

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN GELATIN TIPE B TULANG
AYAM BROILER (*Gallus domesticus*) MENGGUNAKAN
ELEKTROFORESESIS SDS-PAGE**

SKRIPSI

Oleh:
DHIENDA RISA AWALSASI
NIM. 13630080



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN GELATIN TIPE B TULANG
AYAM BROILER (*Gallus domesticus*) MENGGUNAKAN
ELEKTROFORESESIS SDS-PAGE**

SKRIPSI

Oleh:

DHIENDA RISA AWALSASI
NIM. 13630080

Diajukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam

Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN GELATIN Tipe B TULANG
AYAM BROILER (*Gallus domestica*) MENGGUNAKAN
ELEKTROFORESIS SDS-PAGE**

SKRIPSI

Oleh:

**DHIENDA RISA AWALSASI
NIM. 13630080**

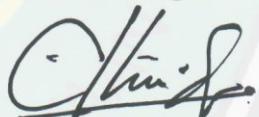
**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 30 Juni 2018**

Pembimbing I



**Akyunul Jannah, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009**

Pembimbing II



**Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**



**Elok Kamijah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN GELATIN Tipe B TULANG
AYAM BROILER (*Gallus domesticus*) MENGGUNAKAN
ELEKTROFORESIS SDS-PAGE**

SKRIPSI

Oleh:
DHIENDA RISA AWALSASI
NIM. 13630080

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Pengaji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 30 Juni 2018

Pengaji Utama : Dr. Anton Prasetyo
NIP. 19770925 200604 1 003

Ketua Pengaji : Dewi Yuliani, M.Si
NIDT. 19880711 20160801 2 067

Sekretaris Pengaji : Akyunul Jannah, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Anggota Pengaji : Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069

(.....)
(.....)
(.....)
(.....)



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dhienda Risa Awalsasi
NIM : 13630080
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Karakterisasi Profil Protein Gelatin Tipe B Tulang Ayam Broiler (*Gallus domestica*) Menggunakan Elektroforesis SDS-PAGE

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 05 Juli 2018

Yang membuat pernyataan,



Dhienda Risa Awalsasi
NIM. 13630080

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah, puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian ini yang berjudul “KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN GELATIN TIPE B TULANG AYAM BROILER (*Gallus domestica*) MENGGUNAKAN ELEKTROFORESIS SDS-PAGE”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku dosen pembimbing.
2. Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku konsultan yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dan perhatiannya dalam penulisan proposal ini.
3. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku pembimbing agama.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku ketua jurusan kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Bapak dan Ibu staf pengajar segenap civitas akademika di Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Malang.
6. Kedua orang tua tercinta, Bapak M. Ghufron, S.H dan Ibu Siti Choirini, S.H yang selalu ikhlas memberikan dukungan material, moral, nasehat-

nasehat, serta lantunan do'a yang tiada pernah putus di setiap tasbih dan sujudnya setiap waktu.

7. Semua pihak yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian dan penulisan laporan.

Semoga semua bantuan yang telah diberikan mendapatkan balasan dari Alla SWT. Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, ibarat gading yang tak retak. Oleh karena itu, kritik serta saran yang bersifat membangun sangat penulis nantikan. Dan semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 6 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II STUDI PUSTAKA	6
2.1 Gelatin	6
2.2 Berat Molekul Gelatin.....	7
2.3 Purifikasi Protein dengan Amonium Sulfat	9
2.4 Proses Dialisis	10
2.5 Karakterisasi Protein menggunakan SDS-PAGE	11
2.6 Analisis Kadar Protein menggunakan Metode Lowry	15
2.7 Gelatin dalam Perspektif Hukum Islam	17
BAB III METODE PENELITIAN	19
3.1 Waktu dan Tempat	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.2.1 Alat.....	19
3.2.2 Bahan.....	19
3.3 Tahapan Penelitian.....	20
3.4 Prosedur Penelitian.....	20
3.4.1 Preparasi Sampel	20
3.4.2 Presipitasi Protein menggunakan Amonium Sulfat	21
3.4.3 Dialisis Protein menggunakan Membran Selofan	21
3.4.4 Penentuan Berat Molekul menggunakan SDS-PAGE	22
3.4.4.1 Pembuatan Gel SDS-PAGE	22
3.4.4.2 Preparasi dan Running Sampel	22
3.4.4.3 Pewarnaan dan Pelunturan Gel	22
3.4.5 Penentuan Kadar Protein menggunakan Metode Lowry	23
3.4.5.1 Pembuatan Reagen Lowry	23
3.4.5.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	23
3.4.5.3 Pembuatan Larutan Standar	24
3.4.5.4 Penentuan Kadar Protein	24
3.5 Analisis Data	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Preparasi Sampel	26
4.2 Presipitasi Protein Gelatin menggunakan Amonium Sulfat	27
4.3 Dialisis Protein Gelatin	28

4.4 Karakterisasi Profil Protein Gelatin menggunakan SDS-PAGE	29
4.5 Penentuan Kadar Protein menggunakan Metode Lowry	31
4.6 Gelatin dalam Perspektif Islam	33
BAB V PENUTUP	35
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	40



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur kimia gelatin	6
Gambar 2.2 Pola SDS-PAGE gelatin yang diekstrak dari kepala unggas	8
Gambar 2.3 Pola SDS-PAGE gelatin kulit sapi dan babi	9
Gambar 2.4 Mekanisme <i>salting in</i> dan <i>salting out</i>	10
Gambar 2.5 Proses dialisis menggunakan membran selofan	11
Gambar 2.6 Skema SDS-PAGE	12
Gambar 2.7 Konformasi protein setelah penambahan SDS	13
Gambar 2.8 Reaksi pembentukan poliakrilamid	14
Gambar 2.9 Pembentukan kompleks antara ikatan peptida dengan ion Cu ²⁺	16
Gambar 2.10 Reaksi fosfomolibdat dan fosfotungstat menjadi tungsten dan molibdenum	16
Gambar 4.1 Gelatin hasil produksi tulang ayam Broiler	26
Gambar 4.2 Endapan hasil presipitasi protein menggunakan amonium sulfat	28
Gambar 4.3 Hasil pemisahan gelatin komersial sapi dan gelatin tulang ayam	30
Gambar 4.4 Grafik kurva standar BSA	32
Gambar L.4.1 Kurva panjang gelombang maksimum	51
Gambar L.5.1 Kurva standar BSA	52
Gambar L.6.1 Kurva persamaan regresi marker protein (1)	54
Gambar L.6.2 Kurva persamaan regresi marker protein (2)	55

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan asam amino dalam gelatin	7
Tabel 3.1 Komposisi <i>stacking</i> dan <i>resolving gel</i>	22
Tabel 4.1 Kadar protein gelatin sebelum dimurnikan	32
Tabel 4.2 Kadar protein gelatin setelah dimurnikan	33
Tabel L.3.1 Penambahan ammonium sulfat	45
Tabel L.3.2 Penambahan amoni sulfat pada tiap konsentrasi	45
Tabel L.3.3 Penambahan BSA pada tiap konsentrasi	48
Tabel L.3.4 Komposisi <i>sample buffer</i>	50
Tabel L.3.5 Komposisi larutan <i>destaining</i>	50
Tabel L.5.1 Konsentrasi kurva standar	52
Tabel L.5.2 Konsentrasi gelatin sebelum dimurnikan	53
Tabel L.5.3 Konsentrasi gelatin setelah dimurnikan	53
Tabel L.6.1 Marker protein (1)	54
Tabel L.6.2 Berat molekul sampel gelatin (1)	54
Tabel L.6.3 Marker protein (2)	55
Tabel L.6.4 Berat molekul sampe gelatin (2)	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	40
Lampiran 2 Skema Kerja	41
Lampiran 3 Perhitungan dan Pembuatan Larutan	45
Lampiran 4 Kurva Panjang Gelombang Maksimum Spektrofotometer UV-Vis	51
Lampiran 5 Hasil Analisis Kadar Protein menggunakan Metode Lowry	52
Lampiran 6 Data Hasil Elektroforesis SDS-PAGE	54
Lampiran 7 Dokumentasi	57

ABSTRAK

Awalsasi, R. Dhienda. 2018. Karakterisasi Profil Protein Gelatin Tipe B Tulang Ayam Broiler (*Gallus domestica*) menggunakan Elektroforesis SDS-PAGE. Pembimbing I: Akyunul Jannah; Pembimbing II: Dewi Yuliani

Kata Kunci: gelatin, presipitasi amonium sulfat, elektroforesis SDS-PAGE, Lowry

Gelatin merupakan protein yang diperoleh dari hidrolisis kolagen yang secara alami terdapat pada tulang atau kulit binatang. Karakterisasi profil protein merupakan salah satu aspek penting untuk mengetahui karakteristik gelatin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul protein gelatin dengan metode SDS-PAGE. Pemurnian gelatin menggunakan metode presipitasi amonium sulfat dengan variasi konsentrasi sebesar 40, 50, 60 dan 70%. Hasil analisis SDS-PAGE, tidak menunjukkan perbedaan pada pola pita protein sampel gelatin sebelum dan sesudah dimurnikan. Semua sampel gelatin memiliki 3 pita utama yakni 2 α -chains pada pita protein ~135 kDa (α_1 dan α_2 chains) dan β -chain pada pita protein ~245 kDa. Kadar protein gelatin sebelum dimurnikan sebesar 71,65 ppm, setelah dimurnikan dengan variasi konsentrasi amonium sulfat yaitu sebesar 61,42; 60,45; 59,89 dan 55,32 ppm.

ABSTRACT

Awalsasi, R. Dhienda. 2018. The Characterization of Gelatin Protein Profile of Type B of Broiler Chicken Bones (*Gallus domestica*) using Electrophoresis of SDS-PAGE. Supervisor I: Akyunul Jannah; Supervisor II: Dewi Yuliani

Keywords: gelatin, ammonium sulfate precipitation, SDS-PAGE electrophoresis, Lowry

Gelatin is a protein that is derived from collagen hydrolysis in bone or animal skin naturally. Characterization of protein profiles is one of the important aspects in determining the characteristics of gelatin. The research aims at determining the molecular weight of gelatin protein with SDS-PAGE method. The purification of gelatin used precipitation method of sulfate ammonium with variation of concentration of 40, 50, 60 and 70%. The results of the SDS-PAGE analysis showed no difference in protein band pattern of gelatin samples before and after the purification. All gelatin samples had 3 main bands, namely 2 α -chains on the protein band \sim 135 kDa (α_1 and α_2 chains) and β -chain on the \sim 245 kDa protein band. Gelatin protein content before purified was 71,65 ppm, after purified by variation of sulfate ammonium concentration, it was 61,42; 60,45; 59,89 and 55,32 ppm.

ملخص البحث

ديندا ريسا أولساسى. 2018. توصيف لحة البروتين الجيلاتين فى النوع ب من عظم دجاج الفراخ
(Bاستخدام الرحلان الكهربائي *Gallus domestica*). المشرفة

الأولى: اعین الحنة. المشرفة الثانية: ديوبي يوليانى

الكلمات الرئيسية: الجيلاتين ، ترسب الأمونيوم الكبريتات ، الرحلان الكهربائي - SDS- Lowry, PAGE

الجيلاتين هو بروتين الذى يحصل من التحلل المائي الكولاجين الموجود في الجلد أو العظام طبيعياً. توصيف لحة البروتين هو واحد من الجوانب الهاامة لمعرفة خصائص الجيلاتين. يهدف هذا البحث إلى تحديد الوزن الجزيئي البروتين الجيلاتين بطريقة SDS-PAGE . تنقية الجيلاتين تستخدم طريقة ترسب الأمونيوم الكبريتات مع اختلاف التركيز بقدر 40 و 50 و 60 و 70 %. تظهر نتائج تحليل SDS-PAGE الاختلاف في نمط شريط البروتين من عينات الجيلاتين قبل وبعد التنقية. تحتوي جميع عينات الجيلاتين على 3 نطاقات رئيسية ، أي α_1 -chains على نطاقات البروتين ~ 135 kDa ، α_2 chains و β -chain في نطاق البروتين ~ 245 kDa. محتوى البروتين الجيلاتين قبل تنقية يساوى ppm 71,65 ، بعد تنقية مع اختلاف التركيز الأمونيوم الكبريتات هو ppm 55.32 و 59.89 و 60.45 و 61,42 .

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gelatin merupakan protein yang dihasilkan dari hidrolisis kolagen yang secara alami terkandung dalam tulang atau kulit binatang. Gelatin telah diterapkan di semua bidang kehidupan modern. Pada bidang industri pangan, gelatin dapat ditemukan dalam banyak produk seperti yoghurt, es krim, permen dan marshmallow. Pada bidang kedokteran gelatin digunakan dalam kapsul lunak dan keras, untuk mengikat dalam tablet (Venien dan Levieux, 2005).

Hastuti dan Iriane (2007) menyatakan bahwa kandungan protein dalam gelatin sangat tinggi. Kandungan protein pada gelatin kering adalah sebesar 84-86%. Karakterisasi profil protein adalah aspek penting untuk mengetahui karakteristik gelatin, dalam hal ini yaitu berat molekul (Schrieber dan Gareis, 2007). Firman Allah dalam Q.S. al-Maidah ayat 88 yang berbunyi:

وَكُلُوا مَا رَزَقْنَاكُمُ اللَّهُ حَالًا طَيِّبًا وَاتَّقُوا اللَّهَ الَّذِي أَنْتُمْ بِهِ مُؤْمِنُونَ

“Dan makanlah makanan yang halal lagi baik dari apa yang Allah telah rezekikan kepadamu, dan bertakwalah kepada Allah yang kamu beriman kepadanya”

Ayat diatas menjelaskan bahwa manusia diperintahkan untuk memakan makanan yang halal dan baik. Gelatin merupakan salah satu sumber bahan makanan yang mempunyai kandungan protein tinggi. Menurut GME (*Gelatine Manufacturers of Europe*) (2009) bahan baku gelatin yaitu dari kulit dan tulang babi maupun sapi. Produksi gelatin dari bahan baku kulit babi sekitar 44%, kulit sapi 28%, tulang sapi 27% dan porsi lainnya 1%.

Penggunaan gelatin dari bahan dasar sapi dan babi mempunyai beberapa keterbatasan dan larangan dari aspek religi dan kesehatan. Masyarakat Islam tidak diperbolehkan (haram) mengkonsumsi bahan-bahan yang berasal dari babi, sedangkan masyarakat Hindu tidak mengkonsumsi bahan-bahan dari sapi. Pencarian gelatin alternatif yang tidak berbahan dasar babi ataupun sapi sangat diperlukan (Karim dan Bhat, 2009). Gelatin yang diproduksi dari tulang ayam merupakan alternatif yang potensial untuk mengganti peranan dari gelatin yang bersumber dari babi maupun sapi. Firman Allah dalam Q.S. al-An'am ayat 145:

قُلْ لَا أَجِدُ فِي مَا أُوحِيَ إِلَيَّ مُحَرَّمًا عَلَىٰ طَاعِمٍ يَطْعَمُهُ إِلَّا أَنْ يَكُونَ مَيْتَةً أَوْ دَمًا مَسْقُوفًا أَوْ حَلَمَ
خَنْزِيرٍ فِتَنَةً رِجْسٌ أَوْ فِسْقًا أَهْلَ لِعَبْرِ اللَّهِ بِهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَإِنَّ رَبَّكَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ

Katakanlah; “Tiadalah aku peroleh dalam wahyu yang diwahyukan kepadaku, sesuatu yang diharamkan bagi orang hendak memakannya, kecuali kalau makanan itu bangkai atau darah yang mengalir atau daging babi, karena sesungguhnya semua itu koto, atau binatang yang disembelih atas nama selain Allah. Barang siapa yang dalam keadaan terpaksa, sedang dia tidak menginginkannya dan tidak (pula) melampaui batas, maka sesungguhnya Tuhanmu Maha Pengampun lagi Maha Penyayang”.

