

**KARAKTERISASI PROTEIN GELATIN TULANG AYAM BROILER
(*Gallus domestica*) TIPE A MENGGUNAKAN SDS-PAGE (SODIUM
DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)**

SKRIPSI

Oleh:
NAZIFATUN NISA'
NIM. 13630083



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

**KARAKTERISASI PROTEIN GELATIN TULANG AYAM BROILER
(*Gallus domestica*) TIPE A MENGGUNAKAN SDS-PAGE (SODIUM
DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)**

SKRIPSI

**Oleh:
NAZIFATUN NISA'
NIM. 13630083**

**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**

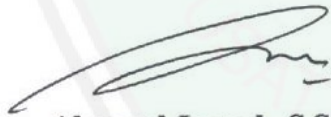
**KARAKTERISASI PROTEIN GELATIN TULANG AYAM BROILER
(*Gallus domestica*) TIPE A MENGGUNAKAN SDS-PAGE (SODIUM
DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)**

SKRIPSI

**Oleh:
NAZIFATUN NISA'
NIM. 13630083**

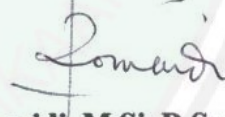
**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 5 Juli 2018**

Pembimbing I



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

Pembimbing II



**Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**



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

**KARAKTERISASI PROTEIN GELATIN TULANG AYAM BROILER
(*Gallus domestica*) TIPE A MENGGUNAKAN SDS-PAGE (SODIUM
DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)**

SKRIPSI

Oleh:
NAZIFATUN NISA'
NIM. 13630083

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 5 Juli 2018**

Penguji Utama : Eni Yulianti, M.Si (.....)
NIP. 19760611 200501 2 006

Ketua Penguji : Dewi Yuliani (.....)
NIDT. 19880711 2016081 2 067

Sekretaris Penguji : Akyunul Jannah, S.Si, M.P (.....)
NIP. 19750410 200501 2 009

Anggota Penguji : Romaidi, M.Si, D.Sc (.....)
NIP. 19810201 200901 1 019



**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia**

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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nazifatun Nisa'
NIM : 13630083
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Karakterisasi Protein Gelatin Tulang Ayam Broiler (*Gallus domestica*) Tipe A Menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Poluacrylamide Gel Electrophoresis*)

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



menyatakan, membuat pernyataan,

Nazifatun Nisa'

NIM. 13630083

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah, puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Karakterisasi Protein Gelatin Tulang Ayam Broiler (*Gallus Domestica*) Tipe A Menggunakan Elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)”. 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 dan Bapak Romaidi, M.Si, D.Sc selaku dosen pembimbing.
2. Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku konsultan yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dan perhatiannya dalam penulisan skripsi ini.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku ketua jurusan kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak dan Ibu staf pengajar segenap civitas akademika di Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Malang.

5. Kedua orang tua tercinta, Bapak Ahmad Muhtar, M.Pd dan Ibu Kinayati, S.Pd yang selalu ikhlas memberikan dukungan material, moral, nasehat-nasehat, serta lantunan do'a yang tiada pernah putus di setiap tasbih dan sujudnya setiap waktu.
6. 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, 5 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	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	7
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Gelatin	8
2.1.1 Pengertian Gelatin	8
2.1.2 Klasifikasi Gelatin	9
2.1.3 Karakteristik Gelatin	10
2.1.4 Komposisi Asam Amino Gelatin	11
2.2 Presipitasi Protein Menggunakan Aseton	12
2.3 Karakterisasi Gelatin	14
2.3.1 Analisis Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry....	14
2.3.2 Analisis Berat Molekul Protein Menggunakan SDS-PAGE	15
2.3.3 Identifikasi Daerah Serapan Gelatin Menggunakan FTIR	19
2.4 Gelatin dalam Prespektif Hukum Islam	21
BAB III METODE PENELITIAN	24
3.1 Pelaksanaan Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan	24
3.2.1 Alat	24
3.2.2 Bahan	24
3.3 Tahap Penelitian	25
3.4 Prosedur Penelitian	25
3.4.1 Pemurnian Protein Menggunakan Aseton	25
3.4.2 Penentuan Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry	26
3.4.2.1 Pembuatan Pereaksi Lowry	26
3.4.2.2 Pembuatan Larutan Standar	26
3.4.2.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	26
3.4.2.4 Pembuatan Kurva Standar	27
3.4.2.5 Penentuan Kadar Protein dalam Sampel	27
3.4.3 Penentuan Berat Molekul Protein Menggunakan SDS-	27
PAGE	27
3.4.3.1 Pembuatan Gel SDS-PAGE	27
3.4.3.2 Preparasi dan <i>Running</i> Sampel	28

3.4.3.3 Perwarnaan Gel	28
3.4.4 Identifikasi Daerah Serapan Menggunakan FTIR	29
3.5 Analisis Data	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Pemurnian Protein Gelatin Menggunakan Pelarut Aseton.....	30
4.2 Penentuan Kadar Protein Gelatin Menggunakan Metode Lowry	34
4.3 Penentuan Berat Molekul Protein Gelatin Menguunakan SDS-PAGE.....	36
4.4 Identifikasi Daerah Serapan Menggunakan FTIR.....	45
4.5 Kajian Hasil Penelitian dalam Prespektif Islam.....	47
BAB V KESIMPULAN	50
5.1 Penutup.....	50
5.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Proses pembentukan gel <i>thermoreversible</i> gelatin.....	11
Gambar 2.2 Struktur kimia gelatin.....	12
Gambar 2.3 Pembentukan kompleks antara ikatan peptida dengan ion Cu^{2+} ...	15
Gambar 2.4 Reaksi reduksi fosfomolibdat dan fosfotungstat menjadi tungsten dan molibdenum.....	15
Gambar 2.5 Reaksi polimerisasi pada gel poliakrilamida.....	17
Gambar 2.6 Struktur protein sebelum penambahan SDS.....	18
Gambar 2.7 Skema elektroforesis untuk protein (SDS-PAGE).....	19
Gambar 2.8 Spektra FTIR.....	21
Gambar 4.1 Hasil pemurnian gelatin dengan aseton 20, 40, 60, & 80%	31
Gambar 4.2 Dugaan interaksi antara gelatin, air, dan aseton.....	33
Gambar 4.3 Grafik kurva standar protein	34
Gambar 4.4 Hasil elektroforesis gelatin 12 jam.....	38
Gambar 4.5 Hasil elektroforesis gelatin 24 jam.....	39
Gambar 4.6 Hasil elektroforesis gelatin 36 jam.....	40
Gambar 4.7 Hasil elektroforesis gelatin 48 jam.....	41
Gambar 4.8 Hasil elektroforesis gelatin 60 jam.....	42
Gambar 4.9 Struktur gelatin α -chain.....	44

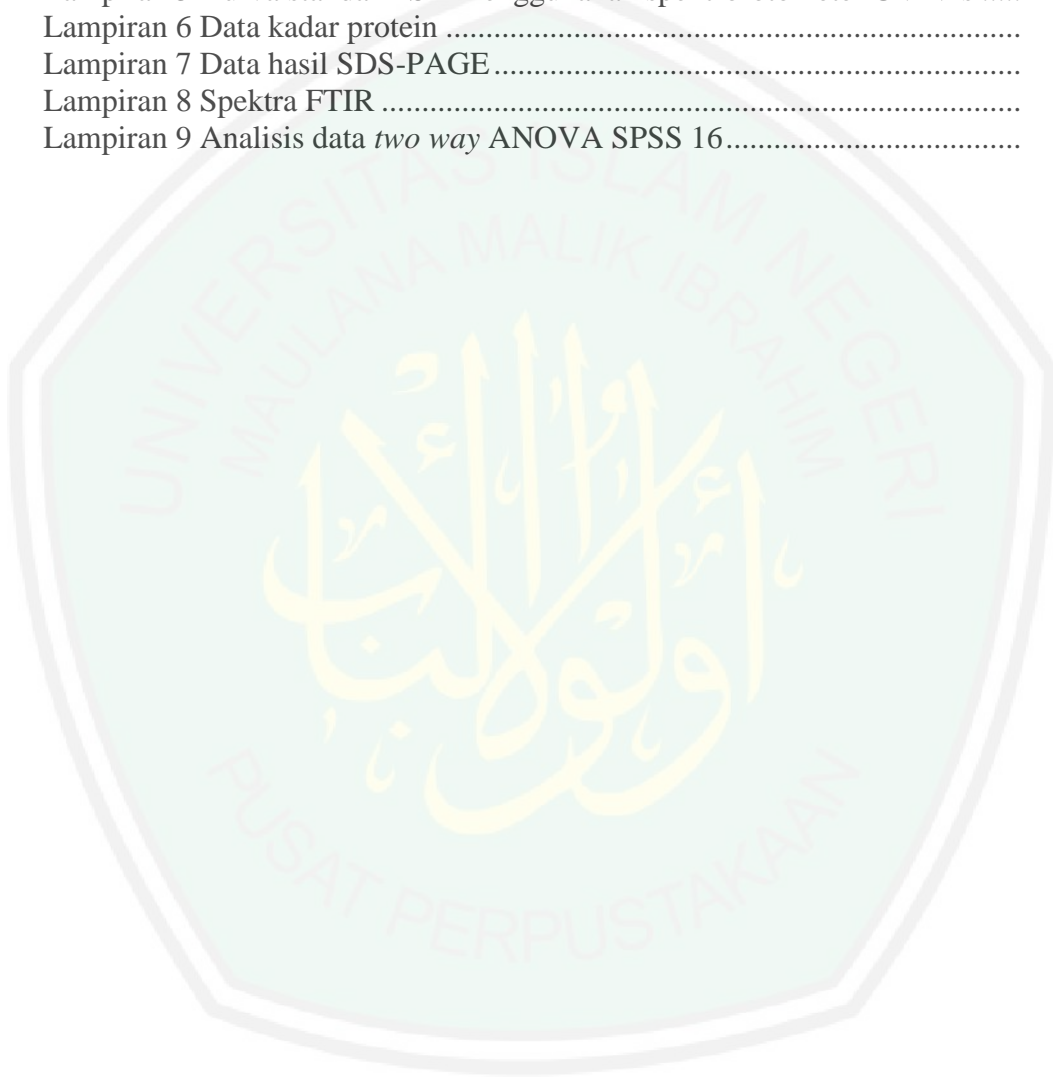
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Spektra FTIR gelatin tipe A	20
Tabel 3.1 Komposisi gel elektroforesis SDS-PAGE.....	28
Tabel 4.1 Kadar protein gelatin.....	35
Tabel 4.2 Berat molekul gelatin tulang ayam	37
Tabel 4.3 Daerah serapan dan bilangan gelombang gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton 80%	45



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan penelitian	57
Lampiran 2 Skema kerja	58
Lampiran 3 Pembuatan reagen.....	63
Lampiran 4 Kurva panjang gelombang maksimum spektrofotometer UV-Vis	67
Lampiran 5 Kurva standar BSA menggunakan spektrofotometer UV-Vis	68
Lampiran 6 Data kadar protein	70
Lampiran 7 Data hasil SDS-PAGE.....	71
Lampiran 8 Spektra FTIR	76
Lampiran 9 Analisis data <i>two way</i> ANOVA SPSS 16.....	79



ABSTRAK

Nisa', N. 2018. Karakterisasi Protein Gelatin Tulang Ayam Broiler (*Gallus domestica*) Tipe A Menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Pembimbing II: Romaidi, M.Si, D.Sc; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si.

Kata Kunci: Gelatin tulang ayam broiler, presipitasi aseton, Lowry, elektroforesis SDS-PAGE, FTIR.

Gelatin merupakan produk yang banyak diaplikasikan di industri makanan, farmasi, kosmetik, dan fotografi. Kebutuhan gelatin di Indonesia mayoritas diperoleh dengan cara impor sehingga tidak jelas status kehalalannya. Hal tersebut menimbulkan kekhawatiran bagi kalangan Muslim. Pemanfaatan tulang ayam broiler sebagai bahan baku pembuatan gelatin halal merupakan alternatif yang dapat digunakan untuk memenuhi kebutuhan gelatin dalam negeri. Penelitian ini bertujuan mengetahui profil protein gelatin tulang ayam broiler hasil pemurnian dengan aseton. Protein gelatin diperoleh dari pemurnian menggunakan aseton dengan variasi konsentrasi 20, 40, 60, dan 80%. Protein yang telah dimurnikan ditentukan kadar proteinnya dengan metode Lowry. Protein dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE untuk menentukan berat molekul protein, dan FTIR untuk identifikasi daerah serapan gelatin. Data kadar protein dianalisis dengan ANOVA *Two way* dan dilanjutkan dengan uji BNT. Kadar protein gelatin ekstrak kasar adalah 0,086-0,101 mg/mL. Gelatin hasil pemurnian dengan aseton 20, 40, 60, dan 80% memiliki kadar protein berturut-turut sebesar, 0,015-0,023; 0,014-0,024; 0,023-0,046; dan 0,068-0,097 mg/mL. Variasi konsentrasi aseton untuk pemurnian memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar protein. Gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton 80% memiliki pita protein pada berat molekul 100-138 kDa. Gelatin tulang ayam memiliki lima daerah serapan yaitu, Amida A ($3487,82-3424,18 \text{ cm}^{-1}$), Amida B ($2932,36-2928,50 \text{ cm}^{-1}$), Amida I ($1655,57-1649,79 \text{ cm}^{-1}$), Amida II ($1543,71-1541,78 \text{ cm}^{-1}$), dan Amida III ($1267,91-1235,12 \text{ cm}^{-1}$).

ABSTRACT

Nisa', N. 2018. Protein Characterization of Broiler Chicken Bone Gelatin Type A (*Gallus domestica*) by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Department of Chemistry Faculty of Science and Technology Islamic State University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Supervisor II: Romaidi, M.Si, D.Sc; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si.

Keyword: Broiler chicken bone gelatin, acetone precipitation, Lowry, electrophoresis SDS – PAGE, FTIR.

Gelatin is widely applied product at industry of food, pharmacy, cosmetic, and photography. The need of gelatin in Indonesia primary supplied by improting those needs and affected on its unknown halal status. This fact arouse the feeling of insecurity among muslim. The utilization of broiler chicken bone as a primary ingredient of halal gelatin production is an alternative that is used to supplied the needs of domestic gelatin. The objective of this experiment was to know the protein profile of bone's gelatin of chicken broiler bone. Protein of gelatin was produced by acetone used purification with various concentration 20, 40, 60, and 80 percent. The protein content of purified gelatin is determined using Lowry method. Protein is characterized using SDS – PAGE to determine protein molecule mass, and FTIR to identified gelatin absorption area. Protein content data was analyzed by ANOVA Two Way and continued by BNT test. Protein content of crude gelatin extract is 0.086 – 0.101 mg/mL. The purified gelatin with acetone 20, 40, 60, and 80 % has a successive protein content are 0.015 – 0.023 mg/mL, 0.014 – 0.024 mg/mL, 0.023 – 0.046 mg/mL, and 0.068 – 0.097 mg/mL . Various acetone concentration for purification gave really different impact to protein content ($p < 0.05$). Gelatin of chicken's bone had typical absorption areas, they were Amida A (3487.82 – 3424.18 cm^{-1}), Amida B (2932.36 – 2928.50 cm^{-1}), Amida I (1655.57 – 1649.79 cm^{-1}), Amida II (1543.71 – 1541.78 cm^{-1}), and Amida III (1267.91 – 1235.12 cm^{-1}).

ملخص البحث

نساء، ن. ٢٠١٨. توصيف بروتين جيلاتين لعظم دجاج اللاحم (*Gallus domestica*) للنوع أ باستخدام SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). البحث الجامعي. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا الجامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. الاشراف: أعين الجنة، الماجستير، ورميدى، الماجستير، والمستشار: ديوى يولياني، الماجستير

الكلمات الرئيسية: جيلاتين لعظم دجاج اللاحم ، ترسب الأستون، Lowry، الكهربي SDS-PAGE- ، FTIR.

