampai terpisah dan diambil supernatan.

c. Pengukuran absorbansi sampel

Larutan supernatan diambil sebanyak 600 μ l kedalam tabung reaksi ditambahkan 2,4 ml reagen *biuret*. Setelah tercampur didiamkan selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan *spectrophotometer UV-Vis* pada λ 540 nm. Konsentrasi protein dapat dihitung dengan memasukkan hasil absorbansi sampel pada rumus persamaan regresi linier.

5. Preparasi Reagen SDS-PAGE

a. SDS 10%

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

b. 3 M Tris-HCl; pH 8,8

3,36 g basa tris dilarutkan dalam 6 ml aquabides diaduk dengan hati-hati kemudian pH disesuaikan hingga 8,8 dengan penambahan 6 N HCl perlahan. Kemudian ditambahkan aquabides hingga 10 ml.

c. 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8

0,6 g basa tris dilarutkan dalam 6 ml aquabides dicampur dengan hati-hati kemudian pH disesuaikan hingga 6,8 dengan penambahan 6 N HCl. Kemudian ditambahkan aquabides hingga 10 ml. Larutan di simpan pada 4°C.

d. *Loading Sample*

0,5 M Tris-HCl pH 6,8 sebanyak 0,5 ml ditambah 2 ml 10% SDS ditambah 1 ml gliserol ditambah 1,25 ml *β-mecaptoethanol* dan 250 µl 1% *bromphenol blue* kemudian aquabides ditambahkan hingga volume total 5 ml.

e. 10x Buffer Elektroda

30,3 g basa tris; 144 g glisin; dan 10 g SDS dilarutkan dalam 100 ml aquabidest, larutan diaduk dan ditambahkan aquabides hingga volume total 1 L. Larutan disimpan pada 4°C dan dihangatkan hingga suhu ruangan sebelum digunakan.

f. 10% APS (disiapkan segar sebelum pemakaian)

100 mg *ammonium peroxydisulfate* dilarutkan dalam 1 ml aquabides.

g. *Staining solution* (Larutan pewarna)

0,1 gram *Coomasie brilliant blue* ditambah 45 ml *methanol* dan 10 ml asam asetat glasial, kemudian ditambahkan 45 ml 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. Pembuatan Gel

Persiapan cetakan gel *glass plate spacer* diambil dari wadah yang berisi etanol 70% dicuci dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu. *Glass plate* dan *spacer* dipasang dalam *casting slot*. Sebelum digunakan uji kebocoran dengan menuangkan aquades ke dalam *sandwich plate*.

Larutan pembentuk gel dibuat dengan konsentrasi 10%. Sesuai dengan target berat molekul yang akan dilihat. Komposisi larutan pembentuk gel terdapat pada Tabel 3.

Tabel 3. Formula gel elektroforesis (Sumber : Bio Rad)

Bahan	Separating gel 10% (ml)	Stacking gel 3% (ml)
Aquades	3.08	1.58
Akrilamid/Bis- akrilamid 30%	1.945	0.25
Tris-HCl 3 M pH 8,8	0.74	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	0.60
SDS 10%	0.06	0.025
APS 10%	0.02	0.02
TEMED	0.01	0.01

- a. *Stacking gel* sebagai gel tempat meletakkan sampel. Pembuatan *stacking gel* terdiri dari larutan stok akrilamid/bis-akrilamid 30%, SDS 10%, 0,5 M tris-HCl pH 6,8 ; *ammonium peroxydisulfate* (APS) 10%, dan TEMED.
- b. *Separating gel* merupakan tempat dimana protein anak bergerak dan berpindah menuju anoda. Pembuatan *separating gel* terdiri dari larutan stok akrilamid/bis-akrilamid 30%, SDS 10%, 3 M tris-HCl pH 8,8 ; *ammonium peroxydisulfate* (APS) 10%, dan TEMED.