Gelatin yang bersumber dari bahan baku yang berbeda akan memiliki karakteristik yang berbeda (Gilsenan dan Ross-Murphy, 2000). Du, dkk. (2013) gelatin pada kepala ayam memiliki 3 pita protein *major* yaitu dua α -chains (α_1 berada diatas pada 134 kDa dan α_2 berada dibawah pada 120 kDa) dan pada 250 kDa sebagai β -chain. Karakterisasi protein gelatin pada kulit sapi dan babi dilakukan oleh Hafidz dan Yaakob (2011) keduanya memiliki 2 pita protein *major* yaitu 100 KDa yang merupakan α -chain dan 220 kDa yang merupakan β -chain. Mohtar, dkk. (2010) menyatakan bahwa gelatin sapi memiliki 4 pita protein yaitu pada sekitar 40-100 kDa, sedangkan pada gelatin babi memiliki pita protein sekitar 20-100 kDa. Chiou, dkk. (2006) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa

pada gelatin ikan pollock dan salmon memiliki pita protein yang sama yakni pada 240, 116 dan 80 kDa, namun pada gelatin sapi berkisar antara 116-240 kDa dan tidak ditemukan pada pita 80 kDa, semua gelatin pada sampel mengandung α_1 , α_2 dan β -chain.

Kemurnian suatu sampel gelatin adalah aspek penting pada analisis menggunakan SDS-PAGE. Sampel yang asam, encer dan kental dapat berpengaruh pada analisis SDS-PAGE. Hal tersebut bisa diatasi menggunakan metode purifikasi atau pemurnian untuk memekatkan protein dan menghilangkan kontaminan (Grabski dan Burgess, 2001). Zhao, dkk. (2016) menyatakan bahwa presipitasi protein bisa dilakukan dengan menggunakan garam ammonium sulfat.

Penelitian tentang purifikasi protein pada berbagai konsentrasi ammonium sulfat telah banyak dilakukan. Zhao, dkk. (2016) dan Asker, dkk. (2013) menggunakan ammonium sulfat dengan konsentrasi 60% terhadap protease yang diisolasi dari *Escherichia coli* dan *Bacillus megaterium* menghasilkan pita protein masing-masing sebesar 27,431 dan 30 kDa. Wardani dan Nindita (2012) melaporkan purifikasi protease dari limbah cair tahu menggunakan ammonium sulfat jenuh dengan variasi konsentrasi 30, 40, 50, 60, dan 70%. Hasil purifikasi menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada konsentrasi ammonium sulfat 50% menghasilkan pita protein sebesar 29,71 kDa.

Protein akan mengendap pada konsentrasi ammonium sulfat tertentu. Purifikasi protein dalam penelitian ini menggunakan ammonium sulfat dengan variasi konsentrasi 40, 50, 60 dan 70% sehingga diharapkan dapat memperoleh konsentrasi ammonium sulfat yang tepat dalam memaksimalkan jumlah protein dari sampel gelatin dan memudahkan untuk terdeteksinya protein pada pita protein

SDS-PAGE. Karakterisasi profil protein menggunakan SDS-PAGE merupakan uji kualitatif untuk mengetahui berat molekul suatu protein.

Kadar suatu protein dapat ditentukan menggunakan metode Lowry. Zhou dan Regenstein (2006) menggunakan metode Lowry untuk menentukan kadar protein larutan gelatin dengan panjang gelombang 650 nm. Metode ini dipilih karena memiliki banyak kelebihan. Metode Lowry lebih sensitif (100 kali) dari metode Biuret, sehingga diperlukan sampel protein yang lebih sedikit. Batas deteksi metode ini berkisar pada konsentrasi 0.01 mg/mL (Lowry, dkk. 1951).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana hasil karakterisasi profil protein gelatin menggunakan elektroforesis SDS-PAGE berdasarkan perlakuan purifikasi amonium sulfat?
2. Berapakah kadar protein gelatin menggunakan metode Lowry berdasarkan perlakuan purifikasi amonium sulfat?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui hasil karakterisasi profil protein gelatin menggunakan SDS-PAGE berdasarkan perlakuan purifikasi protein dengan amonium sulfat.
2. Untuk mengetahui kadar protein gelatin menggunakan metode Lowry berdasarkan perlakuan purifikasi dengan amonium sulfat.

1.4 Batasan Masalah

1. Penelitian ini digunakan sampel gelatin hasil produksi dari tulang ayam Broiler dengan pelarut NaOH 5% dengan lama perendaman selama dua hari.
2. Purifikasi protein gelatin menggunakan amonium sulfat dengan variasi konsentrasi 40, 50, 60 dan 70%.
3. Penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry.

1.5 Manfaat Penelitian

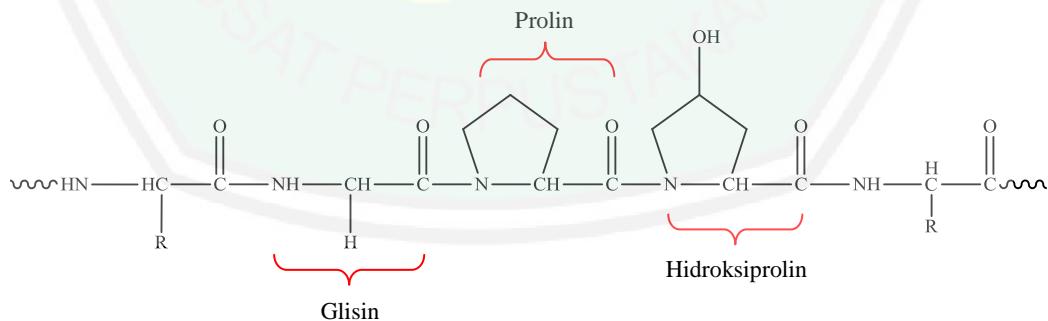
1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan metode analisis protein gelatin menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE dengan perlakuan pemurnian (presipitasi amonium sulfat) bagi mahasiswa, peneliti, dan kalangan akademis.
2. Hasil penelitian ini di harapkan juga dapat memberikan informasi tentang nilai gizi protein gelatin hasil produksi dari tulang ayam Broiler bagi masyarakat umum.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gelatin

Gelatin merupakan protein yang berasal dari jaringan kolagen hewan yang terdapat pada kulit dan tulang. Gelatin didapatkan dari hidrolisis parsial pada kolagen. Pada saat kolagen dalam suasana basa atau asam dan pada kondisi panas, struktur jaringan kolagen dipecah secara *irreversibel* menghasilkan gelatin (Zhou dan Regenstein, 2006). Gelatin dihasilkan dari pemutusan ikatan *cross-linking* (ikatan silang) antara rantai polipeptida pada kolagen dengan disertai sejumlah perusakan pada rantai peptida. Ikatan peptida yang menghubungkan asam-asam amino membentuk gelatin. Asam amino penyusun gelatin berupa *Gly-X-Y* dimana X adalah asam amino prolin dan Y adalah asam amino hidroksiprolin (Wiratmaja, 2006). Gambar 2.1 menunjukkan struktur kimia gelatin.



Gambar 2.1 Strukur kimia gelatin (Wiratmaja, 2006)

Gelatin mempunyai sifat fisik berwarna kuning cerah atau transparan, larut dalam air panas, berbentuk serpihan atau tepung dan berbau (Raharja, 2004).

Menurut Praira (2008) gelatin larut dalam air minimal pada suhu 49°C dan larut baik pada suhu 60-70°C. Menurut Hastuti dan Iriane (2007), kandungan protein pada gelatin kering dengan kadar air 8–12% sekitar 84–86%.

Tabel 2.1 Kandungan asam amino pada gelatin

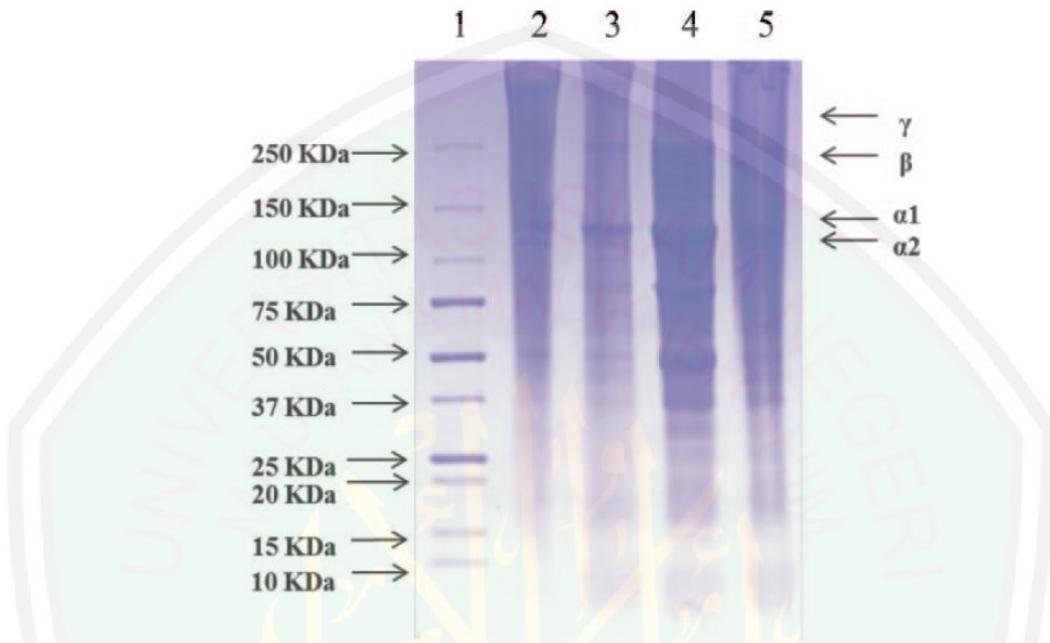
Asam Amino	Kadar (%)
Hidroksipropin	9,1
Asam Aspartat	2,9
Treonin	1,8
Serin	3,5
Asam Glutamat	4,8
Prolin	13,2
Glisin	33
Alanin	11,2
Valin	2,6
Metionin	0,36
Isoleusin	1
Leusin	2,7
Tirosin	0,26
Penilalanin	1,4
Hidroksilisin	0,51
Lisin	3
Histidin	0,4
Arginin	4,9

Sumber: Schrieber dan Gareis (2007)

2.2 Berat Molekul Gelatin

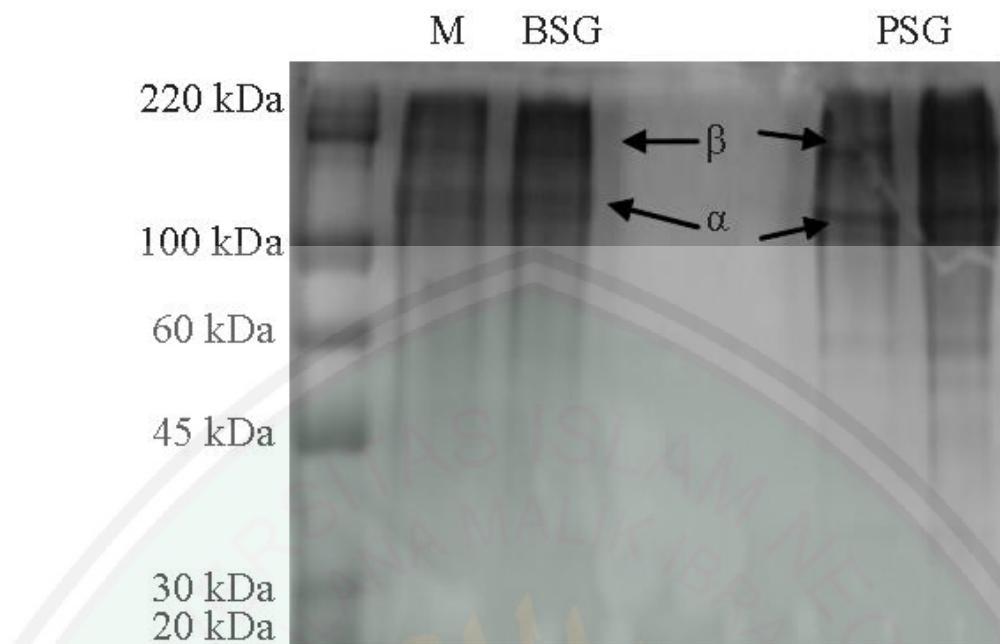
Berat molekul protein gelatin ditentukan dengan elektroforesis SDS-PAGE. Penelitian Du, dkk. (2013) menyatakan bahwa gelatin pada kepala ayam dan kalkun memiliki karakteristik pita protein yang sama, terdapat 3 pita *major* (Gambar 2.2) yaitu 2 α -chains (α_1 pada 134 dan α_2 pada 120 kDa) dan 1 β -chain yang merupakan *dimer* dari α_1 dan α_2 chains yakni pada pita protein ~250 kDa. Hafidz dan Yaakob, 2011 menyatakan bahwa karakteristik pada kulit sapi dan

babi memiliki 2 pita protein *major* yakni α -chain pada 100 kDa dan β -chain pada 220 kDa (Gambar 2.3).



Gambar 2.2 Pola SDS-PAGE gelatin yang diekstrak dari kepala unggas. 1: marker protein. 2: gelatin hasil ekstraksi dari kepala unggas tahap pertama (50°C). 3: gelatin hasil ekstraksi dari kepala ayam tahap kedua (60°C). 4: gelatin hasil ekstraksi dari kepala kalkun tahap pertama (50°C). 5: gelatin hasil ekstraksi dari kepala kalkun tahap kedua (60°C) (Du, dkk. 2013)

Gelatin ikan pollock dan salmon memiliki karakteristik yang berbeda dengan gelatin babi. Ketiga jenis gelatin tersebut mengandung α_1 , α_2 dan β -chains. Pada kedua jenis gelatin ikan memiliki berat molekul yang lebih rendah daripada gelatin babi (Chiou, dkk. 2006).



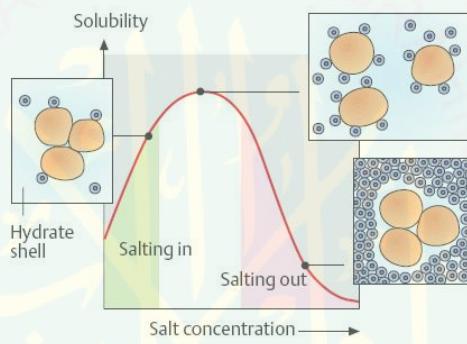
Gambar 2.3 Pola SDS-PAGE gelatin kulit sapi dan babi. M: marker protein. BSG: gelatin hasil ekstraksi dari kulit sapi. PSG: gelatin hasil ekstraksi dari kulit babi (Hafidz dan Yaakob, 2011)

2.3 Purifikasi Protein dengan Amonium Sulfat

Purifikasi atau pemurnian merupakan proses penambahan senyawa yang bisa memisahkan maupun menggumpalkan protein dari bahan lain sehingga diperoleh protein yang murni (Suhartono, 1989). Chaplin dan Bucke (1990) menyatakan bahwa purifikasi protein adalah metode yang berfungsi untuk pemekatan protein. Pemurnian protein dapat dilakukan dengan penambahan garam. Garam yang digunakan berupa amonium sulfat. Amonium sulfat digunakan karena mempunyai beberapa keunggulan daripada garam-garam yang lain, yaitu memiliki daya pengendapan yang efektif, mempunyai kelarutan yang tinggi, harganya murah dan dapat digunakan pada berbagai pH (Scopes, 1982).