الجيلاتين هو منتج الذى يستخدم في الصناعات الغذائية والأدوية ومستحضرات التجميل ، والتصوير الفوتوغرافي. الحاجة الجيلاتين في إندونيسيا غالبا هي عن طريق الاستيراد ، لذلك ليس من الواضح حالة حلال. هذا يؤثر المخاوف للمسلمين. استخدام عظم دجاج اللاحم كمواد خام لصنع الجيلاتين الحلال هو بديل يمكن أن يستخدمه لتلبية متطلبات الجيلاتين داخل البلاد. يهدف هذا البحث إلى تحديد ملامح جيلاتين لعظم دجاج اللاحم كنتيجة لتنقية مع الأستون. حصل بروتين الجيلاتين من تنقية باستخدام الأستون مع تغيرات التركيز من ٢٠ و ٤٠ و ٦٠ و ٨٠٪. قد حدد البروتين المنقى من خلال محتواه من البروتين بواسطة طريقة Lowry. تم وصف البروتينات باستخدام SDS-PAGE لتحديد الوزن الجزيئي للبروتين، واستخدم FTIR لتحديد مناطق امتصاص الجيلاتين. حلل محتوى البروتين بواسطة ANOVA Two way واستمر اختبار BNT. كان محتوى البروتين من خلاصة الجيلاتين الخام ٠.٠٨٦-٠.١٠١ ملغ/مل. الجيلاتين من تنقية مع الأستون هو ٢٠ و ٤٠ و ٦٠ و ٨٠٪ وله محتوى البروتين ٠.٠١٥-٠.٠٢٣ ، ٠.٠١٤-٠.٠٢٤ ، ٠.٠٢٣-٠.٠٤٦ و ٠.٠٦٨-٠.٠٩٧ ملغم/مل. أعطى الاختلاف في تركيز الأستون للتنقية لها تأثير مختلف وكبير ($p < 0$) ، (٥ على محتوى البروتين. الجيلاتين من عظام الدجاج اللاحم مع الأستون هو ٨٠٪ ولديه عصابات البروتين في الوزن الجزيئي أي ١٠٠-١٣٨ kDa كيلو دالتون. يحتوي جيلاتين لعظم الدجاج على خمس مناطق امتصاص ، يعنى أميدا أ (٣٤٢٤،١٨-٣٤٨٧،٨٢ سم^{-١}) ، وأميدا ب (٢٩٢٨،٥٠-٢٩٣٢،٣٦ سم^{-١}) ، وأميدا I (١٦٤٩،٧٩-١٦٥٥،٥٧ سم^{-١}) ، وأميدا II (١٥٤٣،٧١-١٥٤١،٧٨ سم^{-١}) ، وأميدا III (١٢٦٧،٩١-١٢٣٥،١٢ سم^{-١})

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gelatin merupakan senyawa turunan dari kolagen yang dapat diterapkan secara luas dalam industri makanan, farmasi, kosmetik, dan fotografi (Sarbon dkk, 2013). Gelatin digunakan sebagai bahan untuk memproduksi cangkang kapsul dan untuk melapisi obat yang berupa tablet dalam industri farmasi. Industri pangan menggunakan gelatin sebagai pembentuk tekstur, transparansi, elastisitas, pembentuk busa, pembentuk gel, agen pengikat, emulsifier, pengental (Haug & Draget, 2011).

Gelatin dibuat dari bahan baku yang mengandung kolagen seperti kulit, jaringan ikat hewan, tendon dan tulang (Hudson, 1994), baik dari babi, ikan, sapi ataupun hewan lainnya (Hastuti & Iriane, 2007). Hingga saat ini masih banyak ditemukan gelatin yang bahan bakunya berasal dari kulit babi (46%), kulit sapi (29,4%), tulang babi dan binatang ternak (23,1%) (Gomez-Guillen dkk, 2011). Banyaknya jenis bahan baku gelatin maka perlu dilakukan karakterisasi untuk membedakan gelatin dari sumber yang halal dan haram.

Fatwa haram terhadap produk-produk yang bahan bakunya adalah babi tidak menurunkan permintaan pasar Indonesia terhadap gelatin impor. Menurut data Badan Pusat Statistik (BPS) (2012), Indonesia memenuhi kebutuhan gelatin dengan mengimpor sebanyak 3.771,04 ton atau senilai US\$ 27.697.810 dari Amerika Serikat, Perancis, Jerman, Brazil, Korea, Cina dan Jepang. Hal tersebut menimbulkan kekhawatiran bagi masyarakat muslim di Indonesia karena

berkaitan dengan syariat Islam. Umat muslim diharamkan memakan babi dan diwajibkan untuk mengkonsumsi makanan yang halal dan baik. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk meminimalkan kemungkinan semakin banyaknya gelatin yang bahan bakunya berasal dari babi adalah dengan memanfaatkan tulang ayam broiler sebagai bahan baku gelatin. Sebagaimana firman Allah dalam surat Al-Baqarah ayat 173 yang berbunyi:

إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالْدَّمَ وَ لَحْمَ الْخِنْزِيرِ وَ مَا أَهْلَ بِهِ لِعَيْرِ اللَّهِ, فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَ لَا عَادٍ فَلَا إِثْمَ عَلَيْهِ, إِنَّ اللَّهَ عَفُورٌ رَّحِيمٌ (١٧٣)

Artinya: “*Sesungguhnya Allah hanya mengharamkan bagimu bangkai, darah, daging babi dan binatang yang (ketika disembelih) disebut (nama) selain Allah. Tetapi barang siapa dalam keadaan terpaksa (memakannya) sedang ia tidak menginginkannya dan tidak (pula) melampaui batas, maka tidak ada dosa baginya. Sesungguhnya Allah Maha Pengampun lagi Maha Penyayang*” (Q.S Al-Baqarah : 173).

Surat Al-Baqarah ayat 173 menjelaskan bahwa yang dimaksud dengan bangkai adalah hewan yang telah mati tanpa disembelih. Allah juga mengharamkan daging babi yang disembelih ataupun tanpa disembelih. Hukum lemak babi maupun dagingnya adalah haram. Begitu juga diharamkan menyembelih hewan dengan tidak menyebut nama Allah, seperti dengan menyebut nama berhala, sekutu, dan lain sebagainya yang menjadi kebiasaan orang-orang Jahiliyah (Abdullah, 2004).

Penelitian tentang produksi gelatin dari tulang ayam broiler yang dihidrolisis dengan asam sitrat telah dilakukan lakukan oleh Maunatin (2016), namun belum dilakukan karakterisasi proteinnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan tahap karakterisasi protein gelatin. Karakterisasi protein gelatin meliputi analisis

kadar protein, berat molekul, dan gugus fungsi. Tahap awal yang dilakukan pada karakterisasi gelatin adalah proses purifikasi.

Tujuan purifikasi adalah untuk menghilangkan kandungan mineral yang ada dalam gelatin sehingga dapat menghasilkan gelatin murni yang seragam, yaitu yang memiliki sifat fisik dan kimia yang sama (Cassel & Kanagy, 1949). Proses purifikasi dilakukan dengan presipitasi protein menggunakan pelarut organik. Contoh pelarut organik yang dapat digunakan adalah aseton, etanol, asetonitril, dan metanol (Prabu & Suriyaprakash, 2012). Pelarut organik yang digunakan untuk presipitasi protein gelatin pada penelitian ini adalah aseton. Presipitasi dengan aseton terjadi akibat interaksi elektrostatis pada muatan yang berlawanan di permukaan protein sehingga terjadi pengendapan protein (Nurhayati dkk, 2010).

Aseton digunakan oleh Azira, dkk (2014) untuk presipitasi protein gelatin dalam jelly *homemade*. Pita polipeptida dibandingkan dengan gelatin sapi murni. Sampel jelly *homemade* memiliki pita yang sama dengan gelatin sapi murni, yaitu 110 dan 135 kDa. Azira, dkk (2012), menggunakan aseton untuk presipitasi protein gelatin dalam sampel jelly *homemade*. Efisiensi dari penggunaan aseton dinilai dengan membandingkan pola pita polipeptida dari sampel jelly *homemade* dengan gelatin babi murni (sebagai kontrol). Hasilnya adalah sampel jelly *homemade* memiliki pita polipeptida yang sama dengan 11 pita pada gelatin babi murni yaitu, 25, 58, 64, 70, 76, 83, 87, 96, 106, 114 dan 120 kDa.

Penentuan konsentrasi larutan organik yang digunakan untuk presipitasi penting karena pada konsentrasi larutan organik tertentu protein akan mengendap dengan baik. Menurut Sharma, dkk (2014), hasil presipitasi protein maksimum

diperoleh pada konsentrasi aseton 80% dengan sampel nanas (*Ananas comosus*). Sampel yang telah dipresipitasi dengan aseton 80% memiliki kadar protein paling tinggi yaitu 535 mg/mL. Menurut Melas, dkk (1994), konsentrasi terbaik aseton yang dapat memisahkan protein pada *Low Molecular Weight Subunit of Glutenin* (LMWSG) dan *High Molecular Weight Subunit of Glutenin* (HMWSG) dari gandum adalah konsentrasi 40%. Nurhayati, dkk (2010) melaporkan bahwa pengendapan inhibitor protease maksimum pada konsentrasi aseton 60% menghasilkan kadar protein tertinggi yaitu 0,103 mg/mL, Gelatin sapi komersial yang dipresipitasi dengan aseton 80% memiliki kadar protein yang paling tinggi yaitu 74,35% (Maknunah, 2015).

Protein yang telah mengendap dikarakterisasi dengan menentukan berat molekulnya menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Metode SDS-PAGE adalah metode yang dapat diterapkan untuk mengkarakterisasi profil protein gelatin berdasarkan tingkat migrasi molekul. Hasil karakterisasi berupa pita-pita protein yang menunjukkan berat molekul protein yang ada di dalam gelatin.

Berat molekul antara satu sumber gelatin dengan gelatin lainnya berbeda. Gelatin tulang ayam akan memiliki berat molekul berbeda dengan gelatin tulang babi, sapi maupun gelatin komersial. Berat molekul spesifik tersebut dapat memudahkan untuk mengetahui bahan yang digunakan pada pembuatan gelatin. Abdullah, dkk (2016) melaporkan bahwa gelatin kaki ayam memiliki berat molekul pada kisaran 120-150 kDa dan kisaran 250 kDa, dengan menggunakan 4% *stacking* gel dan 7,5% *resolving* gel. Widyasari & Saroat (2015) melaporkan bahwa dengan menggunakan *stacking* gel 4% dan *resolving* gel 7,5%

menghasilkan berat molekul 130 dan 143 kDa pada gelatin kaki ayam. Hardikawati, Puspawati, & Ratnayani (2016) menggunakan *stacking* gel 4% dan *resolving* gel 7,5% menghasilkan 6 pita dengan berat molekul 120, 100, 70, 60, 50, dan 40 kDa pada gelatin kulit ayam.

Selain karakterisasi protein dengan menentukan berat molekulnya, karakterisasi lain yang dilakukan adalah dengan menentukan kadar protein dalam gelatin. Metode yang digunakan di penelitian ini yaitu metode Lowry dengan teknik spektrofotometri. Metode Lowry dipilih karena memiliki sensitifitas yang tinggi (Zaia, 1998), dan mampu mengidentifikasi protein hingga konsentrasi terkecil (0,02 mg/mL) (Praira, 2008). Penelitian oleh Praira (2008) menunjukkan bahwa dengan metode Lowry sampel obat tablet yang mengandung gelatin dapat dianalisis dan dihasilkan konsentrasi protein yang cukup besar, antara 0,02% – 12,56% (b/b). Kadar protein *fish glue* dari limbah ikan tenggiri dengan waktu ekstraksi 4 jam dan suhu 45 °C adalah 78,5117 ppm (Handoko, Rusli, & Sandy, 2011). Chancharearn, dkk (2016) melaporkan bahwa *jellyfish* gelatin tipe A memiliki kadar protein 203,12 mg/mL dan *jellyfish* gelatin tipe B memiliki kadar protein 350,02 mg/mL.

Proses karakterisasi untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh merupakan gelatin, maka dilakukan penentuan serapan khas gugus fungsi menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) (Suryati dkk, 2015). Penelitian Mufidah (2013) menunjukkan bahwa gelatin tulang ayam broiler memiliki bilangan gelombang 1647,13 cm^{-1} untuk amida I, 1541,38 cm^{-1} untuk amida II, 1116, 96 cm^{-1} untuk amida III, dan 3447,18 cm^{-1} untuk amida A. Spektra FTIR gelatin kaki ayam memiliki bilangan gelombang 1652,01 untuk amida I, 1539,87

untuk amida II, 1241,29 untuk amida III, 2923,72 untuk amida B, dan 3399,56 untuk amida A (Almeida dkk, 2012).

Berdasarkan ulasan tersebut, maka penting dilakukan penelitian tentang karakterisasi gelatin dengan melakukan presipitasi protein menggunakan aseton dengan konsentrasi 20, 40, 60, dan 80%. Protein hasil presipitasi dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE, penentuan kadar protein menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dengan metode Lowry, dan penentuan serapan khas gugus fungsi menggunakan FTIR. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tentang penggunaan metode untuk karakterisasi gelatin serta memberikan informasi tentang kadar protein yang ada dalam gelatin tulang ayam broiler.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Berapa kadar protein gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton menggunakan metode Lowry?
2. Bagaimana profil protein gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton menggunakan SDS-PAGE?
3. Bagaimana serapan dari gugus fungsi gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton menggunakan FTIR?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kadar protein gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton menggunakan metode Lowry.
2. Mengetahui profil protein gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton menggunakan SDS-PAGE.
3. Mengetahui daerah serapan gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton menggunakan FTIR.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel gelatin ulangan ke tiga (U3) tulang ayam hasil hidrolisis menggunakan asam sitrat.
2. Konsentrasi aseton yang digunakan untuk presipitasi adalah 20, 40, 60, dan 80%.
3. Karakterisasi profil protein menggunakan SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul protein, metode Lowry untuk mengetahui kadar protein, dan FTIR untuk mengetahui daerah serapan gelatin.
4. Gel poliakrilamida dibuat dari 7,5% *resolving gel* dan 4% *stacking gel*.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan mengenai penggunaan metode karakterisasi gelatin. Memberikan informasi tentang kadar protein yang ada dalam gelatin dari tulang ayam hasil hidrolisis menggunakan asam sitrat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gelatin

2.1.1 Pengertian Gelatin

Gelatin adalah polipeptida yang memiliki berat molekul tinggi, berasal dari kolagen, komponen protein utama dalam tulang, tulang rawan dan kulit, serta merupakan senyawa protein yang larut (Aina dkk, 2013; Gomez-Guillen dkk, 2011). Gelatin merupakan protein fibrosa yang diperoleh dari denaturasi termal atau degradasi parsial *triple helix* kolagen kulit dan tulang hewan (Chancharern dkk, 2016; Sarbon dkk, 2015).

Gelatin telah diterapkan secara luas dalam makanan, farmasi, kosmetik, medis, dan produk fotografi. Industri farmasi menerapkan gelatin ke dalam produksi kapsul lunak dan keras. Gelatin berperan penting dalam industri kosmetik untuk produk kecantikan kulit dan rambut. Industri fotografi menggunakan gelatin sebagai bahan pembuatan film (Haug & Draget, 2011). Sifat fungsional gelatin sangat penting untuk industri makanan karena dapat meningkatkan elastisitas, konsistensi, dan dapat digunakan sebagai pelapis untuk melindungi makanan dari cahaya dan oksigen (Rasli & Sarbon, 2015). Menurut *Gelatin Manufacture Institute of America* (GMIA) (2012), gelatin dalam produk makanan memiliki sifat fungsional seperti, pembentuk gel, pembentuk busa, koloid pelindung, pengikat, penjernih, pengental, pengemulsi, penstabil, dan perekat.

Sumber gelatin yang paling melimpah saat ini adalah berasal dari mamalia, terutama sapi dan babi (Gómez-Guillén dkk, 2002). Sumber gelatin dari

babi tidak dapat diterima untuk pasar makanan halal di beberapa negara dengan jumlah mayoritas Muslim dan Yahudi (Chancharern dkk, 2016; Aina dkk, 2013), menyebarnya *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE) atau penyakit sapi gila juga menimbulkan kekhawatiran atas keamanan gelatin yang berasal dari sapi (Abdullah dkk, 2016). Ada beberapa sumber alternatif gelatin yang dapat digunakan seperti, gelatin yang berasal dari cakar ayam, kulit ayam, kulit ikan, tulang ikan, dan ubur-ubur (Abdullah dkk, 2016; Chancharern dkk, 2016; Sarbon dkk, 2013; Rachmania dkk, 2013; Sukkwai dkk, 2011; Widyasari & Saroat, 2015).