Sebelum penambahan TEMED ke larutan *separating gel*, aquades dalam *sandwich plate* dibuang dan dikeringkan dengan tisu. TEMED dimasukkan ke larutan *separating gel*, dihomogenisasi, dan dituangkan ke dalam *sandwich plate* sampai dengan jarak 1 cm dari permukaan *plate*. Isobutanol ditambahkan pada bagian atas larutan *separating gel* untuk meratakan, membuang gelembung, dan mencegah oksidasi. Kemudian gel didiamkan selama 0,5-1 jam dalam temperatur ruang atau disimpan dalam inkubator pada suhu 37° C untuk mempercepat polimerisasi.

Sebelum penambahan TEMED ke larutan *stacking gel*, isobutanol dibuang dan permukaan gel dicuci dengan aquades lalu dikeringkan dengan tisu. TEMED dimasukkan ke larutan *stacking gel*, dihomogenisasi, dan dituangkan ke atas *separating gel* yang telah mengeras. *Comb* atau sisir segera dipasang. Kemudian didiamkan selama 15-30 menit.

7. Persiapan Sampel

Sebelum dimasukkan ke sumuran untuk melalui proses elektroforesis, sampel harus dipreparasi terlebih dahulu. Sampel protein daging diambil sebanyak 10 µl ditambahkan dengan 5 µl *loading sample*. Untuk sampel bakso diambil 20 µl ditambahkan 10 µl *loading sample*. Dan marker protein sebanyak 10 µl. Kemudian masing-masing sampel dan marker protein dididihkan dalam air dengan suhu 100° C selama 3 menit.

8. Prosedur Elektroforesis

Profil protein dikarakterisasi dengan SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate poliacrilimide gel electrophoresis*) yang dilakukan dengan menggunakan metode standar (Hames, 1998).

Sandwich plate dilepas dari *casting slot*. Kemudian dipasang ke *aparatus elektroforesis* dan dituangkan 1x buffer elektroforesis ke bagian tengah aparatus. Sampel dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran. Dituangkan 1x buffer elektroforesis ke bagian luar aparatus. Dilakukan running protein pada 75 volt, sampai sampel mencapai akhir *stacking gel*. Kemudian tegangan listrik dinaikkan menjadi 125-140 volt, sampai sampel mencapai ujung *separating gel*. Diakhir proses sumber listrik dilepas dan gel diambil dari *plates*. *Stacking gel* dipotong, lalu dibuang dan dibersihkan dengan aquades.

9. Proses Pewarnaan Gel

Gel yang telah dibersihkan dari sisa *stacking* kemudian diletakkan dalam cawan petri yang sudah ditambahkan larutan pewarna *Coomasie*