Kelarutan protein akan mengalami penurunan setelah dilakukan penambahan garam pada konsentrasi tinggi. Hal ini terjadi akibat adanya tarikan

dari molekul-molekul air dan protein karena mengalami peningkatan muatan listrik di sekitar protein. Pengendapan protein atau yang sering disebut dengan *salting out* terjadi karena interaksi hidrofobik antara molekul protein pada suasana ionik tinggi. Protein yang mempunyai residu non-polar sedikit akan tetap larut sekalipun pada konsentrasi garam yang cukup besar, sedangkan protein yang hidrofobisitasnya tinggi akan mengendap dapat dilihat pada Gambar 2.4 (Scopes, 1982).



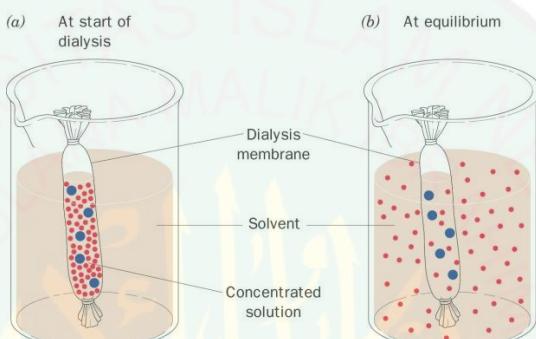
Gambar 2.4 Mekanisme *salting in* dan *salting out* (Suhartono, 1989)

Penggunaan amonium sulfat menimbulkan konsentrasi garam yang tertinggal dalam sampel tinggi, dan amonium sulfat juga tidak bersifat *buffer* sehingga bisa membebaskan amonia yang menyebabkan berpotensi mengalami penambahan pH (Suhartono, 1989). Amonium sulfat yang terdapat dalam protein bisa dihilangkan melalui proses dialisis didalam larutan *buffer* (Wardani, dan Nindita, 2012).

2.4 Proses Dialisis

Dialisis ini berfungsi agar garam dan zat terlarut lainnya yang memiliki berat molekul lebih rendah daripada protein dapat dihilangkan. Prinsip dialisis

berdasarkan pada Gambar 2.5 yaitu molekul-molekul besar dapat dipisahkan dari molekul yang kecil dengan menggunakan membran semipermeabel (Kristanti, 2001). Membran selofan digunakan pada proses dialisis karena membran ini memiliki ukuran pori-pori lebih kecil daripada ukuran protein oleh sebab itu, protein tidak dapat keluar dari membran (Kristanti, 2001).



Gambar 2.5 Proses dialisis menggunakan membran selofan (Kristanti, 2001)

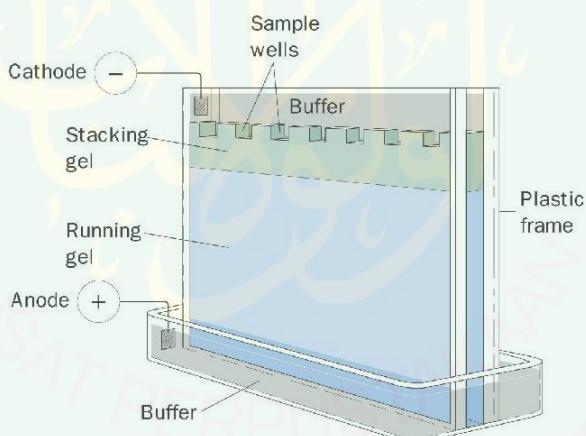
Dialisis adalah proses terjadinya perpindahan garam ammonium sulfat berganti dengan larutan *buffer* dalam dialisat. Saat garam berpindah melalui pori-pori membran, garam teradsorsi pada permukaan membran dan setelah itu berpindah dari sisi membran yang satu ke sisi membran yang lain. Proses ini dipertahankan karena adanya tekanan osmotik (Aulanni'am, 2005).

2.5 Karakterisasi Protein menggunakan Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis SDS-PAGE merupakan suatu metode untuk memisahkan protein yang didasarkan atas pergerakan partikel yang bermuatan disebabkan adanya pengaruh medan listrik (Westermeier, 2004). Prinsip metode elektroforesis dalam memisahkan molekul-molekul yang memiliki muatan listrik, dimana besarnya bergantung pada pH, jenis molekul, dan komponen medium pelarutnya

pada larutan akan bergerak ke arah elektroda yang polaritasnya berlawanan dengan muatan molekul (Riyanto, 2006).

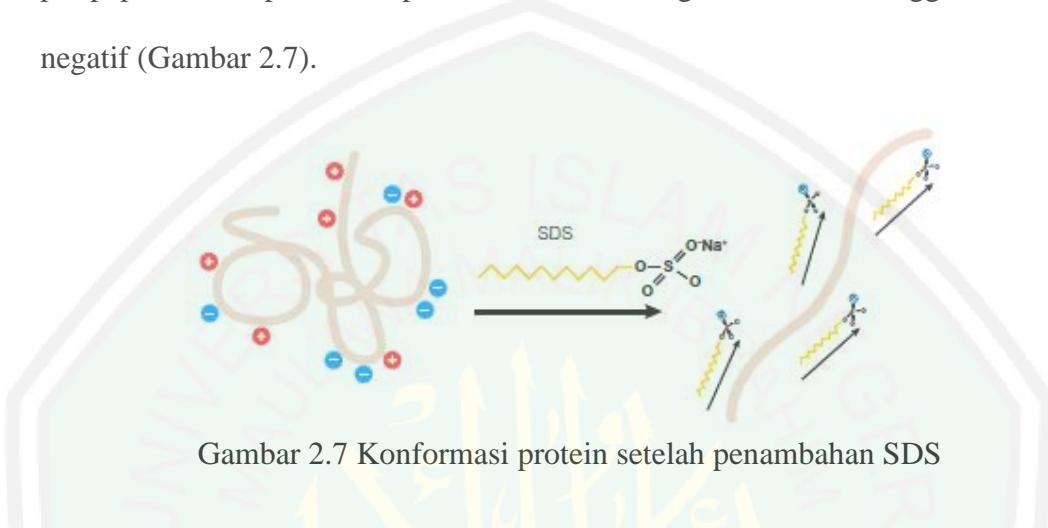
SDS-PAGE merupakan metode pemisahan rantai polipeptida pada protein yang didasarkan pada kemampuannya untuk bermigrasi dalam medan listrik. Proses ini dibutuhkan deterjen SDS dan pemanasan untuk memecah ikatan disulfida dengan cara merusak struktur tiga dimensi pada protein selanjutnya direduksi menjadi gugus sulfidihidril. Kompleks SDS dengan protein akan terbentuk dan kompleks ini bermuatan negatif karena terdapat gugus-gugus anionik dari SDS (Hemes, 1998). Skema SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Skema SDS-PAGE

SDS merupakan deterjen anionik yang dapat melapisi protein, memberikan muatan negatif pada semua sampel protein, dan sebagian besar sebanding dengan berat molekulnya. SDS berfungsi sebagai pendenaturasi protein, karena sifat dari SDS adalah sebagai deterjen yang mengakibatkan ikatan pada protein terputus menjadi protein yang dapat bermigrasi dalam gel. SDS dapat mengubah struktur

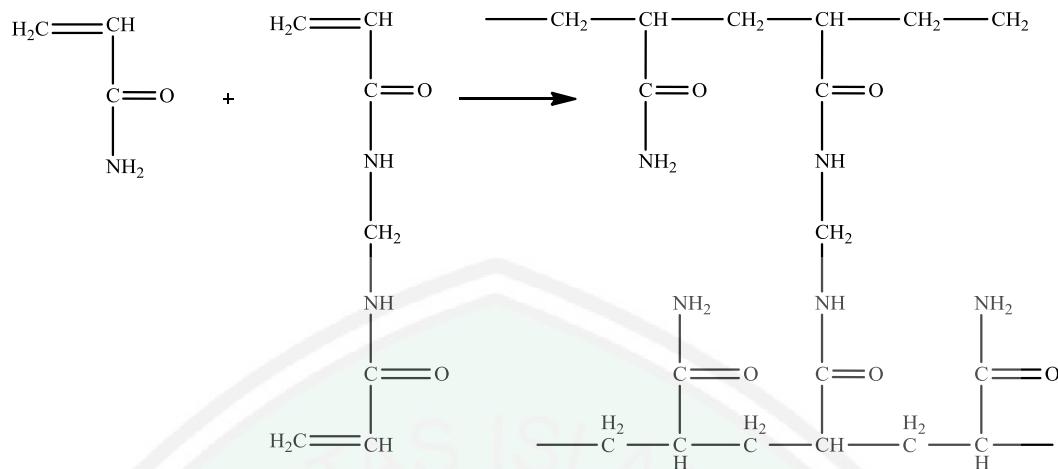
protein dengan cara melarutkan molekul hidrofobik yang terdapat pada struktur tersier polipeptida. Semua molekul protein akan kembali ke struktur linearnya (struktur primer) akibat adanya SDS dengan cara meregangkan gugus utama polipeptida. Setiap molekul protein akan dikelilingi oleh SDS sehingga bermuatan negatif (Gambar 2.7).



Gambar 2.7 Konformasi protein setelah penambahan SDS

Muatan listrik pada protein akan diubah menjadi bermuatan negatif karena adanya SDS yang merupakan deterjen anionik. Pengikatan SDS dengan protein akan mengakibatkan rusaknya struktur sekunder protein atau terputusnya ikatan disulfida yang terjadi akibat adanya penambahan *disulfide reducing agent*, seperti 2-merkaptoetanol atau 1,4-dithioetherol dan pemanasan (Fatchiyah, dkk. 2011).

Poliakrilamid adalah polimer dari monomer akrilamid. Pada saat poliakrilamid berbentuk gel, pori-pori kecil akan terbentuk yang memungkinkan molekul bermigrasi (bergerak). Poliakrilamid adalah media yang tepat untuk pemisahkan protein yang didasarkan pada ukuran protein karena memiliki pori-pori kecil sehingga mengakibatkan gerakan molekul lambat. Poliakrilamid terbentuk dari proses polimerisasi radikal bebas dari agen *cross-linking* *NN'methylene bis acrylamide* (Gambar 2.8) (Fatchiyah, dkk. 2011).



Gambar 2.8 Reaksi pembentukan poliakrilamid (Fatchiyah, dkk. 2004)

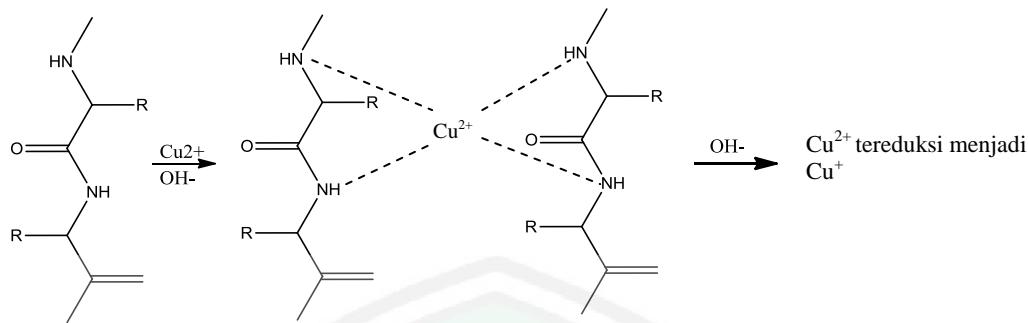
Analisis menggunakan SDS-PAGE ini terdiri dari dua gel poliakrilamid yakni *resolving gel* dan *stacking gel*. *Resolving gel* adalah tempat dimana protein akan bermigrasi (bergerak) menuju anoda, sedangkan *stacking gel* adalah sebagai gel tempat meletakkan sampel, terdapat beberapa sumur (*well*). *Resolving gel* dan *stacking gel* memiliki komposisi yang sama, perbedaannya hanya pada konsentrasi gel poliakrilamid pembentuknya dan pH *buffer* yang digunakan, konsentrasi *resolving gel* lebih besar daripada *stacking gel*. Komponen penting yang membentuk gel poliakrilamid adalah (Fatchiyah, dkk. 2011):

1. Akrilamida, merupakan senyawa utama yang membentuk gel poliakrilamid dan berbahaya bagi kesehatan (karsinogenik).
2. Bis akrilamida, berfungsi sebagai *cross-linking* agen yang membentuk kisi-kisi dengan polimer akrilamida. Kisi-kisi tersebut berfungsi sebagai saringan molekul protein.
3. TEMED (N,N,N',N' tetrametilendiamin), merupakan katalisator pada reaksi polimerisasi akrilamid menjadi gel poliakrilamid sehingga dapat digunakan pada pemisahan protein.

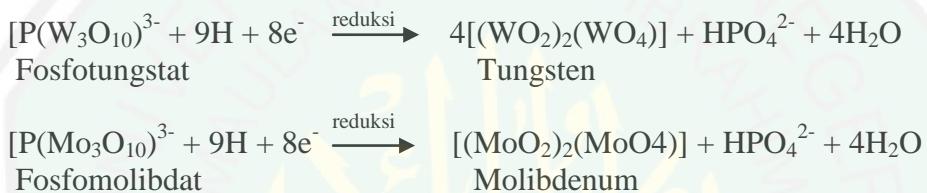
4. APS (Amonium persulfat), berfungsi sebagai inisiator yang mengaktifkan akrilamid agar bereaksi dengan molekul akrilamid yang lain, sehingga membentuk rantai polimer yang panjang.

2.6 Analisis Kadar Protein menggunakan Metode Lowry

Metode yang digunakan untuk pengukuran kadar protein pada penelitian ini yakni dengan metode Lowry. Reagen pendekksi Folin-ciocalteu digunakan pada metode Lowry. Reagen ini berfungsi sebagai pendekksi adanya gugus fenolik. Pada suasana basa, kompleks ion tembaga divalen (Cu^{2+}) dengan ikatan peptida akan tereduksi menjadi tembaga monovalen (Cu^+) (Bintang, 2010). Reagen Folin-ciocalteu yang digunakan pada analisis protein dapat mendekksi ion fenolat dimana fosfotungstat dan fosfomolibdat yang terdapat pada reagen tersebut direduksi oleh gugus fenolik tirosin menjadi tungsten dan molibden yang memiliki warna biru. Puncak absorpsi yang lebar pada daerah panjang gelombang sinar tampak (600-800 nm) merupakan hasil reduksi yang dapat dianalisis lebih lanjut. Pembuatan kurva standar digunakan untuk menentukan kadar protein pada sampel, kurva standar dibuat dengan larutan protein murni yang telah diketahui kadar proteinnya seperti *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang mempunyai rentang konsentrasi tertentu dimana konsentrasi sampel protein berada didalam rentang tersebut dengan konsentrasi yang semakin tinggi (Sudarmadji, dkk. 1981).