2.1.2 Klasifikasi Gelatin

Gelatin dibagi menjadi dua tipe yaitu tipe A dan B. Tipe A diperoleh dengan pengolahan awal menggunakan asam, dan tipe B diperoleh dari pengolahan awal menggunakan basa (Widyasari & Saroat, 2015). Perendaman gelatin tipe A dalam larutan asam membutuhkan waktu selama 8 sampai 30 jam tergantung pada ketebalan dan ukuran bahan baku. Waktu yang digunakan pada proses perendaman gelatin tipe B adalah 20 hari sampai 6 bulan (Haug & Draget, 2011). Larutan asam yang digunakan untuk pengolahan dapat mengubah serat kolagen *triple-helix* menjadi rantai tunggal, sedangkan larutan basa hanya mampu menghasilkan rantai ganda (Ward and Court, 1977). Gelatin tipe A rata-rata memiliki titik isoelektrik yang mirip dengan kolagen, yaitu dikisaran pH 7 - 9,4. Gelatin tipe B rata-rata memiliki titik isoelektrik dari dalam kisaran pH 4,8 - 5,5 (Haug & Draget, 2011).

Gelatin tipe A biasanya dihasilkan dari kulit hewan muda (terutama kulit babi). Sedangkan, kulit atau tulang hewan tua yang keras digunakan untuk

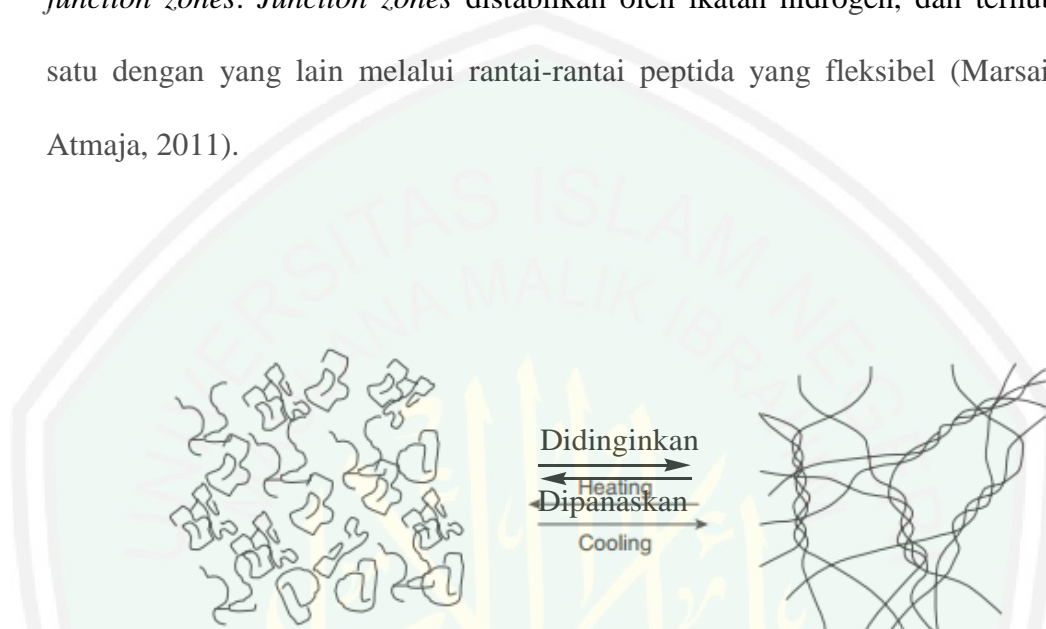
membuat gelatin tipe B (Hastuti & Iriane, 2007). Produksi gelatin dengan proses asam lebih diminati dibanding proses basa karena lebih ekonomis. Selain itu, proses asam membutuhkan waktu perendaman yang lebih singkat (Sompie dkk, 2012).

2.1.3 Karakteristik Gelatin

Gelatin merupakan polipeptida yang memiliki berat molekul tinggi, antara 15-300 kDa (Abdullah dkk, 2016). Menurut Sarbon, dkk (2013) berat molekul gelatin kulit ayam adalah 285 kDa. Proses hidrolisis dapat mempengaruhi berat molekul gelatin hasil ekstraksi, karena pada saat hidrolisis terjadi pemisahan rantai peptida. Selama ekstraksi gelatin, konversi kolagen menjadi gelatin dengan berbagai berat molekul terjadi karena pemecahan *interchain cross-link* (Widyasari & Saroat, 2015). Larutan gelatin bersifat amfoter, dapat berperan sebagai asam atau basa, dalam larutan asam gelatin bermuatan positif, dan dalam larutan basa bermuatan negatif. Gelatin hampir tidak memiliki rasa dan tidak berbau, berwujud padatan (agak rapuh), berwarna kuning. Bahan baku gelatin akan mempengaruhi warnanya. Secara umum, warna tidak mempengaruhi sifat gelatin atau mengurangi kegunaannya (GMIA, 2012).

Gelatin dapat menyerap air 5-10 kali dari beratnya. Jika ditambah dengan air panas gelatin akan larut dan akan berubah menjadi gel jika didinginkan. (Suryani dkk, 2009). Gelatin larut dalam air minimal pada suhu 49 °C, akan membentuk gel pada suhu sekitar 48 °C, dan larut baik pada suhu 60-70 °C (Ward & Courts, 1977). Ketika gelatin didinginkan, gelatin akan membentuk gel yang *thermoreversible*. Proses pembentukan gel *thermoreversible* diilustrasikan dalam Gambar 2.1. Pendinginan tersebut membuat transisi struktur gulungan yang

semula acak menjadi struktur helik baru. Struktur helik yang baru terbentuk akan berbeda dengan struktur asli kolagen, karena jumlah *triple helix* yang terbentuk kembali akan terbatas. *Triple helix* yang terbentuk kembali menyebabkan adanya *junction zones*. *Junction zones* distabilkan oleh ikatan hidrogen, dan terhubung satu dengan yang lain melalui rantai-rantai peptida yang fleksibel (Marsaid & Atmaja, 2011).



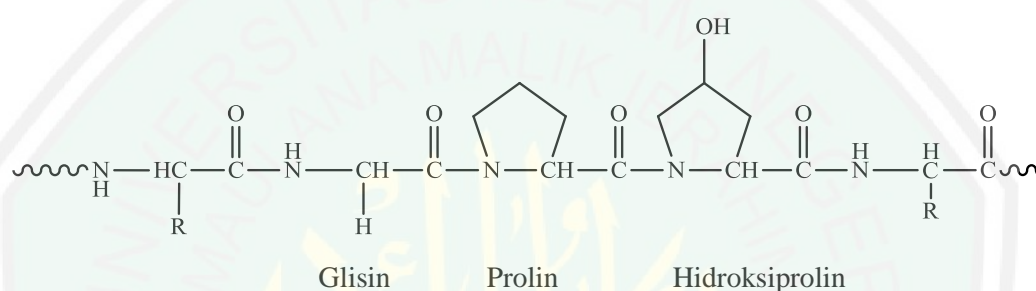
Gambar 2.1 Proses pembentukan gel *thermoreversible* gelatin (Haug & Draget, 2011)

2.1.4 Komposisi Asam Amino Gelatin

Sifat kimia dari gelatin disebabkan oleh susunan asam amino yang mirip dengan kolagen, dan dipengaruhi oleh spesies dan jenis jaringan hewan (Hafidz dkk, 2011). Gelatin tersusun atas 19 asam amino, terdiri dari prolin, hidroksiprolin, glisin, alanin, glutamin, asam aspartat, arginin, fenilalanin, lisin, isoleusin, leusin, valin, tirosin, serin, treonin, histidin, metionin, dan asam glutamat (Abdullah dkk, 2016).

Menurut Abdullah, dkk (2016) Struktur khas gelatin ditunjukkan sebagai: - Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-. Secara struktural, molekul gelatin mengandung ulangan dari urutan Gly-X-Y triplet, dimana X dan Y adalah asam

amino prolin dan hidroksiprolin. Struktur kimia gelatin ditampilkan pada Gambar 2.2. Asam amino dalam gelatin cakar ayam terdiri dari 21,54% asam imino (Pro+Hyp), 19,54% glisin, dan alanin 8,863%. Asam-asam amino tersebut yang memberikan kontribusi terhadap kekuatan gel dan stabilitas yang lebih tinggi (Sarbon dkk, 2013).



Gambar 2.2 Struktur kimia gelatin (Poppe, 1992)

2.2 Presipitasi Protein Menggunakan Aseton

Presipitasi adalah metode untuk mendapatkan protein yang lebih murni dengan cara menggumpalkan dan memisahkan protein dari bahan lain (Suhartono dkk, 1992). Presipitasi disebabkan oleh perubahan kelarutan setelah dilakukan penambahan reagen sehingga terjadi pengendapan. Endapan diperoleh dengan cara sentrifugasi atau filtrasi diikuti dengan pencucian atau pelarutan. Secara umum metode presipitasi didasarkan pada suhu yang ekstrim, pH atau konsentrasi garam, atau dengan penambahan pelarut organik (GE Healthcare, 2010).

Salah satu pelarut organik yang dapat digunakan untuk presipitasi adalah aseton. Aseton digunakan untuk presipitasi karena mudah menguap setelah presipitasi (Sharma dkk, 2014). Pengendapan protein juga dipengaruhi oleh konstanta dielektrik yang menyebabkan interaksi antara aseton dengan air jauh

lebih kuat daripada air dengan protein, sehingga efek sebenarnya adalah untuk mendehidrasi protein. Presipitasi menggunakan pelarut organik biasanya dilakukan pada suhu rendah. Suhu pelarut yang digunakan adalah $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Prabu & Suriyaprakash, 2012).

Penggunaan aseton untuk presipitasi protein gelatin dalam jelly *homemade* oleh Azira, dkk (2014) menunjukkan bahwa saat pita polipeptida dibandingkan dengan gelatin sapi murni, sampel jelly *homemade* memiliki pita yang sama dengan gelatin sapi murni, yaitu 110 dan 135 kDa. Aseton juga digunakan oleh Azira, dkk (2012) untuk presipitasi protein gelatin dalam sampel jelly *homemade*. Saat pola pita polipeptida sampel jelly *homemade* dibandingkan dengan gelatin babi murni (sebagai kontrol), sampel jelly *homemade* memiliki pita polipeptida yang sama dengan gelatin babi murni yaitu, 25, 58, 64, 70, 76, 83, 87, 96, 106, 114 dan 120 kDa.

Penentuan konsentrasi larutan organik yang digunakan untuk presipitasi penting karena pada konsentrasi larutan organik tertentu protein akan mengendap dengan baik. Menurut Sharma, dkk (2014), konsentrasi aseton yang menghasilkan kadar protein paling tinggi yaitu 535 mg/mL pada protease yang diisolasi dari (*Ananas comosus*) adalah aseton 80%. Melas, dkk (1994) melaporkan bahwa aseton dengan konsentrasi 40% dapat memisahkan protein pada *Low Molecular Weight Subunit of Glutenin* (LMWSG) dan *High Molecular Weight Subunit of Glutenin* (HMWSG) dari gandum. Nurhayati, dkk (2010) memperoleh kadar protein dari inhibitor protease tertinggi yaitu 0,103 mg/mL dengan menggunakan aseton 60% untuk presipitasi. Maknunah (2015) melaporkan bahwa gelatin sapi

komersial yang dipresipitasi dengan aseton 80% memiliki kadar protein yang paling tinggi yaitu 74,35%.

2.3 Karakterisasi Gelatin

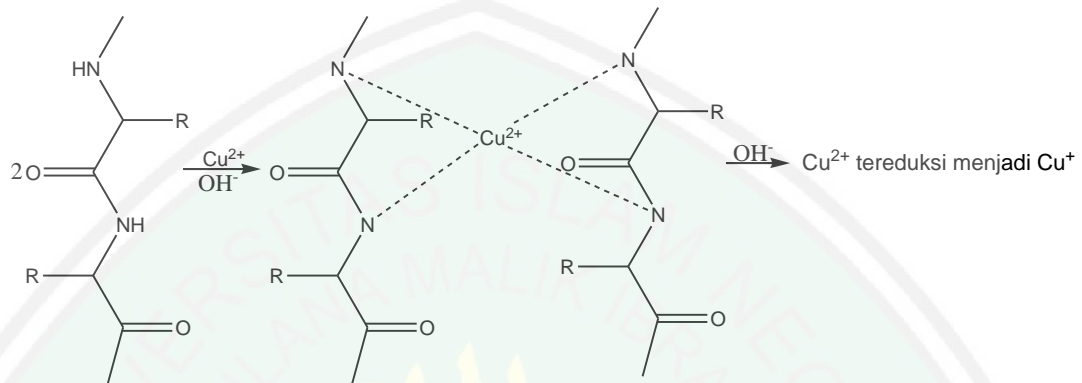
2.3.1 Analisis Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry

Metode Lowry digunakan untuk menentukan kadar protein terlarut. Metode Lowry adalah metode penentuan kadar protein yang 100 kali lebih sensitif dibanding dengan metode biuret. Batas deteksi metode ini berkisar pada konsentrasi 0,01 mg/mL. Metode Lowry adalah metode yang sederhana, cepat, dan relatif akurat. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 650 nm (Purwanto, 2014; Yenrina, 2015; Zhou & Regenstein, 2006).

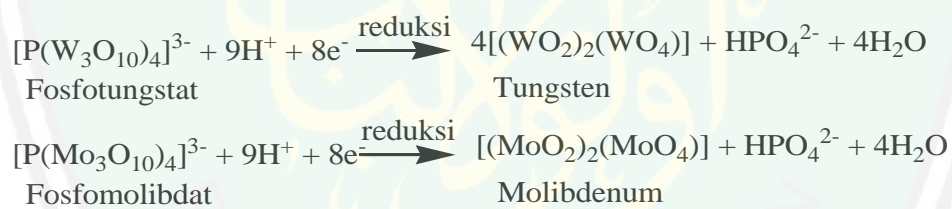
Prinsip metode Lowry yaitu pembentukan kompleks antara ikatan peptida pada protein dengan ion Cu^{2+} dalam kondisi basa (Gambar 2.3). Ion Cu^{2+} lalu direduksi menjadi ion Cu^+ . Ion Cu^+ akan mereduksi reagen Folin Ciocalteu menghasilkan warna biru. Warna biru yang terbentuk merupakan hasil reduksi asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat oleh tirosin yang merupakan residu protein. Reaksi fosfomolibdat dan fosfotungstat ditunjukkan dalam Gambar 2.4. (Purwanto, 2014; Yenrina, 2015)

Metode Lowry telah digunakan oleh Praira (2008) untuk menentukan kadar protein pada obat tablet yang mengandung gelatin, dihasilkan konsentrasi protein yang cukup besar, antara 0,02% – 12,56% (b/b). Handoko, dkk (2011) melaporkan bahwa kadar protein *fish glue* dari limbah ikan tenggiri dengan waktu ekstraksi 4 jam dan suhu 45 °C adalah 78,5117 ppm. Chanchareern, dkk (2016)

melaporkan bahwa *jellyfish* gelatin tipe A memiliki kadar protein 203,12 mg/mL dan *jellyfish* gelatin tipe B memiliki kadar protein 350,02 mg/mL.



Gambar 2.3 Pembentukan kompleks antara ikatan peptida dengan ion Cu²⁺, kemudian Cu²⁺ direduksi menjadi Cu⁺ dalam suasana basa (Purwanto, 2014)



Gambar 2.4 Reaksi reduksi fosfomolibdat dan fosfotungstat menjadi tungsten dan molibdenum (Handayani, 2010)

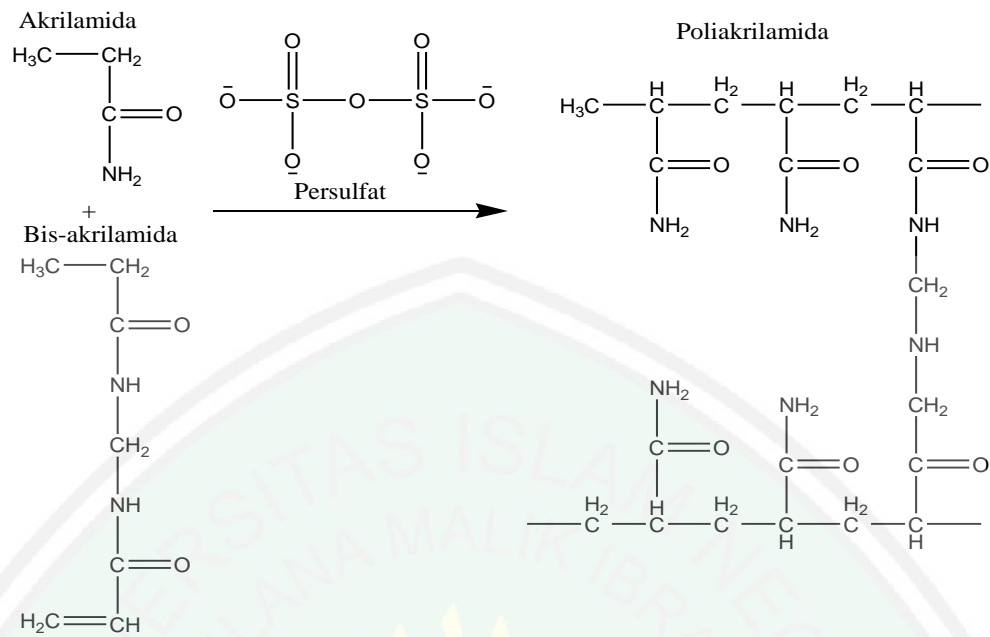
2.3.2 Analisis Berat Molekul Protein Menggunakan SDS-PAGE

Elektroforesis gel poliakrilamida atau *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) adalah teknik yang sering digunakan di bidang biokimia, forensik, genetika, biologi molekuler, dan bioteknologi. Fungsinya adalah untuk memisahkan makromolekul biologis, seperti protein atau DNA, berdasarkan kemampuannya bergerak dalam medan listrik (Maftuchah dkk, 2015). SDS-PAGE

menggunakan gel tris-glisin yang terdiri dari *stacking gel* dan *resolving gel*, dimana berbagai presentase gel akrilamida digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Metode ini juga menggunakan sistem *discontinuous buffer* dimana pH dan kekuatan ion pada buffer yang digunakan untuk *running* adalah Tris pH 8,3, buffer yang digunakan pada *stacking gel* adalah Tris pH 6,6 dan *resolving gel* adalah Tris pH 8,8 (Roy & Kumar, 2012).