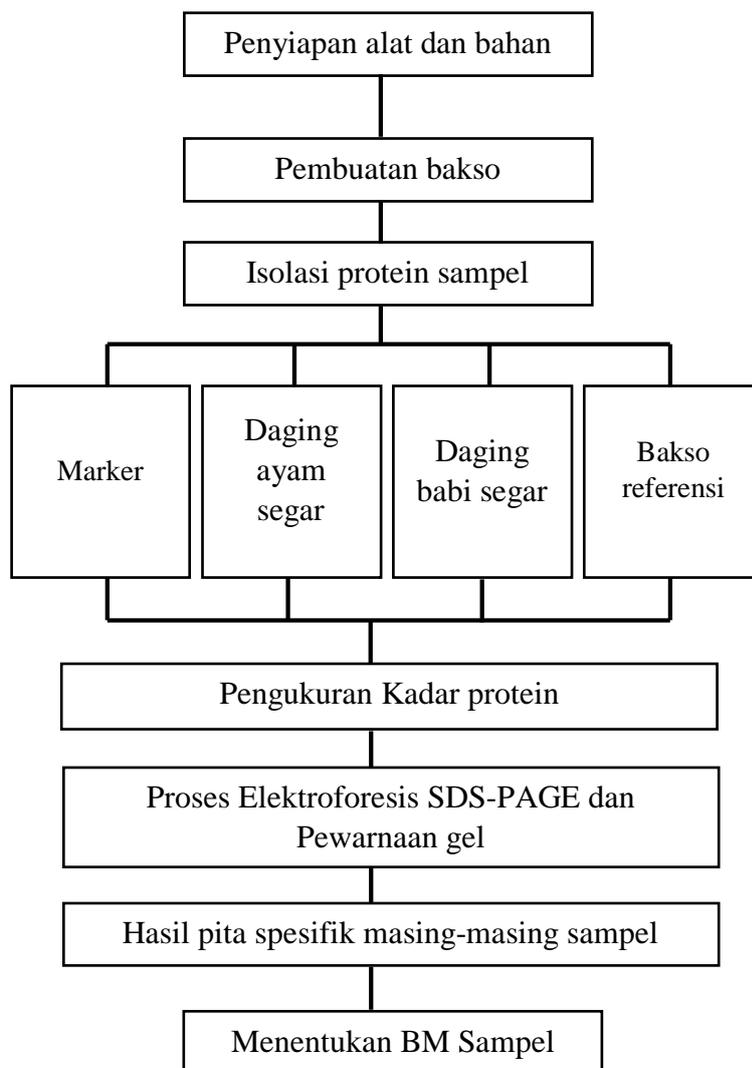
brilliant blue. Selanjutnya cawan petri ditelakkan diatas *Shaker* selama 30 menit. Kemudian gel dipindahkan dan ditambahkan larutan pencuci untuk didiamkan selama semalam. Setelah itu dilakukan pengamatan pada gel.

10. Analisa Bobot Molekul Protein hasil SDS-PAGE

Analisa bobot molekul (BM) masing-masing protein hasil ekstraksi jaringan daging segar ayam, daging babi, dan bakso babi dilakukan dengan menggunakan protein marker sebagai standar. Hasil *scanning* pita-pita protein dipetakan ke dalam kurva persamaan regresi linier sehingga didapatkan nilai BM protein pada masing-masing sampel.

G. Skema Langkah Kerja

Langkah kerja dimulai dari tahap awal penelitian, persiapan bahan, reagen dan peralatan pendukung. Setelah itu dilakukan pembuatan bakso referensi. Dibuat berdasar komposisi daging penyusun yang berbeda. Selanjutnya dilakukan isolasi sampel untuk mengisolasi protein sampel. Maka didapatkan sampel yang siap uji. Selain itu juga perlu dipersiapkan marker protein. Untuk mengoptimalkan proses selanjutnya dilakukan pengukuran kadar protein. Setelah semuanya siap dapat dilakukan proses elektroforesis dilanjutkan pewarnaan gel. Sehingga didapatkan gambaran profil pita protein dan yang terakhir adalah penentuan berat molekul. Didapatlah profil hasil isolasi pada masing-masing sampel. Adapun skema langkah kerja dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Skema Langkah Kerja

H. Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian ini adalah gambaran secara deskriptif perbedaan pita spesifik hasil isolasi protein daging ayam segar, daging babi segar dan bakso referensi atau buatan sendiri dengan perbandingan komposisi penyusunnya. Kemudian data lain yang diperoleh adalah berat molekul hasil isolasi protein daging ayam, daging babi, dan bakso babi berdasarkan markernya. Nilai yang dihasilkan adalah R_f (hasil pembagian

jarak pita dan jarak running) dan logaritma berat molekul marker (kD), ditransformasikan dalam bentuk persamaan regresi linier $Y = ax + b$. Y adalah logaritma berat molekul marker dan x adalah Rf. Mobilitas relatif protein dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$Rf = \frac{Band (cm)}{Run (cm)}$$

$$BM = 10^{(a \cdot Rf + b)}$$

Keterangan :

Rf = mobilitas relatif protein

Band (cm) = jarak migrasi protein

Run (cm) = jarak migrasi *tracking dye*

BM = berat molekul (Dalton)

a = intersep (persamaan regresi)

b = gradien (persamaan regresi)