Gambar 2.9 Pembentukan kompleks antara ikatan peptida dengan ion Cu^{2+} , kemudian Cu^{2+} direduksi menjadi Cu^+ dalam suasana basa (Purwanto, 2014)



Gambar 2.10 Reaksi fosfomolibdat dan fosfotungstat menjadi tungsten dan molibdenum (Handayani, 2010)

Spektrofotometer adalah alat pengukuran kuantitatif, karena banyaknya cahaya yang diserap oleh partikel di dalam larutan juga bergantung oleh jenis maupun banyaknya partikel (Bintang, 2010). Prinsip dasar metode spektrofotometri yaitu pelewatan sinar melalui sampel dengan panjang gelombang tertentu. Sinar tersebut kemudian diserap oleh sampel yang berwarna dan sebagian lagi diteruskan, kemudian ditangkap oleh fotometer atau alat pendekripsi pengukur sinar. Intensitas sinar yang diukur oleh fotometer diubah menjadi satuan serapan (absorbansi) dan selanjutnya digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel (Praira, 2008).

Kadar protein gelatin juga dapat ditentukan dengan metode Biuret. Findiati (2013) dan Mufidah (2013) mengukur kadar protein gelatin ayam menggunakan

spektrofotometer UV-Vis dengan metode Biuret. Kadar protein gelatin ayam yang dihasilkan berturut-turut adalah 39,48% dan 68,33%. Praira (2008) juga menggunakan metode Biuret untuk mengukur kadar protein gelatin pada sampel tablet obat. Beberapa sampel tablet obat menghasilkan kadar protein sebesar 1–5%.

2.7 Gelatin dalam Perspektif Hukum Islam

Allah SWT berfirman dalam surat an-Nahl ayat 5 menjelaskan bahwa Allah telah menciptakan hewan ternak yang mempunyai berbagai manfaat dan kegunaan. Selain dagingnya yang dapat dimakan, ternak-ternak tersebut dapat diambil susunya untuk dikonsumsi. Tidak hanya untuk konsumsi makanan, ternak-ternak juga dapat dimanfaatkan untuk fungsi yang lain yaitu untuk transportasi, dan untuk manfaat-manfaat yang lain seperti kulitnya dapat dibuat sepatu, tas, dan sebagainya (DEPAG RI, 1990).

Firman Allah dalam Q.S. an-Nahl ayat 5:

وَالْأَنْعَامُ خَلَقَهَا لِكُمْ فِيهَا دِفْءٌ وَمَنَافِعٌ وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ

“Dan Dia telah menciptakan binatang ternak untuk kamu; padanya ada (bulu) yang menghangatkan dan berbagai-bagai manfaat, dan sebahagiannya kamu makan.”

Binatang ternak selalu dimanfaatkan dagingnya untuk diolah menjadi berbagai jenis makanan. Sedangkan bagian kulit dan tulangnya jarang sekali dimanfaatkan, padahal bagian-bagian ini dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar pembuatan gelatin. Gelatin adalah salah satu produk alami yang memiliki sifat aplikatif karena penggunaannya yang sangat luas, yakni sebagai bahan dasar maupun bahan tambahan pangan (Hastuti dan Iriane, 2007). Sompie, dkk. (2012)

menyatakan bahwa gelatin sangat penting sebagai bahan tambahan pangan karena memiliki kadar protein yang tinggi dan rendah akan lemak.

Makanan yang mempunyai nilai gizi yang tinggi merupakan makanan yang dianjurkan dalam agama islam karena makanan ini baik untuk kesehatan jasmani. Makanan yang bergizi dapat disebut sebagai makanan yang *thoyyib* (baik) dalam syari'at islam. Firman Allah SWT dalam Q.S. al-Baqarah ayat 168:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُو خُطُواتِ الشَّيْطَانِ ۝ إِنَّهُ لَكُمْ عَذُونٌ مُّبِينٌ

“Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan; karena sesungguhnya syaitan itu adalah musuh yang nyata bagimu.”

Ayat diatas menjelaskan tentang perintah yang diperuntukkan bagi manusia terutama umat Islam agar mengkonsumsi makanan yang halal dan baik untuk kekuatan jasmani dan rohani. Dijelaskan juga pada ayat tersebut bahwa Allah SWT melarang manusia mengkonsumi makanan yang sebaliknya, yaitu makanan yang haram. Karena apabila demikian, artinya sama dengan mengikuti langkah-langkah syaitan yang menjadi musuh nyata bagi manusia (Shihab, 2002).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni-Desember 2017.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi mikropipet dan tip, seperangkat alat gelas, neraca analitik, termometer, penangas air, *hot plate*, lemari pendingin, sentrifus, *shaker*, inkubator, tabung sentrifus, vorteks dan lemari asam. Seperangkat alat elektroforesis SDS-PAGE untuk analisis berat molekul. Instrumentasi yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan yaitu gelatin hasil produksi dari tulang ayam Broiler dengan pelarut NaOH 5% dengan lama perendaman 2 hari dan gelatin sapi komersial. Bahan kimia yang digunakan untuk presipitasi adalah amonium sulfat; *buffer* fosfat 0,2 M pH 7; akuabides; *buffer* fosfat 0,5 M pH 7; EDTA; NaHCO₃. Bahan-bahan untuk analisis SDS-PAGE adalah akrilamid, N,N'-bis-akrilamid (30%); *sodium dodesil sulfat* (SDS) 10% (*b/v*); *amonium persulfat* (APS) 10% (*b/v*); tetrametil-etilendiamin (TEMED); *running buffer* pH 8,3 (tris-base, glisin,

SDS); 1,5 M tris-HCl pH 8,8; 0,5 M tris-HCl pH 6,8; *sample buffer* (0,5 M tris-HCl pH 6,8; gliserol; 1% *Bromphenol blue*; β -*mercaptoethanol*; SDS 10%); marker protein (GangNam-STAIN Prestained Protein Ladder); *coomassie brilliant blue R-250*; asam asetat glasial; metanol *p.a.* Bahan-bahan untuk analisis kadar protein metode Lowry adalah Na₂CO₃; NaOH 0,1 N; CuSO₄.5H₂O; KNa-tatrat dan BSA.

3.3 Tahapan Penelitian

1. Preparasi sampel
2. Presipitasi protein menggunakan amonium sulfat
3. Dialisis protein menggunakan membran selofan
4. Penentuan berat molekul menggunakan elektroforesis SDS-PAGE
5. Penentuan kadar protein gelatin menggunakan metode Lowry
6. Analisis data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan agar diperoleh larutan gelatin. Gelatin diproduksi dari tulang ayam Broiler menggunakan pelarut NaOH 5% selama 2 hari perendaman. Proses ekstraksi gelatin dilakukan secara bertingkat, sehingga diperoleh ekstraksi pertama pada suhu 55°C (E1), ekstraksi kedua pada suhu 65°C (E2), dan ekstraksi ketiga pada suhu 75°C (E3). Gelatin sebanyak 100 mg dilarutkan pada 10 mL akuades dalam suhu 50 °C sampai larut sempurna. Larutan sampel kemudian divorteks sampai homogen pada suhu ruang (Aina, dkk. 2013).

3.4.2 Presipitasi Protein menggunakan Amonium Sulfat

Purifikasi protein gelatin dilakukan dengan menggunakan presipitasi amonium sulfat. Sebanyak 10 mL larutan gelatin ditambahkan amonium sulfat 40%. Proses presipitasi dilakukan dengan membiarkan campuran selama semalam (*overnight*) pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ dengan disertai pengadukan. Setelah proses pengendapan, campuran gelatin dengan amonium sulfat dipisahkan dengan cara sentrifugasi 5.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan endapannya merupakan protein setengah murni. Perlakuan diatas diulangi untuk penambahan amonium sulfat pada variasi konsentrasi 50, 60, dan 70% (Wardani dan Nindita, 2012).

3.4.3 Dialisis Protein menggunakan Membran Selofan

Dialisis dilakukan dengan menggunakan membran selofan. Membran selofan dipotong 6,5 cm setelah itu, direndam menggunakan larutan EDTA 1 mM dalam 2% NaHCO₃ selama 10 menit. Kemudian didiamkan selama 10 menit, larutan tersebut dibuang dan membran direndam dengan akuades selama 10 menit. Membran dilakukan perendaman kembali dengan akuades selama 10 menit sebanyak 2 kali (Wardani dan Nindita, 2012).

Masing-masing endapan protein tersebut kemudian dilarutkan dalam 5 mL *buffer* fosfat 0,5 M pH 7 dan dimasukkan ke dalam membran selofan. Selanjutnya, kedua ujung membran diikat menggunakan benang. Kemudian, didialisis dengan cara perendaman membran selofan dalam 100 mL menggunakan *buffer* fosfat 0,2 M pH 7 pada posisi tergantung dan diaduk pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 12 jam dengan kecepatan 100 rpm (Wardani dan Nindita, 2012).

3.4.4 Penentuan Berat Molekul menggunakan SDS-PAGE (BIO-RAD)

3.4.4.1 Pembuatan Gel SDS-PAGE

Pembuatan gel SDS-PAGE diawali dengan pembuatan *resolving gel* 12% dan dilanjutkan dengan *stacking gel* 4%. Berikut merupakan komposisi bahan dari masing-masing gel ditunjukkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi *stacking* dan *resolving gel*

Bahan	Volume	
	<i>Stacking gel</i> 4%	<i>Resolving gel</i> 12%
akrilamid/bis-akrilamid 30%	1980 µL	6000 µL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	3780 µL	-
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	3750 µL
SDS 10%	150 µL	150 µL
Akuades	9000 µL	5030 µL
TEMED	15 µL	7,5 µL
APS 10%	75 µL	75 µL
Total volume	15000 µL	15012,5 µL

3.4.4.2 Preparasi dan *Running* Sampel

Preparasi sampel sebelum proses *Running* dilakukan dengan menambahkan 15 µL sampel *buffer* ke dalam 15 µL sampel gelatin dengan perbandingan 1:1 (*v/v*), kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 95 °C selama 5 menit. Sampel didinginkan terlebih dahulu pada suhu ruang setelah itu sampel diinjeksikan ke dalam *well* dengan volume 15 µL dan sebanyak 5 µL volume marker protein yang diinjekka pada *well* yang berbeda. *Running* dilakukan pada tegangan 120 V selama ± 90 menit dalam *running buffer*.

3.4.4.3 Pewarnaan dan Pelunturan Gel

Proses *staining* atau pewarnaan gel diawali dengan perendaman gel dalam larutan *comassie brilliant blue* R-250. *Staining* dilakukan selama 25–30 menit

dengan di-shaker pada kecepatan 80 rpm. Kemudian proses *destaining* atau pelunturan, gel dicuci dengan akuades lalu direndam dalam larutan peluntur (*destain*) selama semalam. Pelunturan warna atau *destaining* pada gel dilakukan secara berulang hingga didapatkan pita protein berwarna biru dengan latar gel bening.

3.4.5 Penentuan Kadar Protein Gelatin menggunakan Metode Lowry

3.4.5.1 Pembuatan Reagen Lowry

Reagen Lowry terdiri dari reagen *A*, *B*, *C*, dan *D*. Reagen *A* terdiri dari 2% Na₂CO₃ dalam 0,1 N NaOH. Reagen *B* terdiri dari 0,5% CuSO₄.5H₂O dalam 1% KNa-Tatrat. Reagen *C* dibuat dari campuran 100 mL reagen *A* dan 2 mL reagen *B*. Reagen *D* dibuat dari campuran reagen Folin dan akuades dengan perbandingan 1:1 (Lowry, dkk. 1951).

3.4.5.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan mengukur salah satu campuran standar dan reagen Lowry. Larutan standar sebanyak 1,2 mL ditambah dengan akuades sampai volume 4 mL. Selanjutnya, reagen C ditambahkan sebanyak 5,5 mL, dihomogenkan dan didiamkan selama 15 menit. Setelah itu, reagen D ditambah sebanyak 0,5 mL, dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Kemudian, larutan diukur pada panjang gelombang 200-800 nm, panjang gelombang yang mempunyai serapan optimum adalah panjang gelombang maksimum (Lowry, dkk. 1951).

3.4.5.3 Pembuatan Larutan Standar

Pembuatan larutan baku standar diawali dengan memipet tiap larutan stok BSA 0,5 mg/mL dari konsentrasi 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 dan 0,1 mg/mL larutan protein standar dan dimasukkan kedalam tiap tabung reaksi. Setelah itu, akuades ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi sampai volume total 4 mL. Kemudian, reagen C sebanyak 5,5 mL ditambahkan pada tiap tabung reaksi dan divorteks sampai homogen. Setelah itu, didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit. Reagen D ditambahkan sebanyak 0,5 mL setelah itu, dikocok dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Diukur absorbansi larutan pada $\lambda=654$ nm sehingga diperoleh persamaan regresi linier, $y = ax + b$ (Lowry, dkk. 1951).

3.4.5.4 Penentuan Kadar Protein

Larutan sampel sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi. Selanjutnya, reagen C sebanyak 5,5 mL ditambahkan pada tabung reaksi dan dihomogen. Kemudian, didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit. Reagen D ditambahkan sebanyak 0,5 mL setelah itu, dikocok dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Diukur absorbansi larutan pada $\lambda=654$ nm (Lowry, dkk. 1951).

3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan membandingkan pita protein gelatin hasil presipitasi amonium sulfat dengan variasi konsentrasi 40, 50, 60, dan 70% dengan *marker* protein untuk memperoleh berat molekul dari masing-masing protein.

Berat molekul dari tiap protein ditentukan dengan cara menghitung nilai *Rf* dari tiap pita protein yang muncul. Selanjutnya, dibuat kurva standar yaitu hubungan antara log BM dengan *Rf* dari protein standar sehingga nilai BM protein sampel dapat dihitung.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Sampel gelatin yang digunakan pada penelitian ini merupakan gelatin hasil produksi dari tulang ayam Broiler (*Gallus domesticus*) menggunakan pelarut NaOH 5% dengan lama perendaman dua hari. Proses ekstraksi gelatin dilakukan secara bertingkat, ekstraksi pertama (E1) pada suhu 55°C, ekstraksi kedua (E2) pada suhu 65°C dan ekstraksi ketiga (E3) pada suhu 75°C masing-masing selama 4 jam. Rendemen yang dihasilkan pada masing-masing ekstraksi berturut-turut sebesar 4,156; 2,247 dan 2,228 gram. Gelatin komersial yang bersumber dari sapi digunakan sebagai pembanding. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik gelatin yang diproduksi dari tulang ayam.



Gambar 4.1 Gelatin hasil produksi tulang ayam Broiler

Sampel gelatin yang digunakan berbentuk serpihan, kemudian dilarutkan dalam akuades pada suhu $\pm 50^\circ\text{C}$. Salah satu sifat dari gelatin yakni pada suhu ruang tidak mudah larut dalam air sehingga, diberikan perlakuan suhu sebesar $\pm 50^\circ\text{C}$ agar gelatin larut sempurna. Raharja (2004) menyatakan bahwa gelatin

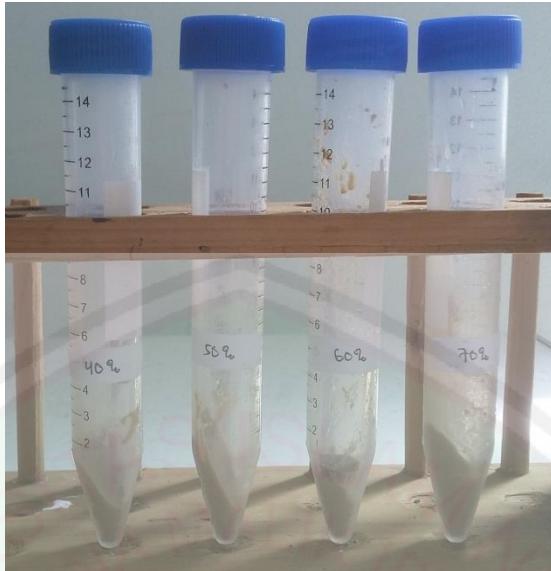
dengan bentuk serpihan atau tepung (serbuk) larut dalam air panas. Larutan gelatin yang diperoleh dalam penelitian ini yakni berwana kuning kecoklatan yang keruh dan memiliki bau yang khas.