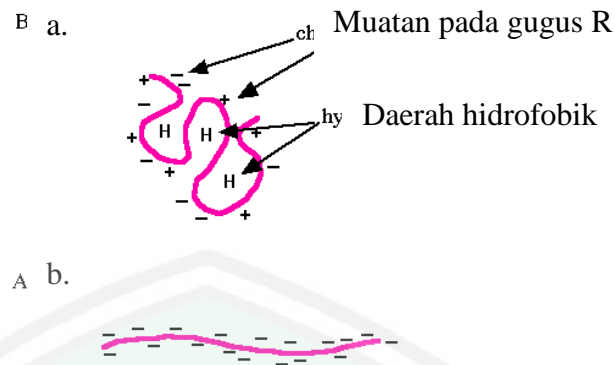
Gel yang digunakan untuk proses elektroforesis adalah sejenis radikal bebas hasil reaksi polimerisasi dari akrilamida (C_3H_5NO), dengan bis-akrilamida (*N,N'*-Methylenebisacrylamide) ($C_7H_{10}N_2O_2$) (Maftuchah dkk, 2015). Poliakrilamida memiliki kelebihan dibanding dengan gel yang lain. Kelebihannya adalah tidak bereaksi dengan sampel dan tidak membentuk matriks dengan sampel sehingga tidak menahan sampel yang bergerak sehingga mempunyai daya pemisahan yang cukup tinggi (Nugroho & Rahayu, 2016).

Gel akrilamida terbentuk oleh polimerisasi akrilamida dengan *cross linker* (bis akrilamida) dengan adanya katalis Tetrametiletildiamin (TEMED) dan inisiator amonium persulfat (APS) serta adanya *buffer gel* (tris) yang sesuai (Roy & Kumar, 2012). TEMED mempercepat penguraian molekul persulfat menjadi radikal bebas sulfat dan kemudian terjadi polimerisasi (Garfin, 2003). Reaksi polimerisasi gel akrilamida ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Reaksi polimerisasi pada gel poliakrilamida (Maftuchah dkk, 2015).

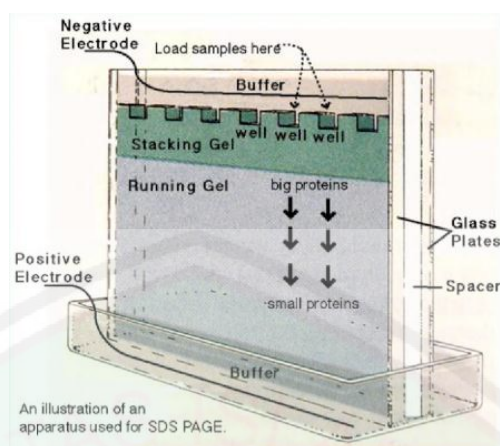
Sodium dodecyl sulphate (SDS) merupakan bagian yang penting agar protein dapat bergerak dalam arus listrik. SDS merupakan surfaktan anionik dengan rumus $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, dapat melarutkan molekul hidrofobik. Penggunaan SDS berfungsi untuk mengubah struktur protein sekunder dan tersier (Roy & Kumar, 2012). SDS yang merupakan deterjen juga berfungsi mendenaturasi protein, mengakibatkan ikatan dalam protein terputus membentuk protein yang dapat terelusi dalam gel begitu juga merkaptoetanol (Nugroho & Rahayu, 2016).



Gambar 2.6 Struktur protein sebelum penambahan SDS, huruf H menunjukkan daerah hidrofobik (a), dan setelah penambahan SDS (b) (Roy & Kumar, 2012).

Sebelum ditambah dengan SDS, protein bermuatan positif dan negatif, karena muatan pada gugus R protein. Gambar 2.6 (a) menunjukkan bahwa gugus R nonpolar telah berkumpul untuk menjauh dari air (polar) yang mengelilingi protein. Gambar 2.6 (b) menunjukkan bahwa SDS dapat mengganggu daerah hidrofobik dengan banyaknya muatan negatif yang mengelilingi setiap muatan positif protein. Protein yang dihasilkan telah terdenaturasi oleh SDS menjadi struktur primer. Perubahan struktur protein tersier menjadi primer juga dibantu oleh panas dan adanya zat pereduksi seperti β -merkaptoetanol, yang selanjutnya mendenaturasi protein dengan memutus ikatan disulfida atau rusaknya struktur protein (Roy & Kumar, 2012).

Gelatin kaki ayam memiliki berat molekul pada kisaran 120-150 kDa dan kisaran 250 kDa (Abdullah dkk, 2016). Menurut Widyasari & Saroat (2015), berat molekul gelatin kaki ayam adalah 130 dan 143 kDa. Hardikawati, dkk (2016) melaporkan bahwa gelatin kulit ayam memiliki berat molekul 120, 100, 70, 60, 50, dan 40 kDa. Skema elektroforesis SDS-PAGE ditampilkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Skema elektroforesis untuk protein (SDS-PAGE) (Syukur, 2017).

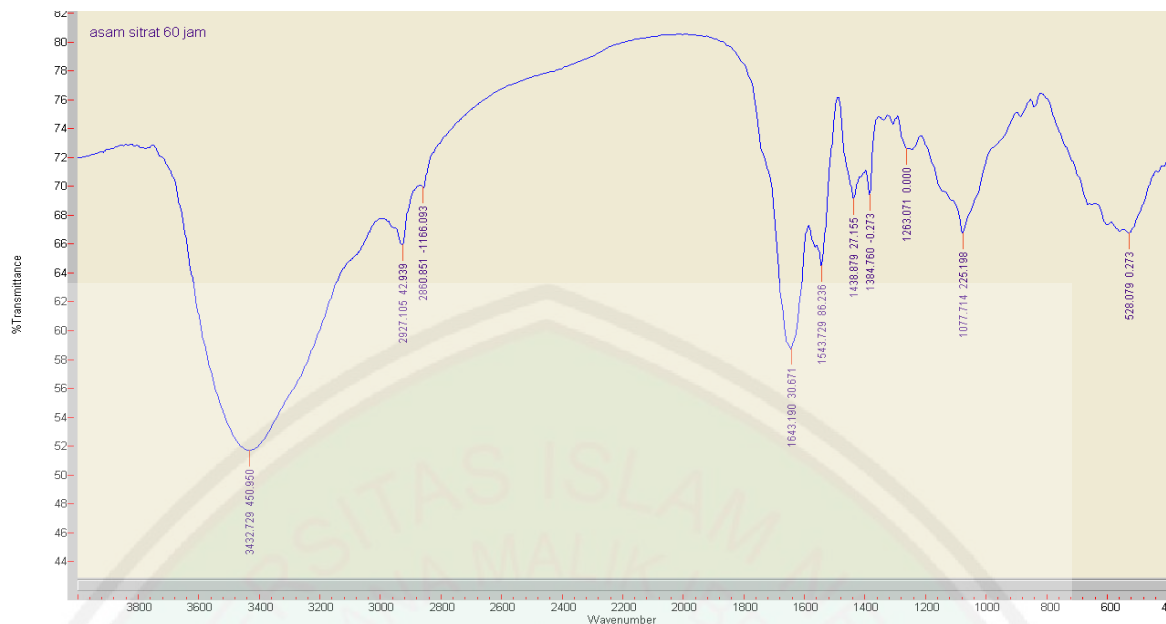
2.3.3 Identifikasi Daerah Serapan Gelatin Menggunakan FTIR

Spektrofotometri FTIR merupakan salah satu teknik spektroskopi yang paling baik untuk analisis makanan (Al-Saidi dkk, 2012). Spektrofotometri FTIR juga merupakan teknologi non-destruktif dan cepat untuk mendapatkan ciri khas biokimiawi yang memberikan informasi tentang struktur molekul dan komposisi. Spektrum inframerah menunjukkan ciri khas molekul dari suatu sampel, dimana masing-masing sampel dari sumber yang berbeda menghasilkan spektrum IR yang berbeda dan spesifik (Cebi dkk, 2016). Oleh sebab itu, Spektrofotometri IR dapat dipakai untuk mengamati gugus fungsi gelatin (Al-Saidi dkk, 2012).

Tabel 2.1 Spektra FTIR gelatin tipe A

Daerah Serapan	Bilangan Gelombang pada Gelatin (cm ⁻¹)		
	Kaki Ayam (Abdullah dkk, 2016)	Kaki Ayam (Almeida, dkk 2012)	Tulang Ayam Broiler (Mufidah, 2013)
Amida A	3287,16	3399,56	3447,18
Amida B	2929,05	2923,72	-
Amida I	1628,32	1652,01	1647,13
Amida II	1536,61	1539,87	1541,38
Amida III	1236,37	1241,29	1116,96

Menurut Almeida, dkk (2012) struktur sekunder gelatin yang diperoleh dipengaruhi oleh pengolahan menggunakan asam dan waktu ekstraksi. Bilangan gelombang dan hasil spektra FTIR gelatin tipe A ditunjukkan pada Tabel 2.1 dan Gambar 2.8. Spektra FTIR dari gelatin menunjukkan puncak utama di daerah amida. Amida I menunjukkan regangan ikatan rangkap gugus karbonil C=O, regangan CN, deformasi CCN, *bending* ikatan NH. Amida II menunjukkan regangan C-N, deformasi N-H pada gugus peptida. Amida III menunjukkan regangan C-N, deformasi N-H, kibasan gugus CH₂. Amida A memperlihatkan bahwa gugus NH dalam amida cenderung berikatan dengan regangan CH₂ jika gugus karboksilat dalam keadaan stabil. Amida B menunjukkan interaksi gugus -NH₃ antara rantai peptida (Abdullah dkk, 2016; Almeida dkk, 2012).



Gambar 2.8 Spektra FTIR gelatin tulang g ayam broiler (Rohmah, 2017).

2.4 Gelatin dalam Prespektif Hukum Islam

Proses pengolahan suatu makanan tidak bisa lepas dari pemilihan bahan makanan dan penggunaan bahan tambahan dalam makanan. Salah satu contoh bahan tambahan makanan yang digunakan adalah gelatin. Kebutuhan akan gelatin oleh dunia industri di Indonesia sebagian besar selama ini masih diperoleh dengan cara impor. Gelatin impor umumnya merupakan produk yang dihasilkan dari pengolahan tulang serta kulit hewan ternak seperti sapi, domba, dan babi. Allah berfirman dala surat Al-An'aam ayat 142:

وَمِنَ الْأَنْعَامِ حَمُولَةٌ وَفَرَشًا كُلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُواتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُّبِينٌ
(١٤٢)

Artinya: “Dan di antara hewan ternak itu ada yang dijadikan untuk pengangkutan dan ada yang untuk disembelih. makanlah dari rezki yang telah diberikan Allah kepadamu, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan. Sesungguhnya syaitan itu musuh yang nyata bagimu” (Q.S Al-An'aam : 142).

Surat Al-An'aam ayat 142 menerangkan bahwa hewan ternak (Al-An'aam) memiliki dua fungsi. Fungsi pertama adalah hewan ternak yang digunakan untuk alat angkut atau alat transportasi (*Hamulatan*), contohnya yaitu kuda, sapi, dan keledai. Fungsi kedua adalah hewan ternak yang dijadikan sebagai hewan potong (*Farsy*). Kata (*Farsy*) yang diartikan sebagai hewan ternak kecil karena tubuhnya hampir menyentuh tanah, dan bisa disembelih, contohnya yaitu kambing, domba dan sapi (Shihab, 2002).

Bahan tambahan makanan yang berasal dari binatang mungkin akan menimbulkan keraguan bagi umat Islam. Hal ini dikarenakan status halal makanan tersebut tergantung pada hewan dan cara penyembelihan yang dilakukan. Alternatif yang dapat digunakan untuk membuat gelatin halal salah satunya yaitu menggunakan tulang ayam broiler sebagai bahan bakunya (Zulaekah & Kusumawati, 2005). Allah berfirman dalam surat Al-Maidah ayat 88:

وَكُلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ حَلالًا طَيِّبًا وَاتَّقُوا اللَّهَ الَّذِي أَنْتُمْ بِهِ مُؤْمِنُونَ (٨٨)

Artinya: “Dan makanlah makanan yang halal lagi baik dari apa yang Allah telah rezezikikan kepadamu, dan bertakwalah kepada Allah yang kamu beriman kepada-Nya” (Q.S Al-Maaidah : 88).

Surat Al-Maidah ayat 88 menerangkan tentang perintah mengkonsumsi makanan yang halal serta baik, dan juga disertai perintah berbuat ketaatan, mengharapkan ridha-Nya. Allah SWT memerintah hamba-Nya mengkonsumsi makanan yang halal dan bersamaan dengan itu juga melarang mengkonsumsi makanan yang sudah rusak, kotor serta mengandung dosa memperolehnya dengan cara yang haram, contohnya dengan korupsi, suap, riba dan lain sebagainya.

Mengonsumsi makanan yang baik juga menjadi saah satu syarat terkabulnya do'a, Rasulullah SAW bersabda:

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ قَالَ: قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ إِنَّ اللَّهَ تَعَالَى طَيِّبٌ لَا يَقْبَلُ إِلَّا طَيِّبًا وَإِنَّ اللَّهَ أَمَرَهُ الْمُرْسَلِينَ فَقَالَ تَعَالَى يَا أَيُّهَا الرَّسُولُ كُلُوا مِنَ الطَّيِّبَاتِ وَاعْلَمُوا صَالِحًا. وَقَالَ يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا كُلُوا مِنَ الطَّيِّبَاتِ مَا رَزَقْنَاكُمْ ثُمَّ ذَكَرَ الرَّجُلَ يُطِينُ السَّقْفَ أَشْعَثَ أَغْبَرَ يَمُدُّ يَدَيْهِ إِلَى السَّمَاءِ يَا رَبِّ وَمَطْعَمَهُ حَرَامٌ وَمَسْرَبُهُ حَرَامٌ وَمَلْبَسُهُ حَرَامٌ وَغَدَى بِالْحَرَامِ فَأَنَّ يُسْتَجَالَه (رواه مسلم).

Dari Abu Hurairah r.a. ia berkata, “ *Rasullullah SAW bersabda, sesungguhnya Allah itu baik, tidak menerima kecuali yang baik. Dan sesungguhnya Allah telah memerintahkan pada orang – orang mukmin seperti apa yang telah diperintahkan-Nya kepada Rosul, maka Allah berfirman: Hai para Rasul, makanlah kamu semua dari sesuatu yang baik dan berbuatlah kamu yang baik. Dan firman Allah yang lain: Hai orang – orang yang beriman, makanlah kamu semua dari sebaik – baik apa yang telah Ku-rezekikan kepadamu. Kemudian Nabi SAW menceritakan seseorang lelaki yang telah jauh perjalanannya dengan rambutnya yang kusut, kotor, penuh debu, yang menadahkan kedua tangannya seraya berkata (berdo'a): Wahai tuhanku, sedangkan makanannya haram minumannya haram, pakaiannya haram dan dikenyangkan barang yang haram, mana mungkin ia akaaan dikabulkan do'anya?*” (HR. Muslim).