4.2 Presipitasi Protein Gelatin menggunakan Amonium Sulfat

Proses purifikasi atau pemurnian protein gelatin diawali dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat dengan konsentrasi 40, 50, 60, dan 70%. Variasi konsentrasi ini digunakan bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan amonium sulfat terhadap hasil dari analisis profil protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE serta analisis kadar protein menggunakan metode Lowry.

Aulanni'am (2005) menyatakan bahwa penambahan amonium sulfat mempengaruhi proses pemurnian. Ketika konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan meningkat, ion garam amonium sulfat akan menarik beberapa molekul air dan akan menurunkan jumlah molekul air yang tersedia untuk berinteraksi dengan protein sehingga, protein akan mengendap (*salting out*) (Scopes, 1982). Endapan yang diperoleh merupakan protein gelatin setengah murni (Gambar 4.2).

Presipitasi dilakukan pada kondisi dingin selama semalam (*overnight*). Selama proses presipitasi tidak semua langsung mengalami pengendapan, sebagian protein terkumpul di bagian permukaan membentuk suatu lapisan. Endapan hasil presipitasi didapatkan dengan cara sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 5000 rpm (Gambar 4.2). Tahap berikutnya yaitu dialisis menggunakan larutan buffer.



Gambar 4.2 Endapan hasil presipitasi protein menggunakan amonium sulfat

4.3 Dialisis Protein Gelatin

Presipitasi menggunakan amonium sulfat menghasilkan kadar garam yang tinggi. Garam amonium sulfat yang terdapat pada sampel dapat dihilangkan melalui proses dialisis menggunakan larutan *buffer* dengan membran selofan. Sebelum digunakan dalam proses dialisis, membran selofan direbus ke dalam larutan EDTA dalam sodium karbonat untuk menghindari kontaminasi selama proses pabrikan. *Buffer* yang digunakan berupa *buffer* fosfat dengan pH 7, dimana proses dialisis dilakukan pada suhu dingin selama 12 jam. Penggunaan *buffer* fosfat bertujuan untuk mlarutkan protein.

Prinsip dialisis yaitu difusi, dimana zat terlarut dari larutan yang berkonsentrasi tinggi berpindah ke larutan yang memiliki konsentrasi lebih rendah. Tahap pertama dialisis adalah keluarnya garam dari membran karena konsentrasi *buffer* di dalam membran lebih tinggi daripada diluar membran dan terjadi kondisi keseimbangan dimana konsentrasi diluar dan didalam membran sama. Proses dialisis dilakukan dengan memasukkan protein yang sudah

dilarutkan dengan buffer fosfat 0,5 M ke dalam membran selofan dan merendamnya dalam larutan buffer fosfat 0,2 M. Pengoptimalan keluarnya amonium sulfat dari membran yaitu proses dialisis dilakukan beserta dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Ketika dialisis, terjadi proses pemisahan molekul berdasarkan ukuran molekul melalui pori membran selofan (Voet dan Judith, 1995).

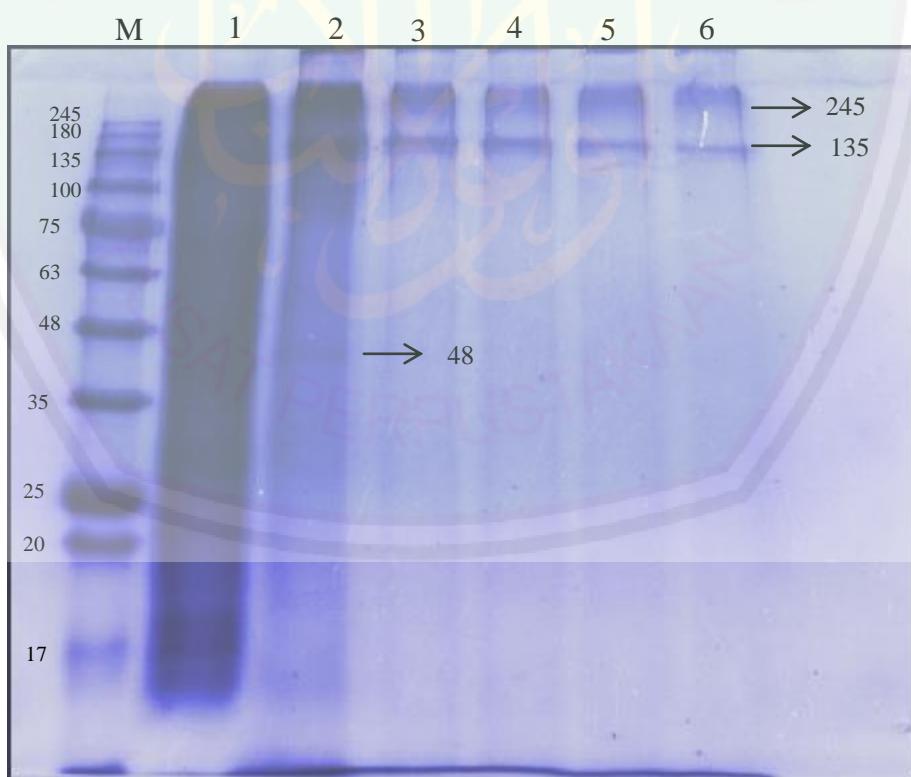
4.4 Karakterisasi Profil Protein Gelatin menggunakan SDS-PAGE

Gelatin merupakan polimer yang memiliki berat molekul besar. Berat molekul termasuk variabel penting karena berhubungan dengan sifat kimia polimer (Cowd, 1991). Analisis dilakukan dengan membandingkan pita pemisahan protein gelatin sebelum dan sesudah dimurnikan dengan protein standar. Hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Berdasarkan Gambar 4.3 gelatin tulang ayam memiliki 3 pita utama, yakni 2 α -chains pada pita protein ~135 kDa (α_1 berada diatas dan α_2 berada dibawah) dan β -chain yang merupakan *dimer* dari α -chains yakni pada pita protein ~245 kDa. Sampel gelatin setelah proses pemurnian menggunakan amonium sulfat, menunjukkan perbedaan pada pita protein. Sampel gelatin sebelum dimurnikan memiliki pita protein pada ~245, ~135 dan ~48 kDa. Sampel gelatin setelah dimurnikan memiliki pita protein ~245 dan ~135 kDa dan tidak terdapat pita protein pada ~48 kDa.

Pemurnian gelatin menggunakan variasi konsentrasi amonium sulfat dilakukan untuk melihat hasil pemisahan terbaik. Pada konsentrasi amonium sulfat 40, 50, 60 dan 70% menunjukkan 3 pita utama yang memiliki pola pita

sama, yakni 2 α -chains pada pita protein ~135 kDa (α_1 berada diatas dan α_2 berada dibawah) dan β -chain pada pita protein ~245 kDa (Gambar 4.1). Semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat intensitas pita protein semakin tipis. Sehingga variasi konsentrasi amonium sulfat terbaik pada variasi 40% dikarenakan intensitas pita protein yang dihasilkan lebih tebal dibandingkan dengan variasi konsentrasi amonium sulfat yang lain. Tanjung dan Kusnadi (2014) menyatakan bahwa intensitas pita atau tebal dan tipisnya pita protein yang muncul menunjukkan konsentrasi protein pada suatu sampel. Semakin tebal pita maka konsentrasi protein semakin tinggi dan apabila pita semakin tipis maka konsentrasi semakin rendah.



Gambar 4.3 Hasil pemisahan gelatin komersial sapi dan gelatin tulang ayam. Keterangan: M = protein marker, 1 = gelatin komersial sapi, 2 = ekstrak kasar gelatin tulang ayam, 3 = pemurnian 40%, 4 = pemurnian 50%, 5 = pemurnian 60% dan 6 = pemurnian 70%

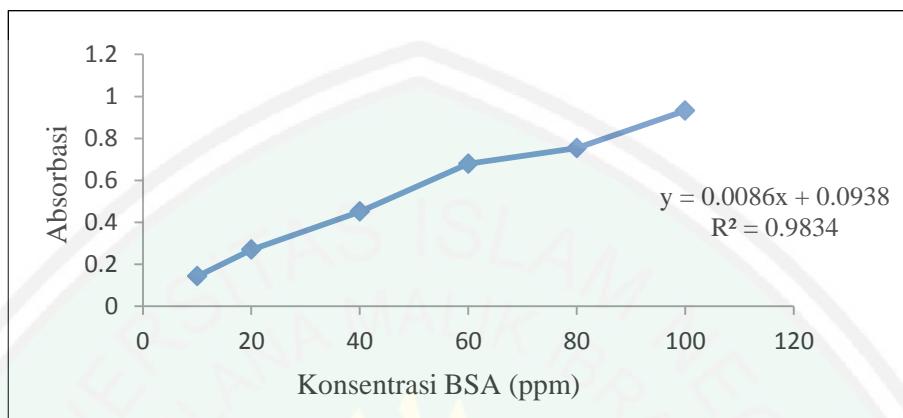
Berdasarkan hasil penelitian ini dapat dikatakan bahwa SDS-PAGE dapat digunakan sebagai metode untuk membedakan bahan dasar gelatin melalui pola pemisahan proteininya. Du, dkk. (2013) menyatakan bahwa gelatin babi memiliki pita protein sekitar 20-100 kDa. Hafidz dan Yakoob (2011) menyatakan bahwa pada gelatin sapi memiliki pita protein sekitar 100-220 kDa. Pada gelatin tulang ayam hasil penelitian, pita protein paling sekitar 48-245 kDa. Chiou, dkk. (2006) menyatakan bahwa pada gelatin tulang ikan memiliki pita protein sekitar 66-240 kDa.

4.5 Penentuan Kadar Protein menggunakan Metode Lowry

Kadar protein sampel gelatin ditentukan dengan metode Lowry. Pada metode ini terjadi 2 reaksi. Pertama, kompleks Cu^{2+} dengan protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret, ketika kondisi basa Cu^{2+} akan tereduksi menjadi Cu^+ . Selanjutnya reaksi kedua, reagen *Folin-Ciocalteu* (kompleks *phosphomolibdat phosphotungstat*) akan direduksi oleh ion Cu^+ menghasilkan *heteropoly molybdenum blue* disebabkan karena reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu yang memberikan warna biru intensif. Reaksi antara protein dan reagen Lowry berlangsung sempurna ketika terjadi perubahan warna larutan dari bening membentuk senyawa kompleks berwarna biru.

Pengukuran kadar protein dalam penelitian ini terdiri dari 3 tahap, yakni penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan kurva standar dan pengukuran kadar protein sampel gelatin sebelum dan sesudah dimurnikan. Tahap penentuan panjang gelombang maksimum λ_{maks} bertujuan untuk mengetahui

serapan maksimum protein pada kisaran panjang gelombang 400-800 nm (Lampiran 4.). Tahap selanjutnya yaitu pembuatan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Grafik kurva standar BSA

Kadar protein sampel gelatin sebelum dan sesudah dimurnikan diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi. Absorbansi yang dihasilkan dimasukkan kedalam persamaan regresi linier kurva standar yang didapatkan dari tahap sebelumnya. Berdasarkan hasil penelitian, sebelum dimurnikan kadar protein gelatin ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kadar protein gelatin sebelum dimurnikan

Sampel	Kadar Protein (ppm)
E1	71,65 ± 0,59
E2	61,03 ± 0,48
E3	57,01 ± 1,34
Gelatin Komersial	150,9 ± 2,98

Berdasarkan Tabel 4.1, menunjukkan bahwa kadar protein yang paling rendah pada ekstraksi ketiga pada suhu 75°C (E3) sebesar 57,01 ppm, sedangkan kadar protein yang paling tinggi pada ekstraksi pertama pada suhu 55°C (E1)

sebesar 71,65 ppm. Nilai kadar protein yang dihasilkan pada penelitian ini mengalami penurunan, karena gelatin diperoleh dari hasil ekstraksi bertingkat. Ekstraksi bertingkat dilakukan secara berturut-turut, yang dimulai dari suhu rendah 55°C-75°C. Sampel gelatin hasil ekstraksi pertama (E1) inilah yang digunakan untuk tahap purifikasi karena memiliki kadar protein tertinggi. Hasil uji kadar protein gelatin setelah purifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Kadar protein gelatin setelah purifikasi menggunakan variasi konsentrasi amonium sulfat

Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat	Konsentrasi (ppm)
40%	61,42 ± 3,90
50%	60,45 ± 1,35
60%	59,89 ± 0,23
70%	55,32 ± 1,05

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa kadar protein gelatin paling tinggi pada variasi konsentrasi amonium sulfat 40% sebesar 61,42 ppm, sedangkan kadar protein paling rendah pada variasi konsentrai amonium sulfat 70% sebesar 55,32 ppm. Pada gelatin komersial didapatkan kadar protein sebesar 150,9 ppm.

4.5 Gelatin dalam Perspektif Islam

Hikmah dari penelitian ini adalah dapat membedakan profil protein dari ayam, sapi, ikan, serta babi. Dengan membandingkan pola pemisahan pita protein dari masing-masing sampel tersebut, maka dapat diketahui sumber gelatin yang digunakan. Seperti yang dijelaskan dalam Q.S. ali-Imran ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاحْتِلْفُ أَلَيْلٌ وَالنَّهَارٌ لَعَلَيْتَ لَا أُلَيْلٌ أَلَّا لَبِبٌ ﴿١٩٥﴾ إِنَّ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ
اللَّهَ قِيمًا وَقُعُودًا وَعَلَى جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بُطْلًا
سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩٦﴾

“Sesungguhnya, dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang, terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk, atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), ‘Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka.’”

Berdasarkan Q.S. ali-Imran ayat 190-191, manusia diperintahkan untuk berfikir dan belajar, sehingga dalam penelitian ini akan diketahui gelatin berasal dari sumber bahan dasar haram ataupun halal. Perintah untuk memakan makanan yang baik dan halal ini dijelaskan dalam Q.S. al-Baqarah ayat 168 dan Q.S. al-Maidah ayat 88 seperti yang dijelaskan pada bab sebelumnya.

Pada penelitian ini, sampel gelatin dari tulang ayam merupakan bahan tambahan pangan yang baik dan halal. Makanan bergizi tinggi yang baik untuk tubuh sangat dianjurkan untuk dikonsumsi dalam agama islam, makanan seperti ini dikategorikan sebagai makanan yang *thayyib* (baik). Makanan halal adalah makanan yang diperbolehkan oleh agama dari segi hukumnya.

Menurut Shihab (2002) makanan yang memiliki gizi yang cukup dan seimbang, lezat, baik serta proporsional dan tidak berlebihan adalah makanan *thayyib*. Ayat tersebut juga menjelaskan bahwa Allah SWT melarang umat manusia mengkonsumsi makanan yang sebaliknya, yaitu makanan haram. Mengkonsumsi makanan haram sama dengan mengikuti langkah-langkah syaitan yang menjadi musuh nyata manusia.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemisahan protein gelatin tulang ayam Broiler (*Gallus domestica*) dengan variasi konsentrasi amonium sulfat tidak mempengaruhi pola pita protein. Semua sampel gelatin memiliki 3 pita *major* yakni 2 α -chains pada pita protein ~135 kDa (α_1 berada diatas dan α_2 berada dibawah) dan β -chain pada pita protein ~245 kDa.
2. Kadar protein gelatin E1, E2 dan E3 sebelum dimurnikan berturut-turut sebesar 71,65; 61,03 dan 57,01 ppm. Kadar protein gelatin setelah dimurnikan dengan variasi konsentrasi amonium sulfat 40, 50, 60 dan 70% berturut-turut sebesar 61,42; 60,45; 59,89 dan 55,32 ppm.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) untuk mengetahui urutan asam amino pada sampel gelatin.
2. Marker protein yang digunakan harus memiliki berat molekul lebih dari 245 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- Aina, M. A., Amin, I., R. M. Hafidz dan Yakoob. 2013. Identification Polypeptide Biomarkers of Porcine Skin Gelatine by Two-Dimensional Electrophoresis. *International Food Research Journal.* 20(3): 1395-1399.
- Asker, M. M. S., M. G. Mahmoud, K. E. Shebwy dan M. S. A. el Aziz. 2013. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 11(2), 103–109.
- Aulanni’am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Malang: Citra Mentari Grup.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia: Teknik Penelitian*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Bio-rad. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection Part I : Theory and Product Selection Part II : Methods Part III : Troubleshooting Part IV : Appendices. (n.d.).
- Chaplin M. F. dan Bucke. 1990. *Natural Product Isolation*. New Jersey: Humana Press.
- Chiou, B.-S., R. J. A. Bustillos, J. Shey, E. Yee, P. J. Bechtel, S. H. Imam, G. M. Glenn dan W. J. Orts. 2006. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. *Polymer.* 47(18), 6379–6386.
- Cowd, M.A. 1991. *Kimia Polimer*. Diterjemahkan oleh J.G. Stark. Bandung: Penerbit ITB.
- DEPAG RI [Departemen Agama Republik Indonesia. 1990. *Al-Qur'an dan Tafsirnya*. Jakarta: Departemen Agama Republik Indonesia.
- Du, L., Z. Khiari, Z. Pietrasik, dan M. Betti. 2013. Physicochemical and functional properties of gelatins extracted from turkey and chicken heads. *Poultry Science.* (92), 2463–2474.
- Fatchiyah, E.L. Arumingtyas, S. Widjarti dan S. Rahayu. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Findianti, Y. 2013. Pengaruh Konsentrasi Asam Asetat dan Lama Perendaman (Demineralisasi) terhadap Kualitas Gelatin Tulang Ayam Kampung. (*Gallus Domesticus*). *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Gilsenan, P. M., dan S. B. R. Murphy. 2000. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids.* 14(3), 191–195.

- GME. 2009. Gelatin Manufactures of Europe. www.gelatine.org.
- Grabski, A. C., dan R. R. Burgess, 2001. Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips. *inNovations*. 13, 10–12.
- Hafidz, R. M, dan Yaakob. 2011. Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal*. 817, 813–817.
- Handayani, N. R. R. 2010. Kualitas Berbagai Produk VCO (VIRgin COconut Oil) ditinjau dari Kadar Protein dan Logam. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta.
- Hastuti, D. dan S. Iriane. 2007. Pengenalan Dan Proses Pembuatan Gelatin. 3(1), 39–48.
- Hemes, B. D. 1998. *Gel Electrophoresis of Proteins*. New York: Oxford University Press.
- Jannah, A. 2008. *Gelatin*. Malang: UIN Press.
- Karim, A. A. dan R. Bhat. 2009. Ulasan Gelatin Ikan : Properti. Tantangan. dan Prospek Sebagai Sebuah Alternatif Untuk Mamalia Gelatin. *Tren Ilmu Pangan dan Teknologi*. 19 : 644-656.
- Kristanti, N. D. 2001. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Lipase Ekstraseluler dari Kapang r. Oryzae TR 32. *Tesis*. Bogor: Program Pascasarjana Ilmu Pangan, Institut Pertanian Bogor.
- Lowry, O. H., N. J., A. L. Rosebrough, Farr, dan R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193-265.
- Mohtar, N. F., C. Perera, dan S. Y. Quek. 2010. Optimisation of gelatine extraction from hoki (*Macruronus novaezealandiae*) skins and measurement of gel strength and SDS-PAGE. *Food Chemistry*. 122(1), 307–313.
- Mufidah, Z. 2013. Isolasi Gelatin Menggunakan Pelarut Asam Sitrat Dari Tulang Ayam Broiler dengan Variasi Konsentrasi dan Lama Perendaman. *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Praira, W. 2008. Identifikasi Gelatin Dalam Beberapa Obat Bentuk Sediaan Tablet Menggunakan Metode Spektrofotometri. *Skripsi*. Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Purwanto, M. G. M. 2014. Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible. *Jurnal Ilmiah Sains dan*

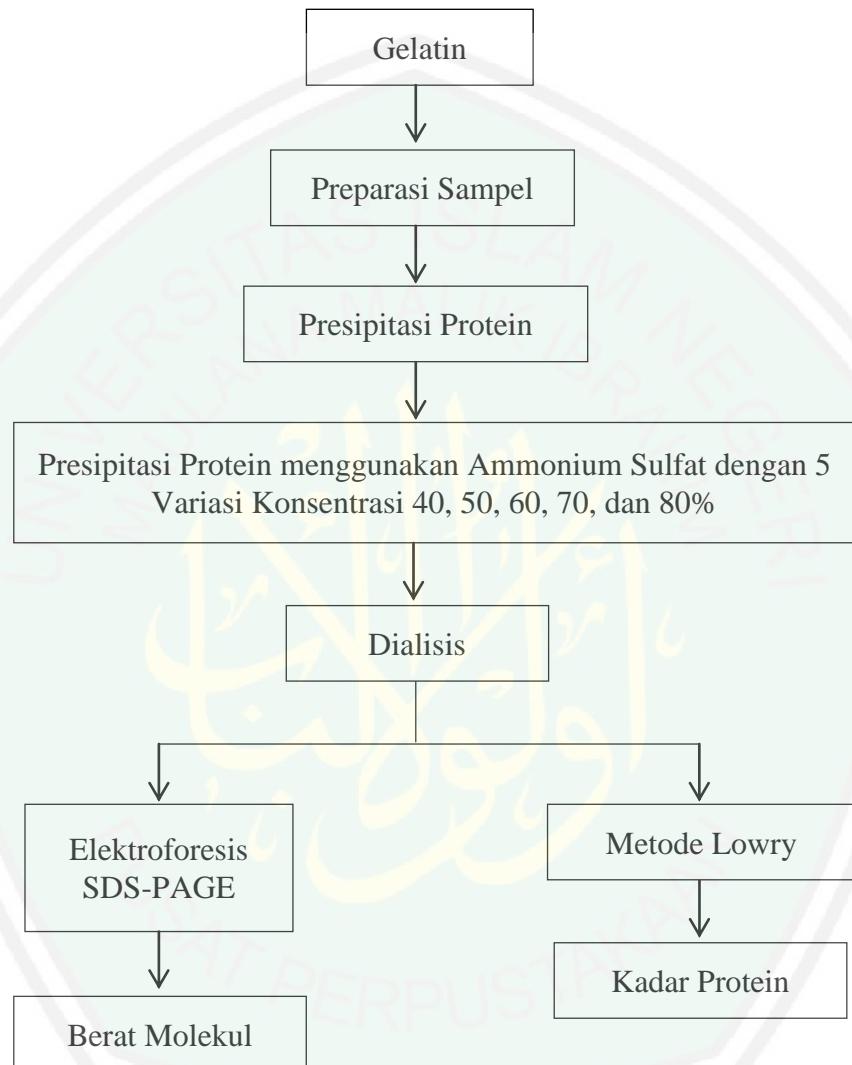
- Teknologi.* 7(2): 64-71.
- Raharja, K. 2004. *Manfaat Gelatin Tulang Pari (1)*. Yogyakarta: Kedaulatan Rakyat.
- Riyanto, I. 2006. Analisis Kadar, Daya Cerna dan Karakteristik Protein Daging Ayam Kampung Dan Hasil Olahannya. *Skripsi*. Program Studi Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.
- Scopes, R. K. 1982. *Protein Purification Principal and Practice*. Edisi ke-2. New Yorg: Springer Verlag.
- Schrieber, R., dan H. Gareis 2007. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sompie, M., S. Triatmojo, A. Pertiwiningrum dan Y. Pranoto. 2012. Pengaruh Umur Potong dan Konsentrasi Larutan Asam Asetat terhadap Sifat Fisika dan Kimia Gelatin Kulit Babi. Yogyakarta: Fakultas Peternakan UGM.
- Suhartono M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB.
- Tanjung, Y. L. R. dan J. Kusnadi. 2014. Biskuit Bebas Gluten dan Bebas Kasein Bagi Penderita Autis. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(1): 11-12.
- Venien, A., dan D. Levieux. 2005. Differentiation of bovine from porcine gelatines using polyclonal anti-peptide antibodies in indirect and competitive indirect ELISA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39(3–4), 418–424.
- Voet D. dan G. V. Judith. 1995. *Biochemistry 2nd edition*. USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 795-822.
- Wardani, A. K., dan O. L. Nindita. 2012. Purification and Characterization of Protease from Protease-producing Bacteria Isolated from Tofu Whey. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 13(3), 149–156.
- Westermeier. 2004. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons inc.
- Wiratmaja, H. 2006. Perbaikan nilai tambah limbah tulang ikan tuna (*thunnus sp*) menjadi gelatin serta analisis fisika-kimia. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Zhao, M., M. Cai, F.Wu, Y. Zhang, Z. Xiong dan P. Xu. 2016. Recombinant expression, refolding, purification and characterization of Pseudomonas

- aeruginosa protease IV in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*. 126, 69–76.
- Zhou, P. dan J. M. Regenstein. 2006. Determination of Total Protein Content in Gelatin Solutions with the Lowry or Biuret Assay, 71(8).



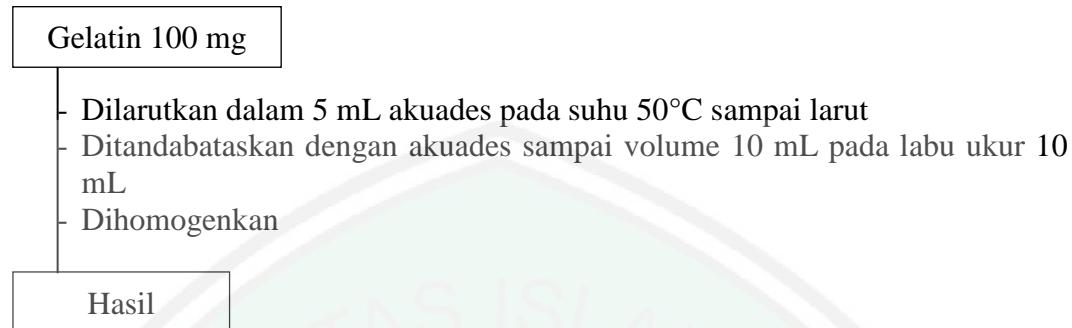
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



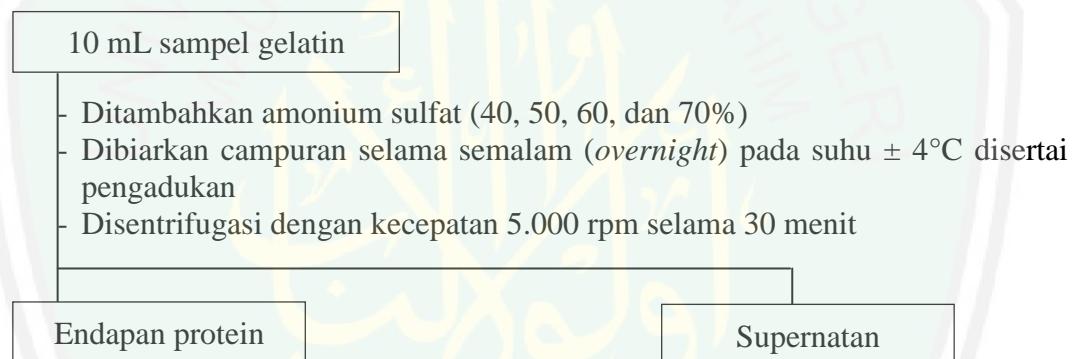
Lampiran 2. Skema Kerja

1. Preparasi Sampel

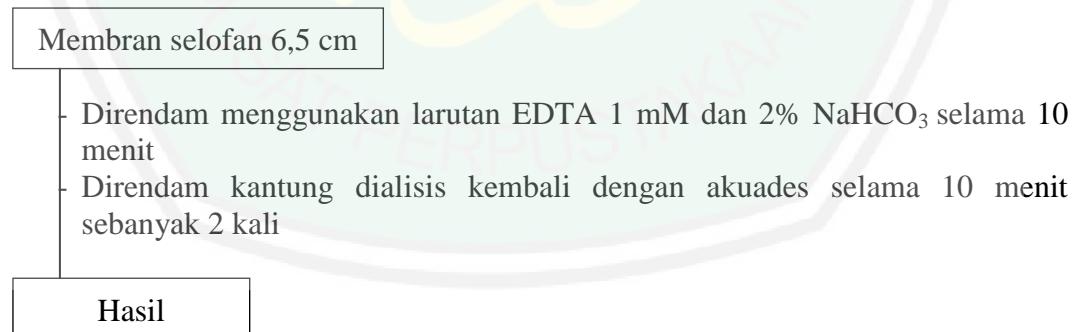


2. Purifikasi Protein

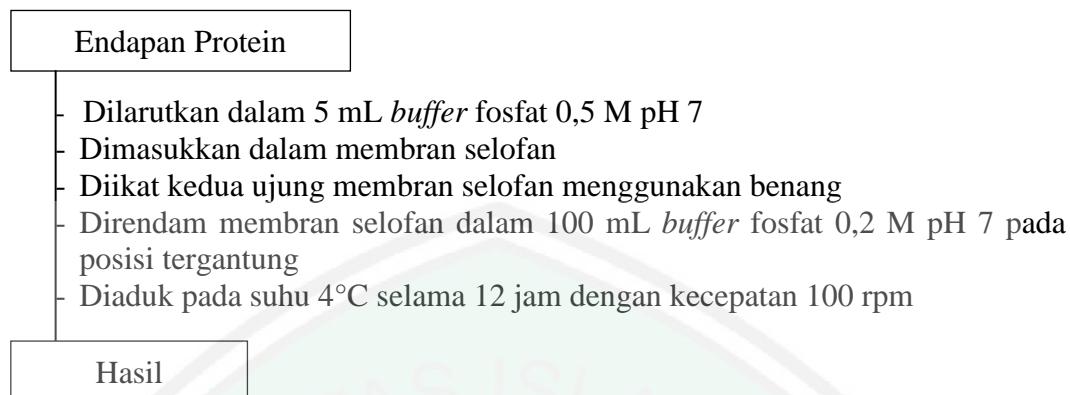
a. Presipitasi Protein menggunakan Amonium Sulfat