Menurut Al-Shabuni (1999), makanan yang disebut dalam Al-Qur'an dengan kalimat *tha'am* merupakan sesuatu yang dimakan atau dicicipi. Kata *tha'am* (makanan) yang digunakan sudah mencakup minuman didalamnya (Shihab, 1997). Kriteria makanan halal dapat ditinjau dari dua hal. Pertama adalah kandungan zatnya, makanan atau minuman harus bersih (suci) jauh dari najis, dan kotoran. Kedua adalah cara mendapatkannya, Islam mengharamkan setiap penganutnya mencari ataupun mendapatkan makanan melalui jalan salah seperti mencuri, merampas kepunyaan orang lain, korupsi dan lain sebagainya.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2017 - Februari 2018 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi seperangkat alat gelas seperti, gelas arloji, pengaduk gelas, labu ukur, gelas beaker, tabung reaksi, dan kuvet. Seperangkat alat elektroforesis SDS-PAGE, neraca analitik, spatula, vortex, sentrifuge, shaker, mikropipet, tip, tube, *waterbath*, hotplate. Instrumen yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis, dan FTIR.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah gelatin tulang ayam hasil hidrolisis dengan asam sitrat. Bahan kimia yang digunakan untuk presipitasi adalah aseton 20, 40, 60, 80%, dan akuades. Bahan-bahan yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah Bovin Serum Albumin (BSA), dan pereaksi lowry (2% Na_2CO_3 , NaOH 0,1 N, 1% Na K Tartrat, 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan reagen Folin Ciocalteu). Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis SDS-PAGE adalah 30% (b/v) akrilamid/bis-akrilamid, 10% (b/v) SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*), 10% (b/v) APS (Amonium Persulfat), N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED), β -

mercaptoethanol, tris-HCl, gliserol, 0,5% (b/v) *bromophenol blue*, marker protein, buffer elektroforesis SDS-PAGE pH 8,3, larutan *staining* (0,025 (w/v) *coomassie brilliant blue* R-250, 40% (v/v) metanol dan 10% (v/v) asam asetat glasial) dan larutan *destaining* (40% (v/v) metanol, 10% (v/v) asam asetat glasial). Bahan yang digunakan untuk FTIR adalah KBr.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Presipitasi protein gelatin menggunakan aseton
2. Penentuan kadar protein gelatin menggunakan metode Lowry
3. Penentuan berat molekul protein gelatin menggunakan SDS-PAGE
4. Identifikasi daerah serapan menggunakan FTIR
5. Analisis data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pemurnian Protein Menggunakan Aseton

Gelatin sebanyak 1 g dilarutkan dalam 10 mL akuades pada suhu 50°C sampai larut. Kemudian larutan sampel divortex pada suhu ruang (Aina dkk, 2013). Sebanyak 2 mL sampel ditambahkan dengan 8 mL aseton 20% yang telah didinginkan pada suhu -20°C, kemudian divortex. Pengendapan dilakukan dengan membiarkan campuran selama semalam pada suhu -20°C. Setelah itu, campuran gelatin dengan aseton disentrifugasi untuk memisahkannya. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan

endapan protein dikeringkan untuk menghilangkan aseton. Perlakuan di atas diulangi untuk konsentrasi aseton 40%, 60%, dan 80% (Azira dkk, 2012).

3.4.2 Penentuan Kadar Protein Gelatin Menggunakan Metode Lowry (Lowry dkk, 1951)

3.4.2.1 Pembuatan Pereaksi Lowry

Pereaksi Lowry terdiri dari pereaksi A, B, C, dan D. Pereaksi A terdiri dari 2% Na_2CO_3 dalam 0,1 N NaOH. Pereaksi B terdiri dari 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 1% Na K Tartrat. Pereaksi C dibuat dari campuran 50 mL pereaksi A dan 1 mL pereaksi B. Pereaksi D dibuat dari campuran reagen Folin Ciocalteu dan akuades dengan perbandingan 1 : 1.

3.4.2.2 Pembuatan Larutan Standar

Larutan standar BSA dibuat dalam berbagai konsentrasi yaitu 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; dan 0,1 mg/mL. Sebelum larutan standar diukur absorbansinya, maka diambil salah satu larutan standar untuk digunakan dalam penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan standar dengan konsentrasi 0,06 mg/mL kemudian digunakan untuk penentuan panjang gelombang maksimum.

3.4.2.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 1 mL larutan standar 0,06 mg/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan akuades 3 mL. Larutan standar ditambah dengan 5,5 mL pereaksi C, diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit. Setelah itu, ditambah dengan pereaksi D sebanyak 0,5 mL, kemudian diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya, larutan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm.

3.4.2.4 Pembuatan Kurva Standar

Larutan standar 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; dan 0,1 mg/mL ditambah dengan reagen Lowry sebagaimana yang dijelaskan pada tahapan 3.4.2.3. Selanjutnya absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum. Berdasarkan absorbansi sederetan larutan standar tersebut, maka dapat dibuat kurva standar dengan sumbu X sebagai konsentrasi dan sumbu Y sebagai absorbansi.

3.4.2.5 Penentuan Kadar Protein dalam Sampel

Sebanyak 1 mL larutan sampel dan 5,5 mL pereaksi C dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan akuades 3 mL. Campuran diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit. Selanjutnya, campuran tersebut ditambah dengan 0,5 mL pereaksi D, lalu diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu, campuran tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Penentuan kadar protein dalam sampel dilakukan dengan tiga kali perlakuan.

3.4.3 Penentuan Berat Molekul Protein Gelatin Menggunakan SDS-PAGE

3.4.3.1 Pembuatan Gel SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

Gel elektroforesis SDS-PAGE dibuat dengan komposisi 7,5% *resolving gel* dan 4% *stacking gel*. *Resolving gel* 7,5% dibuat dengan mencampur 7,28 mL akuades dan 30% Akrilamid/bis akrilamid sebanyak 3,75 mL, kemudian ditambahkan 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 sebanyak 3,75 mL dan 10% SDS sebanyak 150 μ L, kemudian ditambah 10% APS sebanyak 75 μ L, setelah itu ditambahkan 7,5 μ L TEMED. *Stacking Gel* 4% dibuat dengan mencampur 9 mL akuades dan 30% Akrilamid/bis akrilamid sebanyak 1,98 mL, kemudian ditambahkan 0,5 M

Tris-HCl pH 6,8 sebanyak 3,78 mL dan 10% SDS sebanyak 150 μ L, kemudian ditambah 10% APS sebanyak 75 μ L, setelah itu ditambahkan 15 μ L TEMED. Komposisi gel elektroforesis SDS-PAGE dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi Gel Elektroforesis SDS-PAGE

Bahan	Resolving Gel 7,5%	Stacking Gel 4%
30% Akrilamid/bis akrilamid	3,75 mL	1,98 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	3,78 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,75 mL	-
10% SDS	150 μ L	150 μ L
Akuades	7,28 mL	9 mL
TEMED	7,5 μ L	15 μ L
10% APS	75 μ L	75 μ L
Total	15 mL	15 mL

3.4.3.2 Preparasi dan *Running* Sampel (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

Preparasi dilakukan dengan menambahkan 5 μ L sampel protein gelatin ke dalam 5 μ L RSB (*Reducing Sample Buffer*) dengan perbandingan 1:1 (v/v), kemudian dipanaskan pada suhu 90°C selama 5 menit. Sampel didinginkan pada suhu ruang dan dimasukkan ke dalam sumur gel, sedangkan marker protein yang digunakan adalah 5 μ L. *Running* dilakukan pada tegangan 120 V selama \pm 80 menit dalam *running* buffer.

3.4.3.3 Pewarnaan Gel (Mahasri dkk, 2010)

Gel hasil *running* direndam dalam larutan pewarna (*staining*). Proses *staining* dilakukan selama 30 menit sambil di-*shaker*. Kemudian gel dicuci dengan aquades, lalu direndam dengan larutan *destaining* selama semalam.

3.4.4 Identifikasi Daerah Serapan Menggunakan FTIR (Puspawati dkk, 2012)

Sampel gelatin sebanyak 2 mg dicampur dengan 100 mg serbuk KBr kemudian ditumbuk hingga halus. Setelah itu, campuran tersebut dipadatkan di sebuah cetakan menggunakan pompa hidrolik sehingga membentuk pelet. Karakterisasi dilakukan dengan spektrofotometer FTIR pada panjang gelombang 4000 – 500 cm⁻¹.

3.5 Analisis Data

Perhitungan dilakukan pada marker dengan menentukan nilai *Retardation factor* (Rf). Perhitungan nilai *Retardation factor* (Rf) dilakukan dengan menggunakan persamaan (Mahasri dkk, 2010):

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}} \quad (3.1)$$

Setelah itu, nilai Rf dan nilai log Berat Molekul (BM) marker dimasukkan dalam persamaan regresi linier dengan rumus: $y = a + bx$, dimana y adalah berat molekul dan x adalah nilai Rf sampel. Data kadar protein dianalisis dengan ANOVA *Two way* SPSS 16 dan dilanjutkan dengan uji BNT. Spektra FTIR yang diperoleh dianalisis secara deskriptif yaitu dengan menjelaskan karakteristik yang dimiliki objek penelitian.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemurnian Protein Gelatin Menggunakan Pelarut Aseton

Pemurnian protein yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode presipitasi. Tujuan dari pemurnian adalah untuk memaksimalkan hasil pita protein pada proses elektroforesis SDS-PAGE. Pemurnian protein dilakukan dengan menambahkan pelarut organik seperti aseton dan etanol. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah aseton 20, 40, 60, dan 80%.

Preparasi sampel dilakukan dengan melarutkan gelatin dalam air dengan cara dipanaskan. Pencampuran protein gelatin dan air akan membentuk suatu sistem koloid, terdiri dari protein sebagai zat terdispersi dan air sebagai pendispersi. Protein yang tersusun atas asam amino dan mempunyai muatan dan terdispersi dalam air yang polar maka membentuk koloid dengan baik. Agar koloid dapat bergerak perubahan kimia larutan harus menghasilkan gaya tolak menolak pada permukaan koloid, gaya tolak menolak tersebut lebih besar dibanding gaya tarik menarik (Sriwahyuni, 2010). Penambahan larutan organik seperti aseton pada menyebabkan stabilitas koloid terganggu. Terganggunya stabilitas koloid tersebut terjadi karena gaya tarik menarik antar koloid mengakibatkan terjadinya pengendapan protein (Prihatinningtyas & Agus, 2013).

Pengendapan protein juga dipengaruhi oleh konstanta dielektrik pelarut. Air memiliki konstanta dielektrik 80 sedangkan aseton memiliki konstanta dielektrik 20,7. Hal tersebut menunjukkan bahwa jika dibanding dengan air, aseton kurang memiliki muatan sehingga kurang disukai protein untuk

membentuk koloid. Penambahan aseton menyebabkan interaksi antara aseton dengan air jauh lebih kuat daripada air dengan protein, sehingga protein akan terhidrasi (Prabu & Suriyaprakash, 2012; Saifudin, 2014).

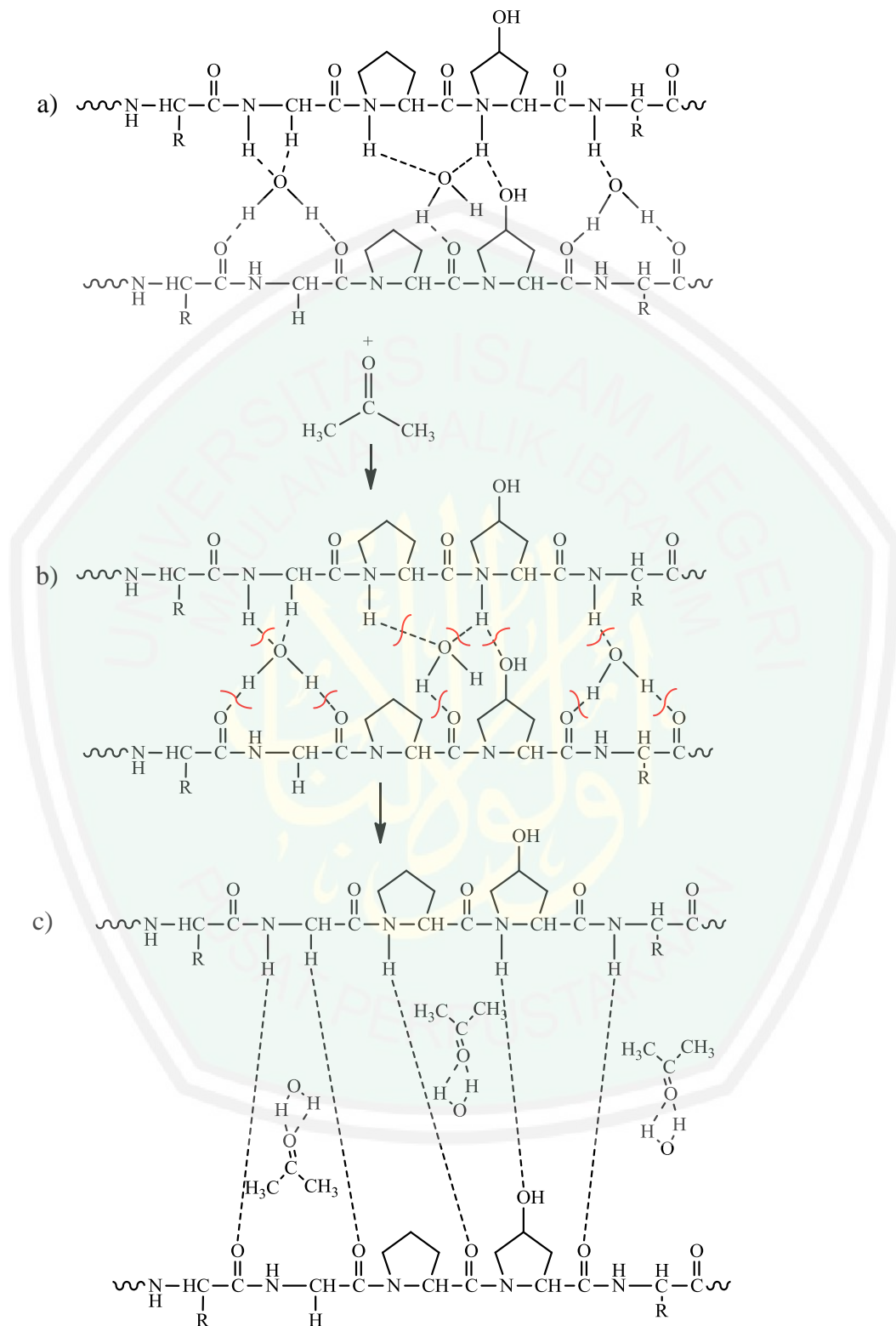


Gambar 4.1 Hasil pemurnian gelatin dengan aseton 20, 40, 60, dan 80%.

Konsentrasi aseton yang digunakan berpengaruh terhadap pengendapan protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi aseton yang digunakan maka protein yang diendapkan akan semakin banyak (Gambar 4.1). Semakin tinggi konsentrasi aseton, semakin tidak mampu untuk mendispersi protein, sehingga protein akhirnya mengendap. Banyaknya protein yang mengendap dibuktikan dengan tingginya kadar protein yang dihasilkan (Tabel 4.1). Marino, dkk (2015) melaporkan bahwa pemurnian dengan etanol (pelarut organik) 60, 75, dan 90% pada enzim glikosil hidrolase memiliki kadar protein berturut-turut adalah 36,4; 81,7; dan 94,2 %. Pemurnian dengan konsentrasi aseton terbaik dapat diketahui dari kadar protein yang ditentukan dengan metode Lowry. Selain itu juga digunakan elektroforesis SDS-PAGE untuk mengetahui pita protein yang terbentuk.

Interaksi antara gelatin, air dan aseton ditunjukkan pada Gambar 4.2. Poin (a) menjelaskan bahwa ketika gelatin dilarutkan dalam air maka akan membentuk ikatan hidrogen. Poin (b), penambahan aseton ke dalam larutan gelatin akan menyebabkan ikatan hidrogen antara gelatin dan air putus. Poin (c), air akan membentuk ikatan hidrogen baru dengan aseton. Adapun protein akan membentuk interaksi antar molekul protein yang lain sehingga protein dapat mengendap. Selain interaksi hidrogen, pengendapan protein juga dipengaruhi oleh adanya gaya tarik menarik London- van der Waals antara permukaan koloid (Sriwahyuni, 2010).

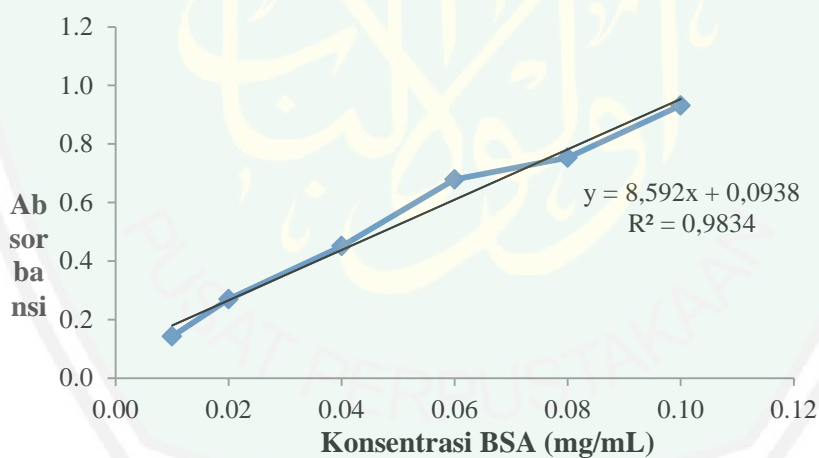




Gambar 4.2 Dugaan interaksi antara gelatin, air dan aseton (a) ikatan hidrogen antara gelatin dan air, (b) Terputusnya ikatan hidrogen antara gelatin dan air karena adanya penambahan aseton, (c) terbentuk ikatan hidrogen antara air dan aseton, serta interaksi antara molekul protein.

4.2 Penentuan Kadar Protein Gelatin Menggunakan Metode Lowry

Prinsip metode Lowry yaitu pembentukan kompleks antara ikatan peptida pada protein dengan ion Cu^{2+} dalam kondisi basa. Ion Cu^{2+} direduksi menjadi ion Cu^+ . Ion Cu^+ akan mereduksi reagen Folin Ciocalteu menghasilkan warna biru. Warna biru yang terbentuk merupakan hasil reduksi asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat oleh tirosin. Penentuan kadar protein gelatin hasil pemurnian menggunakan aseton 20, 40, 60, dan 80% adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi aseton yang digunakan. Penentuan kadar protein sampel dapat diketahui dengan pembuatan kurva standar (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Grafik kurva standar protein

Berdasarkan Tabel 4.2, kadar protein gelatin 12-60 jam sebelum dimurnikan (ekstrak kasar) lebih tinggi jika dibanding dengan gelatin hasil pemurnian. Pemurnian gelatin dengan aseton 80% menghasilkan kadar protein yang paling tinggi. Tingginya kadar protein tersebut menunjukkan bahwa hanya

sedikit protein yang terbuang pada saat proses pemurnian. Hal tersebut disebabkan karena konsentrasi aseton yang tinggi tidak mampu untuk mendispersi protein dengan baik sehingga protein lebih banyak yang mengendap.

Tabel 4.1 Kadar Protein Gelatin

Sampel Gelatin	Variasi Konsentrasi Aseton	Kadar Protein (mg/mL)
12 jam	Ekstrak Kasar	0,086±0,0014 ^d
	20%	0,015±0,0034 ^a
	40%	0,014±0,0018 ^a
	60%	0,023±0,0009 ^b
	80%	0,085±0,0039 ^c
24 jam	Ekstrak Kasar	0,101±0,0006 ^d
	20%	0,015±0,0018 ^a
	40%	0,014±0,0005 ^a
	60%	0,026±0,0031 ^b
	80%	0,097±0,0062 ^c
36 jam	Ekstrak Kasar	0,101±0,0008 ^d
	20%	0,023±0,0026 ^a
	40%	0,020±0,0048 ^a
	60%	0,033±0,0078 ^b
	80%	0,072±0,0047 ^c
48 jam	Ekstrak Kasar	0,095±0,0039 ^d
	20%	0,016±0,0042 ^a
	40%	0,015±0,0013 ^a
	60%	0,046±0,0055 ^b
	80%	0,079±0,0039 ^c
60 jam	Ekstrak Kasar	0,093±0,0101 ^d
	20%	0,019±0,0057 ^a
	40%	0,024±0,0017 ^a
	60%	0,024±0,0054 ^b
	80%	0,068±0,0082 ^c

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$).

Sampel yang dimurnikan dengan aseton 20, 40, dan 60% memiliki kadar protein yang rendah. Rendahnya kadar protein menunjukkan bahwa banyak protein yang terbuang saat proses pemurnian. Hal tersebut disebabkan karena

konsentrasi aseton yang semakin rendah memiliki kemampuan untuk mendispersi protein dengan baik sehingga protein kurang mengendap.

Kadar protein yang telah didapatkan diuji statistik dengan Anova *Two way* menggunakan SPSS. Berdasarkan analisis tersebut menunjukkan adanya pengaruh variasi konsentrasi aseton terhadap kadar protein gelatin, dengan nilai $p < 0,05$.

4.3 Penentuan Berat Molekul Protein Gelatin Menggunakan Elektroforesis SDS-PAGE

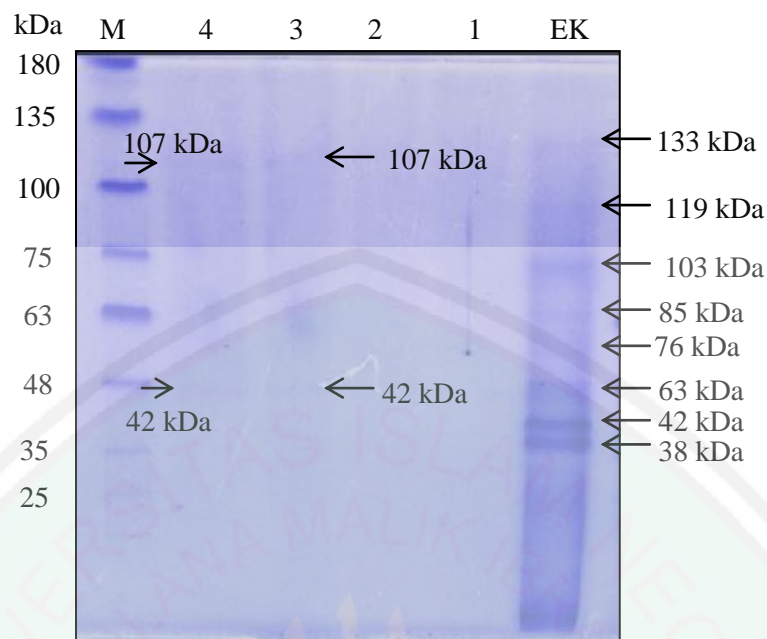
Karakterisasi molekul gelatin bertujuan untuk mengetahui hasil pemurnian yang dapat dilihat dengan adanya pita protein pada gelatin tulang ayam, berat molekul, dan intensitas pita yang terbentuk. Pita protein tulang ayam dapat diketahui dengan menentukan berat molekulnya. Berat molekul diketahui dengan menentukan nilai R_f yang digunakan untuk membuat kurva standar marker sehingga berat molekul dapat diketahui.

Terdapat lima sampel yang digunakan yaitu gelatin 12, 24, 36, 48, dan 60 jam. Masing-masing sampel ekstrak kasar memiliki 4 hingga 8 pita protein dengan berat molekul kisaran 31-138 kDa. Hasil pemurnian gelatin dengan aseton 20 dan 40% menunjukkan bahwa tidak terdapat pita protein. Gelatin yang dimurnikan dengan aseton 60% memiliki 1 hingga 2 pita protein dengan berat molekul kisaran 42-137 kDa. Gelatin yang dimurnikan dengan aseton 80% memiliki 2 hingga 5 pita protein dengan berat molekul kisaran 31-138 kDa (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Berat molekul gelatin tulang ayam

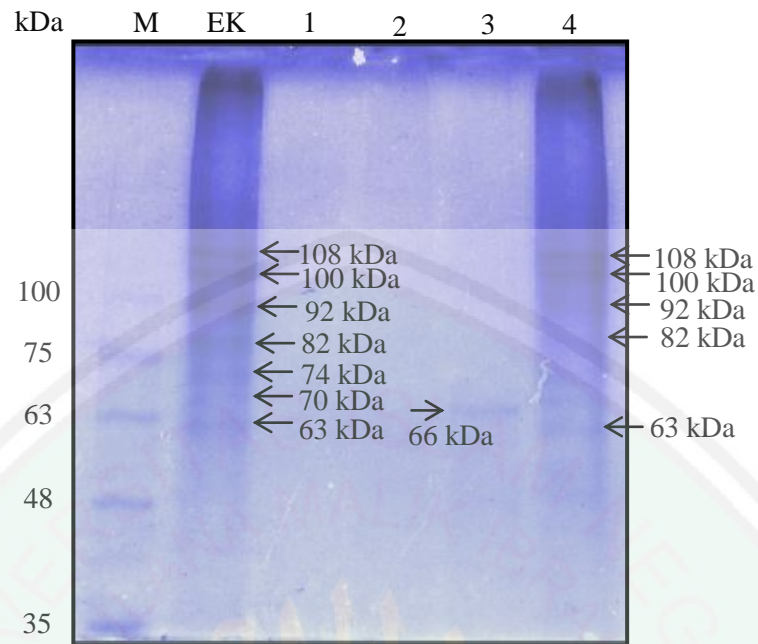
Sampel	Berat Molekul (kDa)				
	EK	Aseton 20%	Aseton 40%	Aseton 60%	Aseton 80%
12 jam	133			107	107
	119			42	42
	103				
	85	-	-		
	76				
	63				
	42				
	38				
24 jam	108			66	108
	100				100
	92				92
	82	-	-		82
	74				63
	70				
	63				
36 jam	132				132
	111				111
	97				84
	84	-	-	-	66
	66				31
	31				
48 jam	137			137	137
	128				128
	116				116
	113	-	-		113
	98				
	83				
	66				
60 jam	138				138
	120				120
	105	-	-	-	105
	66				

Keterangan: EK = ekstrak kasar



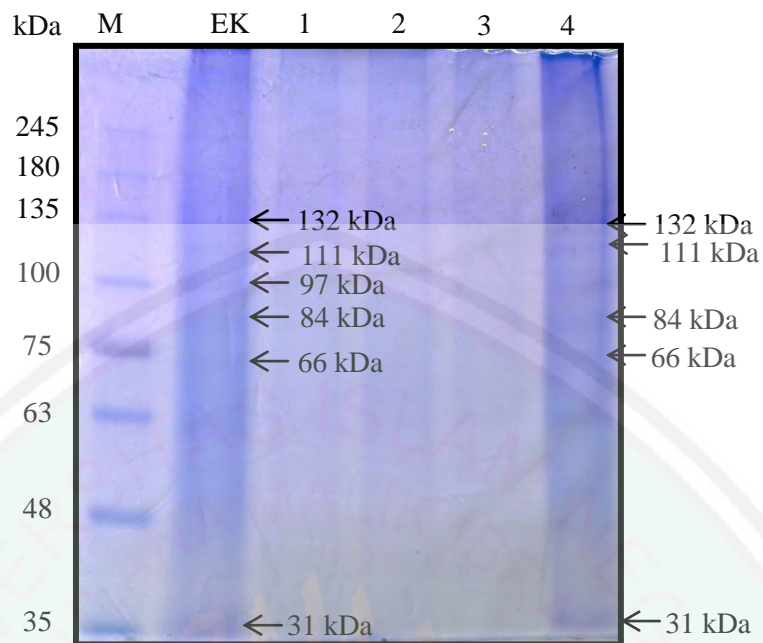
Gambar 4.4 Hasil elektroforesis gelatin 12 jam. Keterangan: M = marker, EK = ekstrak kasar, 1 = aseton 20%, 2 = aseton 40%, 3 = aseton 60%, dan 4 = aseton 80%.

Gelatin tulang ayam memiliki pita protein tertentu. Sampel gelatin 12 jam sebelum dimurnikan (ekstrak kasar) menunjukkan bahwa terdapat delapan pita yang muncul, yaitu 38, 42, 63, 76, 85, 103, 119, dan 133 kDa. Setelah dilakukan pemurnian pada gelatin tersebut terdapat pita yang hilang. Gambar 4.4 menunjukkan bahwa tidak terdapat pita protein pada gelatin yang telah dimurnikan dengan aseton 20 dan 40%. Dua pita sama yang muncul pada gelatin yang telah dimurnikan menggunakan aseton 60 dan 80% yaitu pada 42 dan 107 kDa.



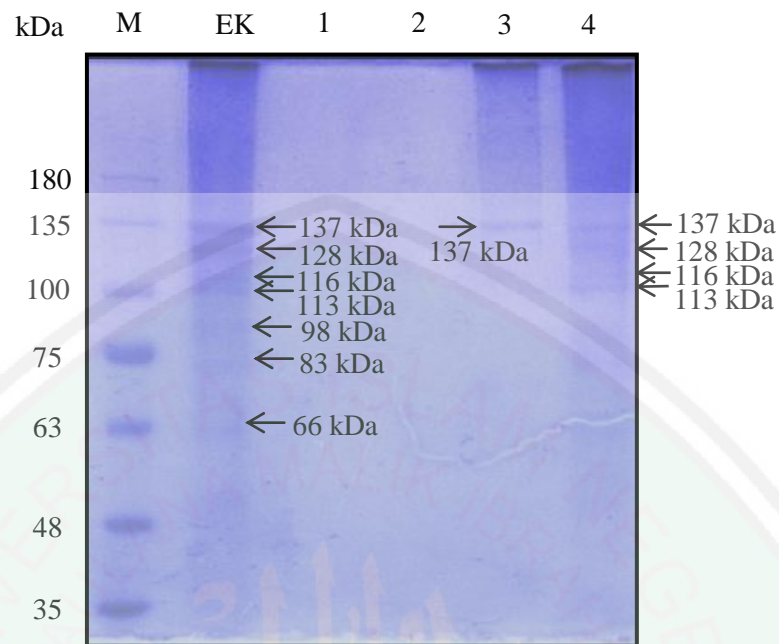
Gambar 4.5 Hasil elektroforesis gelatin 24 jam. Keterangan: M = marker, EK = ekstrak kasar, 1 = aseton 20%, 2 = aseton 40%, 3 = aseton 60%, dan 4 = aseton 80%.

Sampel gelatin 24 jam (Gambar 4.5) menunjukkan bahwa pada ekstrak kasar terdapat tujuh pita, yaitu 63, 70, 74, 82, 92, 100, 108 kDa. Pita protein tidak muncul pada gelatin yang dimurnikan dengan aseton 20 dan 40%. Gelatin yang dimurnikan dengan aseton 80% memiliki lima buah pita, yaitu pada 63, 82, 92, 100, dan 108 kDa. Berbeda halnya dengan gelatin yang dimurnikan dengan aseton 80%, gelatin yang dimurnikan dengan aseton 60% hanya menghasilkan satu pita yaitu pada 66 kDa.



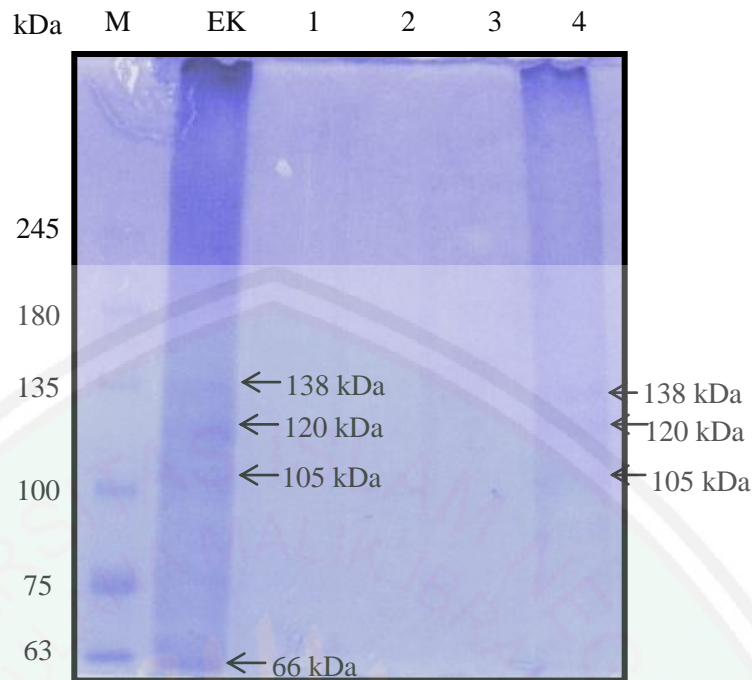
Gambar 4.6 Hasil elektroforesis gelatin 36 jam. Keterangan: M = marker, EK = ekstrak kasar, 1 = aseton 20%, 2 = aseton 40%, 3 = aseton 60%, dan 4 = aseton 80%.

Ekstrak kasar gelatin 36 jam memiliki enam pita protein, yaitu pada 31, 66, 84, 97, 111, dan 132 kDa. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.6, gelatin yang dimurnikan dengan aseton 20, 40, dan 60% tidak memiliki pita protein. Namun, pada gelatin yang dimurnikan dengan aseton 80% memiliki lima pita protein, yaitu 31, 66, 84, 111, dan 132 kDa.