b. Preparasi

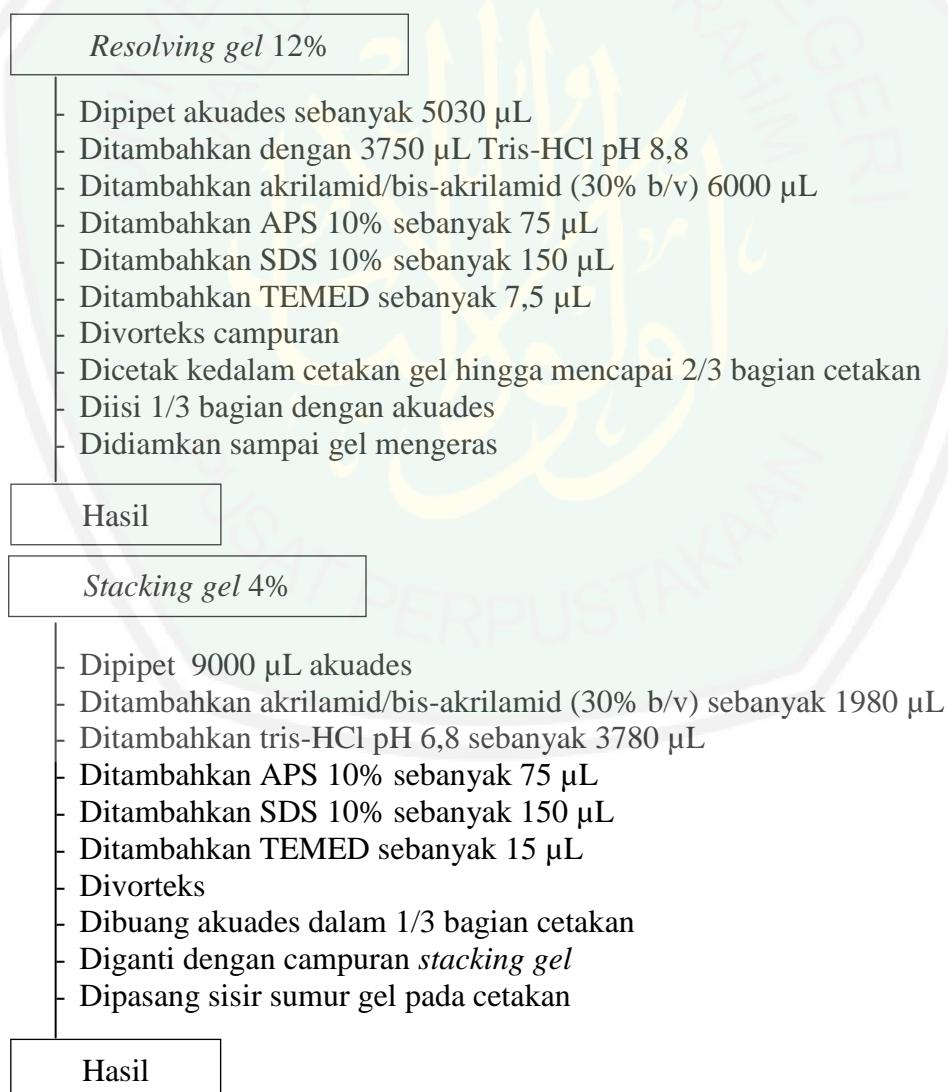


c. Dialisis

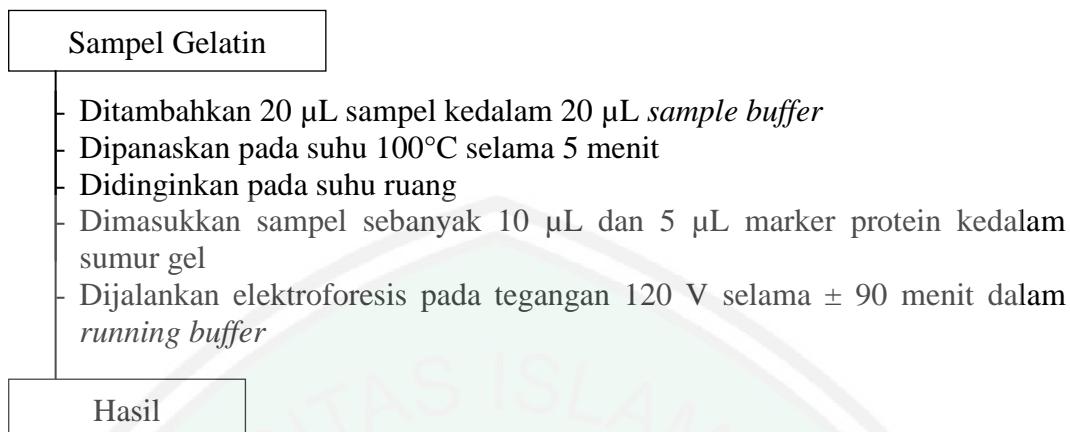


3. Karakterisasi Profil Protein menggunakan SDS-PAGE

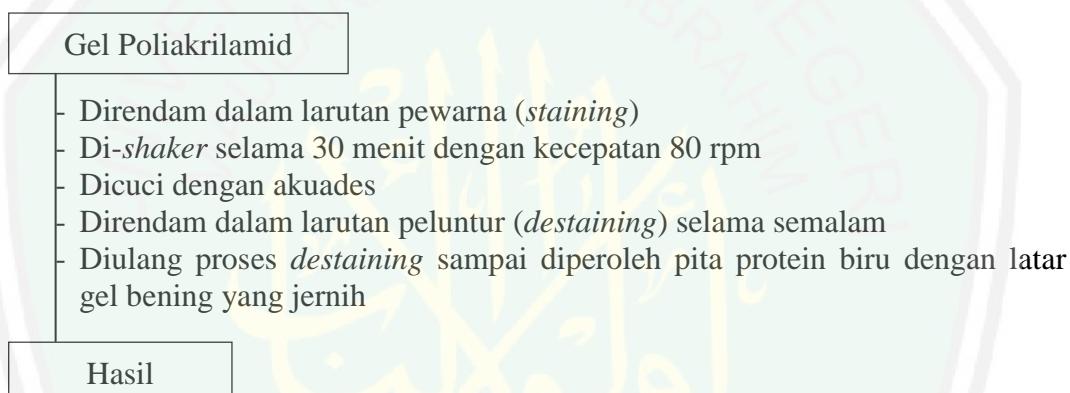
a. Pembuatan Gel SDS-PAGE



b. Preparasi dan *Running Sampel*

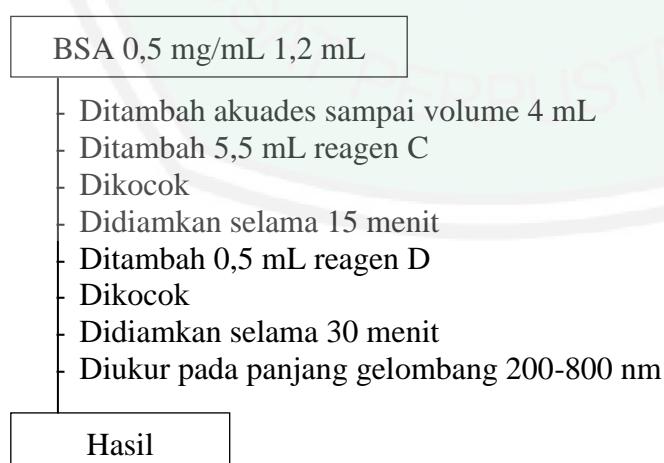


c. Pewarnaan dan Pelunturan Gel



4. Penentuan Kadar Protein Gelatin menggunakan Metode Lowry

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum



b. Pembuatan Larutan Standar

BSA 0,5 mg/mL

- Dimasukkan kedalam 7 tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 dan 0,1 mg/mL
- Ditambahkan akuades sampai volume total 4 mL
- Ditambahkan 5,5 mL reagen C
- Dikocok
- Didiamkan selama 15 menit
- Ditambahkan 0,5 mL reagen D
- Dikocok
- Didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang sampai larutan berwarna kebiruan
- Diukur absorbansi larutan pada $\lambda = 654$ nm

Hasil

c. Penentuan Kadar Protein

Larutan Gelatin 1 mL

- Ditambahkan 3 mL akuades
- Ditambahkan 5,5 reagen C
- Dikocok
- Didiamkan selama 15 menit
- Ditambahkan 0,5 mL reagen D
- Dikocok
- Didiamkan selama 30 menit
- Diukur absorbansi pada $\lambda = 654$ nm

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

1. Penentuan Penambahan Amonium Sulfat

Tabel L.3.1 Penambahan ammonium sulfat

Konsentrasi	Persen larutan pada 0 °C																	
Awal	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
amonium sulfat	Amonium sulfat (g) untuk 1 L larutan																	
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	425	493	536	581	627	
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279	
65										0	31	63	97	132	168	205	244	
70											0	32	65	99	134	171	209	
75												0	32	66	101	137	174	
80													0	33	67	103	139	
85														0	34	68	105	
90															0	34	70	
95																0	35	
100																	0	

Pembuatan Konsentrasi Amonium Sulfat 40% dalam 50 mL

$$\text{sebanyak} = \frac{226 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}} \times 10 \text{ mL} = 2,26 \text{ gr}$$

Tabel L.3.2 Penambahan ammonium sulfat pada tiap konsentrasi

Konsentrasi Amonium Sulfat (%)	Massa Amonium Sulfat (gram)
40	2,26
50	2,91
60	3,61
70	4,36

2. Pembuatan Larutan Stok *Buffer Fosfat 1 M*

a. Larutan NaH₂PO₄ 1 M

$$M = \frac{n}{V}$$

$$1 \text{ M} = \frac{n}{0,025 \text{ L}}$$

$$n = 1 \text{ M} \times 0,025 \text{ L}$$

$$n = 0,025 \text{ mol}$$

$$n = \frac{\text{massa}}{\text{Mr}}$$

$$0,025 \text{ mol} = \frac{\text{massa}}{120 \text{ gr/mol}}$$

$$\text{massa} = 0,025 \text{ mol} \times 120 \text{ gr/mol}$$

$$\text{massa} = 3 \text{ gram}$$

Untuk membuat larutan NaH₂PO₄ 1 M diperlukan 3 gram NaH₂PO₄ dilarutkan dengan akuades dan ditandabataskan dalam labu ukur 25 mL.

b. Larutan Na₂HPO₄ 1 M

$$M = \frac{n}{V}$$

$$1 \text{ M} = \frac{n}{0,025 \text{ L}}$$

$$n = 1 \text{ M} \times 0,025 \text{ L}$$

$$n = 0,025 \text{ mol}$$

$$n = \frac{\text{massa}}{\text{Mr}}$$

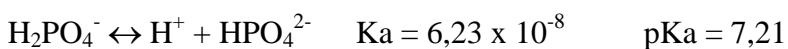
$$0,025 \text{ mol} = \frac{\text{massa}}{142}$$

$$\text{massa} = 0,025 \text{ mol} \times 142 \frac{\text{gr}}{\text{mol}}$$

$$\text{massa} = 3,55 \text{ gram}$$

Untuk membuat larutan Na₂HPO₄ 1 M diperlukan 3,55 gram Na₂HPO₄ dilarutkan dengan akuades dan ditandabataskan dalam labu ukur 25 mL.

3. Pembuatan Larutan *Buffer Fosfat 1 M*



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$K_a = [\text{H}^+] \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$\begin{aligned}
 -\log K_a &= -\log [H^+] - \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} & \text{antilog } -0,21 = \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \\
 pK_a &= pH - \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} & 0,678 = \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \\
 pH &= pK_a + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} & 0,678 = \frac{x}{5-x} \\
 7 &= 7,21 + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} & 0,678x = 5 - x \\
 -0,21 &= \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} & 1,678x = 5 \\
 && x = 2,98 \text{ mL} \rightarrow H_2PO_4^- = NaH_2PO_4 \\
 && 5 - 2,98 = 2,02 \text{ mL} \rightarrow Na_2HPO_4
 \end{aligned}$$

Untuk membuat larutan buffer fosfat 1 M pH 7 diperlukan 2,98 mL NaH₂PO₄ dicampurkan dengan 2,02 mL Na₂HPO₄ sehingga volume total sebanyak 5 mL.

4. Pembuatan Larutan Buffer Fosfat 0,5 M pH 7

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1M = 20 \text{ mL} \times 0,5M$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

Dilarutkan 10 mL larutan stok dengan akuades sampai volumenya 20 mL dan diatur pHnya.

5. Pembuatan Larutan Standar BSA

- a. Larutan stok BSA 0,5 mg/mL

Sebanyak 50 mg BSA dilarutkan dalam 100 mL akuades.

- b. BSA 0,1 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 0,5 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

Jadi, 2 mL BSA 0,5 mg/mL diencerkan sampai volume 10 mL

Tabel L.3.3 Penambahan BSA pada tiap konsentrasi

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Volume (mL)
0	0
0,01	0,2
0,02	0,4
0,04	0,8
0,06	1,2
0,08	1,6
0,10	2,0

6. Pembuatan Reagen Lowry

a. Pembuatan larutan NaOH 0,1 N.

0,4 gram NaOH dilarutkan dengan akuades sampai dengan volume 100 mL.

b. Pembuatan larutan Na₂CO₃ 2% dalam NaOH 0,1 N.

Na₂CO₃ sebanyak 2 gram dilarutkan dalam NaOH 0,1 N sampai dengan volume 100 mL.

Larutan ini dinamakan **Reagen A**.

c. Pembuatan larutan KNa-Tatrat 1%.

0,1 gram KNa-Tatrat dilarutkan dengan akuades sampai dengan volume 1 mL.

d. Pembuatan larutan CuSO₄ 0,5% dalam KNa-Tatrat 1%.

CuSO₄ sebanyak 0,05 gram dilarutkan dengan Kna-Tatrat 1% sampai dengan volume 10 mL.

Larutan ini dinamakan **Reagen B**.

e. Pembuatan **Reagen C.**

Reagen A sebanyak 100 mL dicampur dengan reagen B sebanyak 2 mL kemudian dihomogenkan.

f. Pembuatan **Reagen D.**

Larutan folin dicampur dengan akuades dengan perbandingan 1:1 kemudian dihomogenkan.

7. Pembuatan Reagen SDS-PAGE

a. Akrilamid/bis-akrilamid (30% b/v)

Akrilamid sebanyak 87,60 gram ditambah N’N’-bis-methlene-acrylamide sebanyak 2,40 gram dan dilarutkan dalam akuades sampai volume 300 mL. Simpan pada suhu 4°C.

b. 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Tris base sebanyak 27,23 gram dilarutkan dalam akuades ± 80 mL. pH diatur sampai 8,8 dengan HCl 6 N. Akuades ditambahkan sampai dengan volume 150 mL. Simpan pada suhu 4°C.