Gambar 4.7 Hasil elektroforesis gelatin 48 jam. Keterangan: M = marker, EK = ekstrak kasar, 1 = aseton 20%, 2 = aseton 40%, 3 = aseton 60%, dan 4 = aseton 80%.

Hasil elektroforesis pada Gambar 4.7 menunjukkan bahwa ekstrak kasar memiliki tujuh pita protein pada berat molekul 66, 83, 98, 113, 116, 128, dan 137 kDa. Gelatin yang dimurnikan dengan aseton 20 dan 40% tidak memiliki pita. Hanya terdapat satu pita protein pada gelatin yang dimurnikan dengan aseton 60% yaitu pada berat molekul 137 kDa. Gelatin yang dimurnikan dengan aseton 80% memiliki empat pita protein, pada berat molekul 113, 116, 128, dan 137 kDa.



Gambar 4.8 Hasil elektroforesis gelatin 60 jam. Keterangan: M = marker, EK = ekstrak kasar, 1 = aseton 20%, 2 = aseton 40%, 3 = aseton 60%, dan 4 = aseton 80%.

Ekstrak kasar pada sampel ini (Gambar 4.8) memiliki empat pita protein dengan berat molekul 66, 105, 120, dan 138 kDa. Hanya pada gelatin yang dimurnikan dengan aseton 80% yang memiliki pita protein, sedangkan yang dimurnikan dengan aseton 20, 40, dan 60% tidak menghasilkan pita protein. Pita protein yang muncul pada gelatin yang dimurnikan dengan aseton 80% memiliki berat molekul 105, 120, dan 138 kDa.

Berat molekul ekstrak kasar sampel 12 jam (Gambar 4.4) menunjukkan bahwa karakteristik pita gelatin tulang ayam berada pada berat molekul 103-133 kDa. Berbeda halnya dengan sampel 12 jam, sampel 24 jam (Gambar 4.5) dan sampel 36 jam (Gambar 4.6) masing-masing memiliki berat molekul 100 dan 108 kDa, serta 111 dan 132 kDa. Sampel 48 jam (Gambar 4.7) memiliki karakteristik pita gelatin tulang ayam pada 113-137 kDa, sedangkan sampel 60 jam (Gambar

4.8) karakteristik pita gelatinnya terdapat pada 105-138 kDa. Menurut Abdullah, dkk (2016), gelatin kaki ayam memiliki berat molekul pada kisaran 120-150 kDa. Menurut Widyasari & Saroat (2015), gelatin kaki ayam memiliki karakteristik pada berat molekul 130 dan 143 kDa. Du, dkk (2013) melaporkan bahwa gelatin kepala ayam memiliki karakteristik berat molekul sekitar 134 dan 120 kDa.

Berdasarkan Gambar 4.3 – 4.7 dapat dilihat bahwa setelah dilakukan pemurnian terdapat beberapa pita protein yang hilang. Pemurnian menggunakan aseton 60 dan 80% menunjukkan bahwa terdapat karakteristik gelatin tulang ayam pada berat molekul 107 kDa (gelatin 12 jam), dan 113-137 kDa (gelatin 48 jam). Sampel gelatin 24, 36, dan 60 jam yang dimurnikan dengan aseton 80% menunjukkan bahwa masih terdapat pita protein yang menunjukkan karakteristik gelatin tulang ayam pada berat molekul 100 dan 108 kDa (gelatin 24 jam), 111 dan 132 kDa (gelatin 36 jam), dan 105-138 kDa (gelatin 60 jam). Gelatin yang dimurnikan dengan aseton 20 dan 40% diketahui bahwa tidak terbentuk pita protein, hal tersebut dikarenakan kadar proteinnya yang terlalu rendah (Tabel 4.1).

Pre-treatment dan ekstraksi yang dilakukan saat pembuatan gelatin menyebabkan gelatin memiliki rantai polipeptida dengan komposisi dan berat molekul yang berbeda. Umumnya gelatin terdiri dari α -chain, β -chain, γ -chain, dan beberapa dengan berat molekul yang lebih rendah. β -chain merupakan dimer dari α -chain, dan γ -chain merupakan trimer dari α -chain (Abdullah dkk, 2016; Haug & Draget, 2011). Adanya α -chain menunjukkan bahwa kolagen yang memiliki struktur *triple helix* saat diekstraksi berubah menjadi *single helix* yang merupakan struktur dari gelatin.

Berdasarkan hasil elektroforesis, menunjukkan gelatin tulang ayam terdiri dari α -chain (Gambar 4.8), dengan berat molekul pada kisaran 100 kDa. Terdapat 2 α -chain pada sampel gelatin 36 jam, α_1 (132 kDa) dan α_2 (111 kDa). Sampel gelatin 48 jam menunjukkan adanya α_1 -chain dengan berat molekul 128 dan 137 kDa, sedangkan α_2 -chain dengan berat molekul pada 113 dan 116 kDa. Sampel gelatin 60 jam memiliki α_1 dengan berat molekul 138 kDa, dan α_2 dengan berat molekul 120 kDa. Selain α -chain, terdapat pita yang memiliki berat molekul rendah, yaitu berat molekul di bawah 100 kDa (Tabel 4.9), pita dengan berat molekul rendah menunjukkan bahwa terjadi depolimerisasi α -chain menjadi sub- α -chain (Haug & Draget, 2011).



Gambar 4.9 Struktur gelatin α -chain. Sumber: <http://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/chapt07/sim1.htm>.

Hasil karakterisasi dengan menentukan kadar protein dan berat molekul dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi aseton yang baik untuk

pemurnian. Dilihat dari hasil karakterisasi dapat diketahui bahwa aseton yang baik digunakan untuk pemurnian adalah pada konsentrasi 80%. Hal tersebut dikarenakan gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton 80% menunjukkan pita protein gelatin tulang ayam yaitu pada berat molekul 100-138 kDa yang merupakan α -chain.

4.4 Identifikasi Daerah Serapan Menggunakan FTIR

Identifikasi gugus fungsi menggunakan FTIR bertujuan untuk memastikan bahwa sampel yang diuji adalah gelatin tulang ayam dengan mengamati gugus fungsinya. Seperti protein pada umumnya, gelatin memiliki gugus fungsi yang terdiri dari gugus karbonil (C=O), hidroksil (OH), dan amina (NH). Gelatin memiliki daerah serapan khas yang terdiri dari Amida A, Amida B, Amida I, Amida II, dan Amida III. Hasil identifikasi gugus fungsi gelatin tulang ayam dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Daerah serapan dan bilangan gelombang gelatin tulang ayam hasil pemurnian dengan aseton 80%

Daerah Serapan	Bilangan Gelombang Gelatin (cm^{-1})		
	36 jam	48 jam	60 jam
Amida A	3487,82	3487,82	3424,18
Amida B	2932,36	2928,50	2932,36
Amida I	1651,72	1649,79	1655,57
Amida II	1543,71	1541,78	1543,71
Amida III	1267,91	1235,12	1242,83

Berdasarkan hasil penelitian (Lampiran 8), ketiga sampel menunjukkan bahwa bilangan gelombang pada Amida A tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (3487,2 dan 3424,18 cm^{-1}). Menurut Ahmad & Benjakul (2011), Amida

A memiliki bilangan gelombang pada 3600-3300 cm^{-1} . Amida A memperlihatkan bahwa gugus NH dalam amida cenderung berikatan dengan regangan CH_2 . Ketiga sampel tersebut juga memiliki serapan yang lebar. Menurut Puspawati, dkk (2012), bentuk puncak yang melebar merupakan bukti adanya gugus OH dari hidroksiprolin. Apabila gugus NH dari peptida terlibat dalam ikatan hidrogen, maka posisinya akan bergeser ke bilangan gelombang yang lebih rendah, seperti halnya dalam penelitian ini yaitu pada 3343,17 dan 3321,96 cm^{-1} . Sampel gelatin 48 jam memiliki bilangan gelombang yang tidak terdapat di sampel yang lain yaitu pada 3536,04 cm^{-1} dengan serapan sempit yang merupakan serapan dari N-H bebas.

Bilangan gelombang ketiga sampel pada Amida B memiliki nilai yang hampir sama (2932,36 dan 2928,50 cm^{-1}). Amida B menunjukkan bahwa terdapat regangan asimetris dari gugus CH_2 (Wulandari dkk, 2015). Menurut Ahmad & Benjakul (2011), bilangan gelombang Amida B berada pada 2945-2926 cm^{-1} . Sampel gelatin 36 dan 48 jam memiliki bilangan gelombang yang tidak terdapat pada sampel gelatin 60 jam yaitu, 2859,07 cm^{-1} . Bilangan gelombang tersebut merupakan regangan simetris CH_2 .

Daerah serapan Amida I pada ketiga sampel memiliki nilai yang hampir sama (1655,57; 1651,72 dan 1649,79 cm^{-1}). Menurut Muyonga, dkk (2004), Amida I memiliki panjang gelombang 1656-1644 cm^{-1} . Serapan tersebut diakibatkan karena adanya regangan ikatan rangkap gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$), *bending* ikatan NH, dan regangan CN (Puspawati dkk, 2012).

Amida II memiliki daerah serapan pada bilangan gelombang 1560-1335 cm^{-1} (Muyonga dkk, 2004). Amida II dengan bilangan gelombang 1543,71 dan

1541,78 cm^{-1} menunjukkan bahwa ada regangan CN dan deformasi ikatan N-H dalam protein, daerah serapan tersebut berkaitan dengan deformasi tropokolagen menjadi rantai α -*helix*. Bilangan gelombang 1568,78; 1566,85; 1564,92 cm^{-1} merupakan serapan dari NH *bending*. Bilangan gelombang 1437,63 cm^{-1} pada sampel gelatin 36 dan 48 jam serta 1439,56 pada sampel gelatin 60 jam menunjukkan bahwa terdapat vibrasi regangan CN dan *bending* CH₂ dari gugus prolin.

Ahmad & Benjakul (2011) melaporkan bahwa Amida III memiliki bilangan gelombang dengan rentang 1245-670 cm^{-1} . Amida III memiliki bilangan gelombang 1267,91; 1242,83 dan 1235,12 cm^{-1} menunjukkan bahwa adanya regangan C-N dan N-H yang ditimbulkan oleh *wagging* CH₂ dari glisin *backbone* dan rantai samping prolin (Abdullah dkk, 2016). Bilangan gelombang 1142,54; 1140,61; 1127,11; 1076,97; 1067,32 cm^{-1} merupakan regangan CO dari alkohol sekunder. Menurut Karlina & Atmaja (2009), daerah serapan ini juga mengkarakterisasi material non-protein yang ada pada tulang. Sampel gelatin menunjukkan bahwa terdapat bilangan gelombang 1067,32 dan 1076,97 cm^{-1} adalah serapan dari mineral karbonat (regangan C-O simetris). Bilangan gelombang 988,25 839,74 cm^{-1} merupakan puncak serapan untuk mineral fosfat (regangan P-O simetris).

4.5 Kajian Hasil Penelitian dalam Prespektif Islam

Gelatin sebagai bahan tambahan pangan memiliki banyak manfaat, seperti dapat digunakan sebagai penstabil, pembentuk gel, pengikat, pengental, pengemulsi, perekat, dan pembungkus makanan yang dapat dimakan. Gelatin

merupakan protein yang diperoleh dari kolagen kulit, tulang, dan bagian tubuh lainnya yang mengandung kolagen. Kandungan protein yang terdapat dalam gelatin tulang ayam (Tabel 4.1) menunjukkan bahwa gelatin tersebut termasuk makanan yang memiliki nilai gizi .

Mengonsumsi makanan bergizi sangat dianjurkan dalam agama Islam, karena dengan terpenuhinya gizi menjadikan manusia semakin sehat sehingga kewajiban dapat dijalankan. Makanan bergizi digolongkan sebagai makanan yang *thayyib*. Allah memrintahkan kepada hamba-Nya untuk mengonsumsi makanan yang *thayyib*, seperti yang dijelaskan dalam QS. Al-Baqarah ayat 168:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُواتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُبِينٌ (١٦٨)

Artinya: “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” (QS. Al-Baqarah: 168).

Menurut Shihab (1997), makanan yang baik (*thayyib*) untuk dikonsumsi diklasifikasikan menjadi 3 kelompok, pertama adalah makanan yang sehat, yaitu yang mempunyai kandungan gizi yang cukup. Kedua adalah proporsional, yaitu makanan yang dikonsumsi sesuai dengan kebutuhan (tidak berlebihan). Ketiga adalah makanan yang aman, yaitu makanan yang suci dari kotoran dan penyakit serta tidak berbahaya, sebagaimana sabda Rasulullah SAW:

عَنْ أَبِي سَعِيدٍ سَعْدِ بْنِ مَالِكِ بْنِ سِنَانَ الْخُدْرِيِّ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ أَنَّ رَسُولَ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ: لَا ضَرَرَ وَلَا ضِرَارَ (رواه ابن ماجه عن عبادة بن الصامت, واحمد عن ابن عباس, ومالك عن يحيى)

Dari Abu Sa'id Sa'd bin Malik bin Sinan al-Khudri r.a, Rasulullah SAW bersabda, *“Tidak boleh membahayakan diri sendiri dan tidak boleh pula membahayakan orang lain”* (H.R Ibnu Majah dari 'Ubadah bin Shamit, riwayat Ahmad dari Ibnu 'Abbas, dan Malik dari Yahya).

Manfaat dari penelitian ini selain mengetahui kadar protein pada gelatin tulang ayam juga dapat mengetahui karakteristik gelatin tersebut berdasarkan menentukan berat molekulnya (Tabel 4.2). Setiap bahan baku gelatin memiliki karakteristik berat molekul yang berbeda, sehingga dapat diketahui sumber gelatin yang digunakan. Allah berfirman dalam Q.S An-Nuur: 45:

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِنْ مَاءٍ فَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَى بَطْنِهِ وَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَى رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَنْ يَمْشِي عَلَى أَرْبَعٍ يَخْلُقُ اللَّهُ مَا يَشَاءُ إِنَّ اللَّهَ عَلَى كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ (٤٥)

Artinya: *“Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki, sedangkan sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, sesungguhnya Allah Mahakuasa atas segala sesuatu”* (Q.S An-Nuur: 45).

Allah menunjukkan kekuasaan-Nya yang Maha sempurna dengan menciptakan bermacam-macam jenis makhluk dengan bentuk, rupa, warna, dan gerak-gerik yang berbeda namun tetap berasal dari unsur yang sama, yaitu air. Hewan tersebut ada yang berjalan menggunakan perutnya seperti ular dan sebagainya, ada yang berjalan menggunakan dua kaki seperti burung, ada juga yang berjalan menggunakan empat kaki seperti kebanyakan binatang ternak, contohnya adalah lembu, domba, unta dan lain-lain. Semuanya diciptakan atas kekuasaan dan kehendak-Nya (Abdullah, 2004).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kadar protein gelatin ekstrak kasar adalah 0,086-0,101 mg/mL. Gelatin hasil pemurnian dengan aseton 20, 40, 60, dan 80% memiliki kadar protein berturut-turut sebesar 0,015-0,023 mg/mL, 0,014-0,024 mg/mL, 0,023-0,046 mg/mL, dan 0,068-0,097 mg/mL.
2. Gelatin tulang ayam hasil pemurnian memiliki pita protein pada berat molekul 100-138 kDa.
3. Gelatin tulang ayam memiliki lima daerah serapan yaitu, Amida A (3487,82-3424,18 cm^{-1}), Amida B (2932,36-2928,50 cm^{-1}), Amida I (1655,57-1649,79 cm^{-1}), Amida II (1543,71-1541,78 cm^{-1}), dan Amida III (1267,91-1235,12 cm^{-1}).