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

Tris base sebanyak 6 gram dilarutkan dalam akuades ± 60 mL. pH diatur sampai 6,87 dengan HCl 6 N. Akuades ditambahkan sampai dengan volume 100 mL. Simpan pada suhu 4°C.

d. Larutan SDS 10%

10 gram SDS dilarutkan dalam akuades lalu ditandabataskan sampai 100 mL.

e. Larutan *Running Buffer* pH 8,3 10x

Tris base sebanyak 30,30 gram ditambah glisin 144,10 gram, selanjutnya ditambah SDS sebanyak 10 gram. Dilarutkan semua bahan dalam akuades sampai volume 1 liter.

f. 1% *Bromophenol blue*

Bromophenol blue sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 10 mL akuades.

g. *Sample Buffer*

Tabel L.3.4 Komposisi *sample buffer*

Bahan	Volume (mL)
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	3,75
50% gliserol	15
1% <i>Bromophenol blue</i>	0,3
10% SDS	6
Akuades	30

Ditambah β -mercaptoethanol (50 μ L untuk 950 μ L *sample buffer*) sebelum digunakan

h. 10% APS

Ammonium persulfat sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 1 mL akuades.

i. Larutan Staining

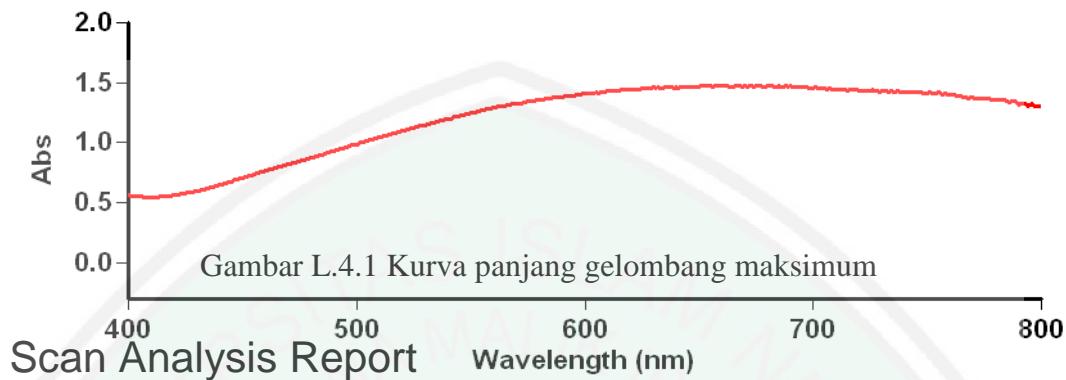
Commassie brilliant blue sebanyak 0,25 gram ditambah dengan metanol absolut dan asam asetat glasial masing-masing sebanyak 45,4 mL dan 9,2 mL, kemudian diencerkan dengan akuades sampai volume 100 mL.

j. Larutan Destaining

Tabel L.3.5 Komposisi larutan destaining

Bahan	Volume (mL)
Metanol	25
Asam asetat	10
Akuades	65

Lampiran 4. Kurva Panjang Gelombang Maksimum Spektrofotometer UV-Vis



Report Time : Tue 19 Sep 10:35:05 AM 2017

Method:

Batch: D:\Dhienda Risa\Lamdha Maks Protein Gelatin (19-09-2017).DSW

Software version: 3.00 (339)

Operator: Rika

Sample Name: Protein Gelatin

Collection Time 9/19/2017 10:35:31 AM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

0.0100

800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
796.0	1.322
788.1	1.351
755.0	1.419
751.0	1.424
681.0	1.480
666.1	1.480
662.0	1.480
654.0	1.478
638.1	1.465
630.0	1.461
334.0	10.000
331.0	10.000
250.0	10.000
247.9	10.000
237.9	10.000
221.0	10.000
218.0	10.000

Lampiran 5. Hasil Analisis Kadar Protein menggunakan Metode Lowry

a. Pembuatan larutan stok BSA

$$\text{BSA} = \frac{50 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = 0,5 \text{ mg/ml}$$

Konsentrasi mg/ml dikonversikan menjadi ppm

$$0,5 \text{ mg/ml} = 0,5 \text{ mg}/10^{-3} \text{ liter} = 500 \text{ ppm}$$

b. Pembuatan kurva standart

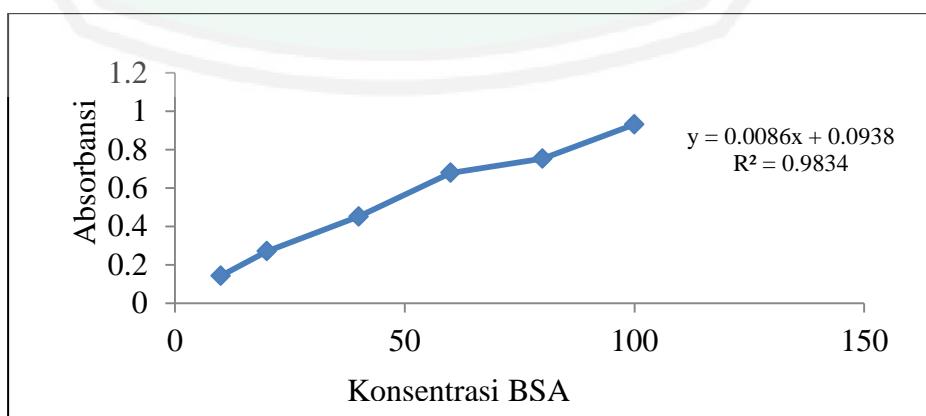
- Diambil BSA sesuai dengan konsentrasi (konsentrasi mg/ml dikonversikan menjadi ppm)
 - 0,01 mg/mL

$$0,01 \text{ mg/mL} = 0,01 \text{ mg}/10^{-3} \text{ liter}$$

$$10 \text{ mg/L} = 10 \text{ ppm}$$

Tabel L.5.1 Konsentrasi kurva standar

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
10	0,1427
20	0,2697
40	0,4507
60	0,6785
80	0,7532
100	0,9314



Gambar L.5.1 Kurva standar BSA

Perhitungan konsentrasi gelatin sebelum dimurnikan

- E1 Ulangan 1

$$y = 0,0086x + 0,0938$$

$$0,7158 = 0,0086x + 0,0938$$

$$0,7158 - 0,0938 = 0,0086x$$

$$0,622 = 0,0086x$$

$$72,3256 \text{ ppm} = x$$

Tabel L.5.2 Konsentrasi gelatin sebelum dimurnikan

Sampel	Absorbansi			Konsentrasi (ppm)			Rata-rata
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	
E1	0,716	0,708	0,706	72,33	71,41	71,21	71,65 ± 0,596
E2	0,623	0,615	0,618	61,57	60,62	60,90	61,03 ± 0,488
E3	0,572	0,586	0,594	55,55	57,28	58,19	57,01 ± 1,341
Gelatin Komersial	1,373	1,421	1,381	148,7	154,3	149,7	150,9 ± 2,987

Perhitungan konsentrasi gelatin setelah dimurnikan

- Konsentrasi amonium sulfat 40%

$$y = 0,0086x + 0,0938$$

$$0,5839 = 0,0086x + 0,0938$$

$$0,5839 - 0,0938 = 0,0086x$$

$$0,4901 = 0,0086x$$

$$56,9884 \text{ ppm} = x$$

Tabel L.5.3 Konsentrasi gelatin setelah dimurnikan

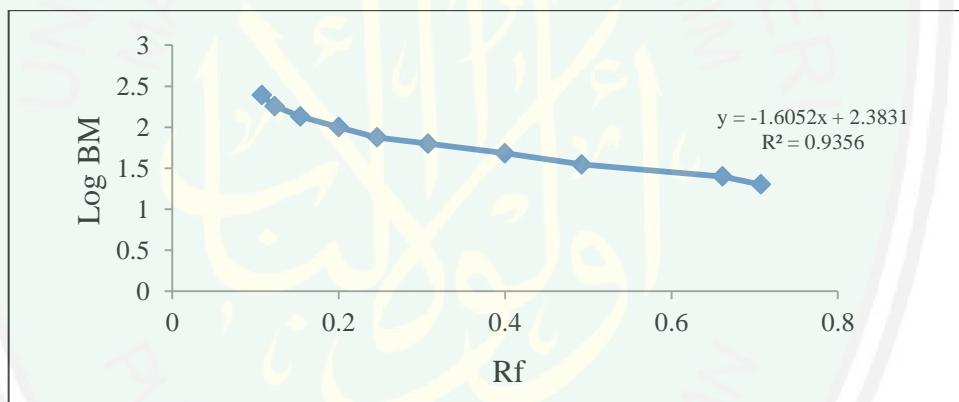
Sampel	Absorbansi			Konsentrasi (ppm)			Rata-rata
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	
40%	0,584	0,635	0,647	56,99	62,93	64,35	61,42 ± 3,904
50%	0,615	0,624	0,601	60,65	61,69	59,00	60,45 ± 1,356
60%	0,611	0,609	0,607	60,14	59,86	59,67	59,89 ± 0,236
70%	0,574	0,575	0,559	55,86	56,00	54,11	55,32 ± 1,053

Lampiran 6. Data Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

Tabel L.6.1 Marker protein (1)

No.	BM	Log BM	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf
1.	245	2,3892	6,5	0,7	0,1077
2.	180	2,2553	6,5	0,8	0,1231
3.	135	2,1303	6,5	1	0,1538
4.	100	2	6,5	1,3	0,2
5.	75	1,8751	6,5	1,6	0,2462
6.	63	1,7993	6,5	2	0,3077
7.	48	1,6912	6,5	2,6	0,4
8.	35	1,5441	6,5	3,2	0,4923
9.	25	1,3979	6,5	4,3	0,6615
10.	20	1,301	6,5	4,6	0,7077

Persamaan regresi linier sebagai berikut:



Gambar L.6.1 Kurva persamaan regresi marker protein (1)

Tabel L.6.2 Berat molekul sampel gelatin (1)

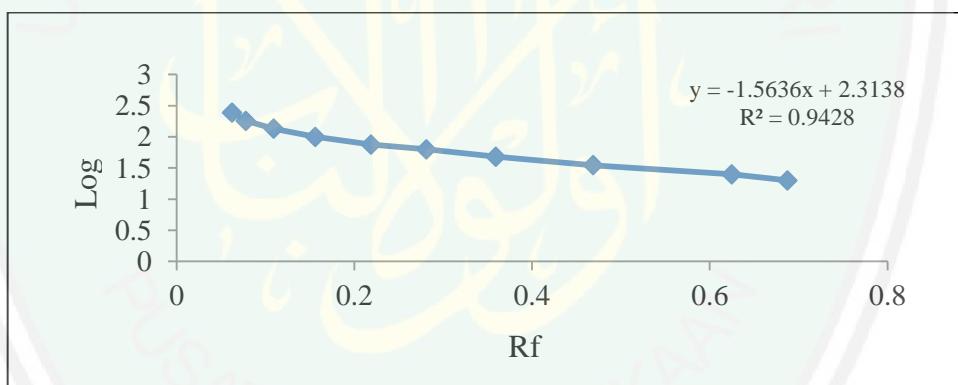
No.	Sampel	Pita ke-	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf	Log BM	BM
1.	E ₁	1	6,5	0,5	0,0769	2,2597	182
		2	6,5	0,8	0,1231	2,1855	153
		3	6,5	1	0,1538	2,1362	137
2.	40%	1	6,5	0,8	0,1231	2,1855	153
3.	50%	1	6,5	0,8	0,1231	2,1855	153
4.	60%	1	6,5	0,8	0,1231	2,1855	153
5.	70%	1	6,5	0,8	0,1231	2,1855	153
6.	Gelatin komersial	1	6,5	0,5	0,0769	2,2597	182
		2	6,5	1	0,1538	2,1362	137
		3	6,5	2,1	0,3231	1,8645	73
		4	6,5	2,4	0,3692	1,7905	62
		5	6,5	2,6	0,4	1,7410	55

6	6,5	3,1	0,4769	1,6176	41
---	-----	-----	--------	--------	----

Tabel L.6.3 Marker protein (2)

No.	BM	Log BM	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf
1.	245	2,3892	6,4	0,4	0,0625
2.	180	2,2553	6,4	0,5	0,0781
3.	135	2,1303	6,4	0,7	0,1094
4.	100	2	6,4	1	0,1563
5.	75	1,8751	6,4	1,4	0,2188
6.	63	1,7993	6,4	1,8	0,2813
7.	48	1,6812	6,4	2,3	0,3594
8.	35	1,5441	6,4	3	0,4688
9.	25	1,3979	6,4	4	0,625
10.	20	1,301	6,4	4,4	0,6875

Persamaan regresi linier sebagai berikut:



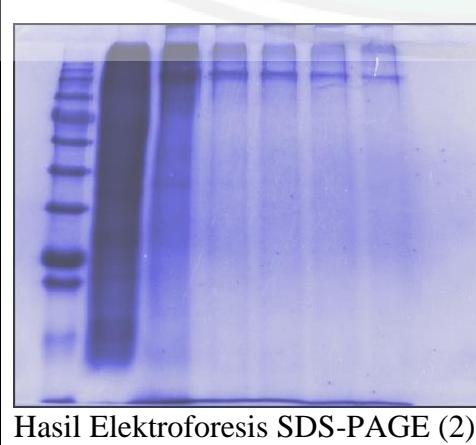
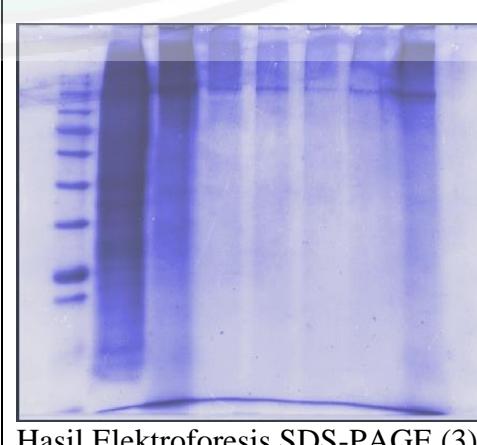
Gambar L.6.2 Kurva persamaan regresi marker protein (2)

Tabel L.6.4 Berat molekul sampel gelatin (2)

No.	Sampel	Pita ke-	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf	Log BM	BM
1.	E ₁	1	6,4	0,1	0,0156	2,2894	195
		2	6,4	0,3	0,0469	2,2405	174
		3	6,4	0,5	0,0781	2,1917	155
		4	6,4	0,7	0,1094	2,1427	139
		5	6,4	2,5	0,3906	1,7031	50
2.	40%	1	6,4	0,1	0,0156	2,2894	195
		2	6,4	0,3	0,0469	2,2405	174
		3	6,4	0,5	0,0781	2,1917	155
		4	6,4	0,7	0,1094	2,1427	139
3.	50%	1	6,4	0,1	0,0156	2,2894	195
		2	6,4	0,5	0,0781	2,1917	155

		3	6,4	0,7	0,1094	2,1427	139
4.	60%	1	6,4	0,5	0,0781	0,0781	155
5.	70%	1	6,4	0,5	0,0781	0,0781	155
		1	6,4	0,8	0,125	2,1184	131
6.	Gelatin komersial	2	6,4	2,8	0,4375	1,6297	43
		3	6,4	3,9	0,6094	1,3609	23
		4	6,4	4,1	0,6406	1,3122	21

Lampiran 7. Dokumentasi

 <p>Sampel Gelatin Hasil Produksi dari Tulang Ayam Broiler menggunakan Pelarut NaOH</p>	 <p>Endapan Hasil Presipitasi menggunakan Amonium Sulfat</p>
 <p>Proses Dialisis</p>	 <p>Hasil Dialisis</p>
 <p>Hasil Elektroforesis SDS-PAGE (1)</p>	
 <p>Hasil Elektroforesis SDS-PAGE (2)</p>	 <p>Hasil Elektroforesis SDS-PAGE (3)</p>