5.2 Saran

Perlu diadakan uji lebih lanjut pada sampel gelatin dengan menggunakan HPLC sehingga dapat diketahui asam-asam amino yang terdapat dalam gelatin tulang ayam.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M. S. P., Mohamed, I. N., Syed, I. M. I., Shaik, N., Malina, J., Lam, K. W., Nur, M. M., & Ahmad, F. S. 2016. Physicochemical evaluation and spectroscopic characterisation of gelatine from shank and toes of *Gallus domesticus*. *Sains Malaysiana*. 45(3), 435–449.
- Abdullah. 2004. Tafsir Ibnu Katsir. Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Ahmad, M. & Benjakul, S. 2011. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*. 25(3): 381-388.
- Aina, M. A., Amin, I., Hafidz, R. M. R. N., & Yaakob, C. M. 2013. Identification polypeptide biomarkers of porcine skin gelatin by two-dimensional electrophoresis. *International Food Research Journal*. 20(3), 1395–1399.
- Almeida, P., Silva, L., S., Calarge, F., Brito, F., T., & Santana, J. C. 2012. FTIR characterization of gelatin from chicken feet. *Journal Chem. Chemical Engineering*. 6, 1029–1032.
- Al-Saidi, G. S., Al-Alawi, A., Rahman, M. S., & Guizani, N. 2012. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of extracted gelatin from shaari (*Lithrinus microdon*) skin: effects of extraction conditions. *International Food Research Journal*. 19(3), 1167–1173.
- Ash-Shabuni, M. A. 1999. *Mukhtasar Tafsir Ibnu Katsir Jilid I, II*. Beirut: Dar el-Fikr.
- Azira, T. N., Amin, I., & Che Man, Y. B. 2012. Differentiation of bovine and porcine gelatins in processed products via Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Principal Component Analysis (PCA) techniques. *International Food Research Journal*. 19(3), 1175–1180.
- Azira, T. N., Man, C. Y. B., Hafidz, R. M. R. N., Aina, M. A., & Amin, I. 2014. Use of principal component analysis for differentiation of gelatine sources based on polypeptide molecular weights. *Food Chemistry*. 151, 286–292.
- Badan Pusat Statistik. 2012. *Statistik Impor Indonesia*. <http://www.bps.go.id>. Diakses 27 Oktober 2016.
- Bio-Rad Laboratories, CA, USA. *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*. <http://www.bio-rad.com>. Diakses 28 September 2016.
- Cassel, J. M., & Joseph, R. K. 1949. Studies on the purification of collagen. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*. 42, 557-565.

- Cebi, N., M. Zeki. D., Omer, S. T., Osman, S., & Muhammet, A. 2016. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chemistry*. 190, 1109–1115.
- Chancharern, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., & Thumthanaruk, B. 2016. Extraction of type A and type B gelatin from jellyfish (*Lobonema smithii*). *International Food Research Journal*. 23(1), 419–424.
- Du, L., Khiari Z., Pietrasik Z., & Betti M. 2013. Physicochemical and functional properties of gelatins extracted from turkey and chicken heads. *Journal Poultry Science*. 92 :2463–2474.
- Garfin, D. E. 2003. Gel electrophoresis of proteins. In Davey, J., & Lord, M, *Essential cell biology, volume 1: cell structure, a practical approach*. UK: Oxford University Press.
- GE Healthcare. 2010. *Protein sample preparation handbook*. <http://sevierlab.vet.cornell.edu/>. Diakses 27 Januari 2017.
- GMIA. 2012. *Gelatin Handbook, Gelatin Manufacturers Institute of America*. <http://gelatin-gmia.com/>. Diakses 30 November 2016.
- Gómez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., & Montero, P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids*. 16(1), 25–34.
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 25(8), 1813–1827.
- Hafidz, R. N., Yaakob, C. M., Amin, I., & Noorfaizan, A. 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.
- Handoko, T., Sherly, O. R., & Isabella, S. 2011. Pengaruh jenis dan konsentrasi asam, temperatur dan waktu ekstraksi terhadap karakteristik *fish glue* dari limbah ikan tenggiri. *Reaktor*. 13(4), 237-241.
- Hardikawati, T., Ni, M. P., & Ketut, R. 2016. Kajian pengaruh variasi konsentrasi asam sitrat terhadap kekuatan gel produk gelatin kulit ayam broiler dikaitkan dengan pola proteinnya. *Jurnal Kimia*. 10(1), 115-124.
- Hastuti, D., & Iriane, S. 2007. Pengenalan dan proses pembuatan gelatin. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*. 3(1), 39–48.

- Haug, I. J., & Draget, K. I. 2011. Gelatin. In *Handbook of food proteins*. Norwegia: Woodhead Publishing Limited.
- <https://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/chapt07/sm1.htm>. Diakses 17 April 2018.
- Hudson, C, B. 1994. Gelatin-relating structure and chemistry to functionality. In Nishinari, K., & Doi, E, *Food hydrocolloids: structure, properties, and functions*. New York: Plenum Press.
- Karlina, I. R., & Lukman, A. 2009. Ekstrak Gelatin dari Tulang Rawan Ikan Pari (*Himantura Gerarrdi*) pada Variasi Larutan Asam untuk Perendaman. *Prosiding KIMIA FMIPA - ITS*.
- Lowry O. H., Nira, J. R., Lewis, F., & Rose, J. R. 1951. Protein measurement with the folin fenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 23, 265-275.
- Maftuchah., Aris, W., & Agus, Z. 2014. *Analisis biologi molekuler*. Yogyakarta: Deepublish.
- Mahasri, G., Ulia, F., & Sri, S. 2010. Dharacterization of protein *Lernaea cyprinacea* by using SDS-PAGE electrophoresis method. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 2, 61-66.
- Maknunah, Z. 2015. Karakterisasi profil protein gelatin komersial menggunakan sds-page dan anaisis kadar protein menggunakan spektrofotometer UV-Vis. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri (UIN) Mauana Malik Ibrahim Malang.
- Marino, M, A., Freitas, S., Miranda, E, A. 2015. Ethanol Precipitation of Glycosyl Hydrolases Produced by *Trichoderma harzianum* P49P11. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 22(2), 325-333.
- Marsaid & Lukman, A. 2011. Analisis sifat kimia , fisik , dan termal gelatin dari tulang ikan tuna (*Thunnus sp*) pada variasi larutan asam untuk perendaman. *Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia*. Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya.
- Melas, V., Marie-Helene, M., Jean-Claude, A., & Pierre, F. 1994. Simple and rapid method for purifying low-molecular-weight subunits of glutenin from wheat. *Cereal Chemistry*. 71(3), 234–237.
- Mufidah, Z. 2013. Isolasi gelatin menggunakan pelarut asam sitrat dari tulang ayam broiler dengan variasi konsentrasi dan lama perendaman. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri (UIN) Mauana Malik Ibrahim Malang.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B & Duodu, K. G. 2004. Characterisation of Acid Soluble Collagen From Skins of Young and Adult Nile Perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 85:81–89.
- Nugroho, E. D., & Dwi, A. R. 2016. *Penuntun praktikum biologi*. Yogyakarta: Deepublish.

- Poppe, J. 1992. Gelatin. In Imeson, A, *Thickening and gelling agents for food*. London: Blakie Academic and Profesional.
- Prabu, S. L & Suriyaprakash, T. N. K. 2012. Extraction of drug from the biological matrix: a review, applied biological engineering - principles and practice. InTech.
- Praira, W. 2008. Identifikasi gelatin dalam beberapa obat bentuk sediaan tablet menggunakan metode spektrofotometri. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Prihatinningtyas, E & Agus, J, E. 2013. Aplikasi koagulan alami dari tepung jagung dalam pengolahan air bersih. *Jurnal Teknosains*. 2(2). 71-158.
- 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.
- Puspawati, N. M., Simpen, I. N., & Miwada, I. N. S. 2012. Isolasi gelatin dari kulit kaki ayam broiler dan karakterisasi gugus fungsinya dengan spektrofotometri FTIR. *Jurnal Kimia*. 6(1), 79-87.
- Rachmania, R. A., Ftimah, N., & Elok, M. 2013. Ekstraksi gelatin dari tulang ikan tenggiri melalui proses hidrolisis menggunakan larutan basa. *Media Farmasi*. 10(2), 18-28.
- Rasli, H. I., & Sarbon, N. M. 2015. Effects of different drying methods on the rheological, functional and structural properties of chicken skin gelatin compared to bovine gelatin. *International Food Research Journal*. 22(2), 584-592.
- Rohmah, F. 2017. Pengaruh Lama Perendaman Dengan Asam Sitrat Terhadap Produksi Gelatin Halal Dari Tulang Ayam Broiler (*Gallus domestica*). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri (UIN) Mauana Malik Ibrahim Malang.
- Roy, S., & Vikash, K. 2012. A practical approach on SDS PAGE for separation of protein. *International Journal of Science and Research*. 3(8), 955-960.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*.
- Sarbon, N., Badii, F., & Howell, N. K. 2013. Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids* 30(1), 143-151.
- Sarbon, N. M., Farah, B., & Nazlin, K. H. 2015. The effect of chicken skin gelatin and whey protein interactions on rheological and thermal properties. *Food Hydrocolloids*. 45, 83-92.
- Sharma, H. K., Richa, S., & Shubhangi, S. 2014. Isolation, purification and quantitative analysis of cysteine protease, bromelain from *Ananas comosus* (pineapple). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 5(1), 429-437.

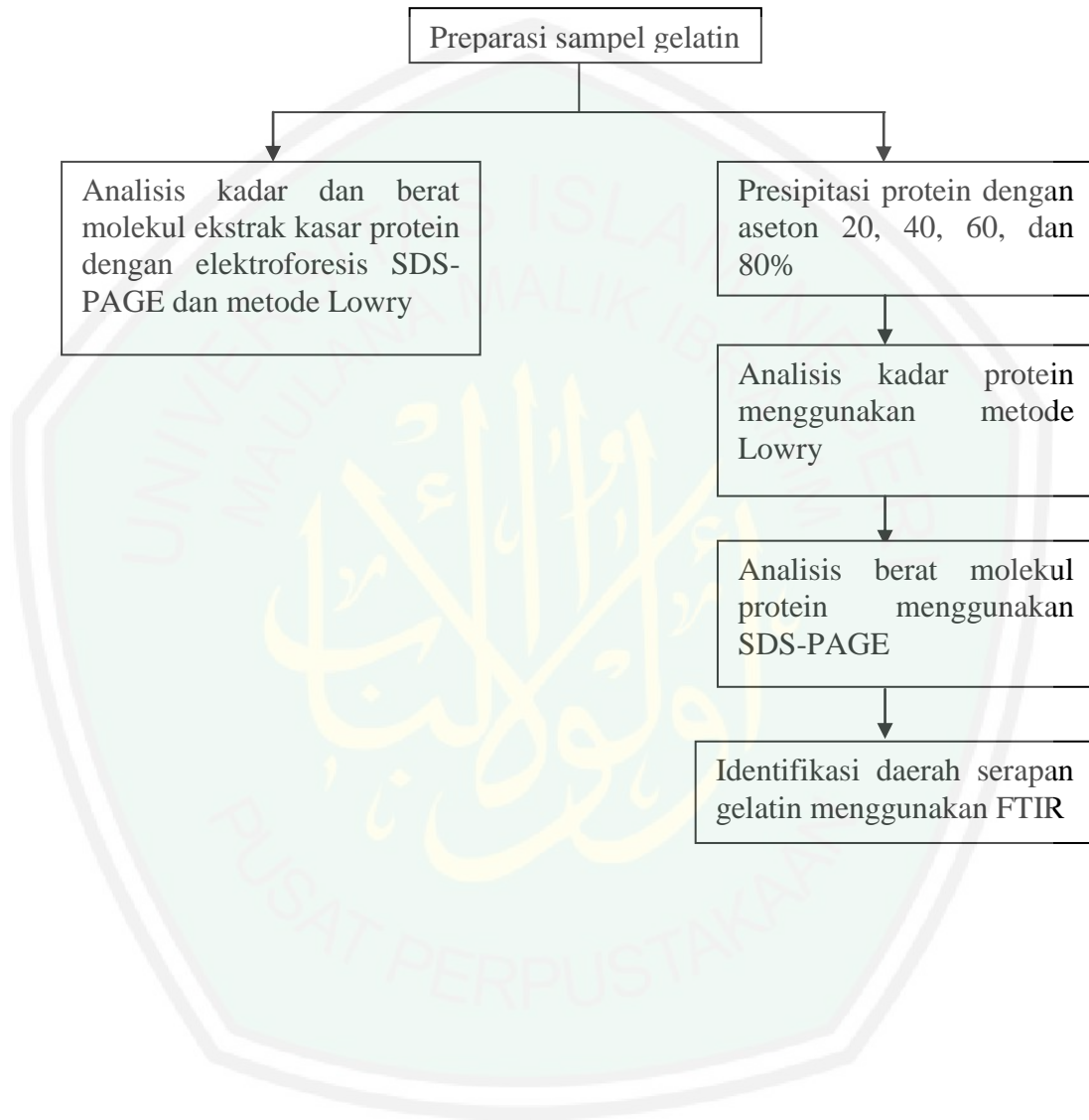
- Shihab, M. Q. 1997. *Membumikan Al-Qur'an Fungsi dan Peran Wahyu dalam Kehidupan Masyarakat*. Bandung: Mizan.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera hati.
- Sompie, M., Triatmojo, S., Pertiwiningrum, A., & Pranoto, Y. 2012. Pengaruh umur potong dan konsentrasi larutan asam asetat terhadap sifat fisik dan kimia gelatin kulit babi. *Sains Peternakan*. 10(1), 15-22.
- Sriwahyuni, H & Suryantoro. 2010. Pengaruh ukuran butir koloid terhadap deposisi koloid pada tanah sekitar fasilitas penyimpanan lestari limbah radioaktif. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pengolahan Limbah VIII*. Pusat teknologi limbah radioaktif BATAN.
- Suhartono, M. T., Suwanto, A., & Widjaja, H. 1992. *Diktat struktur dan biokimiawi protein*. Bogor: PAU IPB.
- Sukkwai, S., Kijroongrojana, K., & Benjakul, S. 2011. Extraction of gelatin from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) skin for gelatin hydrolysate production. *International Food Research Journal*. 18(3), 1129–1134.
- Suryani, N., Farida, S., & Astri, F. 2009. Kekuatan gel gelatin tipe B dalam formulasi granul terhadap kemampuan mukoadhesif. *Makara, Kesehatan*. 13(1), 1–4.
- Suryati, Nasrul Z. A., Meriatna, & Suryani 2015. Pembuatan dan karakterisasi gelatin dari ceker ayam dengan proses hidrolisis. *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*. 4, 66-79.
- Syukur, S. 2017. *Bioteknologi Dasar dan bakteri Asam laktat Antimikrobial*. Padang: (LPTIK) Universitas Andalas.
- Ward, A. G., & Courts. 1977. *The science and technology of gelatin*. New York: Academic Press.
- Widyasari, R., & Saroat, R. 2015. Gelatin from chicken feet: papain-assisted extraction, characterization and its application. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*. 1(1), 136-143.
- Wulandari, Suptijah, P., & Tarman, **K.** 2015. Efektivitas *Pretreatment* Alkali dan Hidrolisis Asam Asetat terhadap Karakteristik Kolagen dari Kulit Ikan Gabus. *JPHPI*. Volume 18 Nomor 3.
- Yenrina, R. 2015. *Metode analisis bahan pangan dan komponen bioaktif*. Padang: Andalas University Press.
- Zaia, D., A., M. 1998. Determination of total protein via spectrophotometrically: advantages and disadvantages of existing methods. *Journal of Chemistry*. 21, 6-16.

- Zhou, P., & Regenstein, J. M. 2006. Determination of total protein content in gelatin solutions with the Lowry or Biuret assay. *Journal of Food Science*. 71(8).
- Zulaekah, S., & Yuli, K. 2005. Halal dan Haram Makanan dalam Islam. *Jurnal SUHUF*. Vol. XVII, No. 01: 25-35.



LAMPIRAN

Lampiran 1: Rancangan Penelitian



Lampiran 2: Skema Kerja

1. Presipitasi Protein Menggunakan Aseton (Aina dkk, 2013; Azira dkk, 2012)

Gelatin

- Gelatin sebanyak 1 g dilarutkan dalam 10 mL akuades pada suhu 50°C sampai larut sempurna
- Larutan sampel divortex pada suhu ruang
- Sebanyak 2 mL sampel ditambahkan dengan 8 mL aseton 20% yang telah didinginkan pada suhu -20°C, kemudian divortex
- Pengendapan dilakukan dengan membiarkan campuran selama semalam pada suhu -20°C
- Campuran gelatin dengan aseton dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit
- Supernatan dibuang dan endapan protein dikeringkan untuk menghilangkan aseton
- Perlakuan di atas diulangi untuk konsentrasi aseton 40%, 60%, dan 80%

Hasil

2. Penentuan Kadar Protein Gelatin Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Lowry, Rosbrough, Farr, & Randall, 1951)

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

1 mL larutan standar BSA 0,06 mg/mL

- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambah dengan 3 mL akuades
- Larutan standar ditambah dengan 5,5 mL pereaksi C, diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit
- Ditambah dengan pereaksi D sebanyak 0,5 mL, kemudian diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit
- Larutan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil

b. Pembuatan Kurva Standar

1 mL larutan standar BSA 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 mg/mL

- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda
- Ditambah dengan 3 mL akuades
- Larutan standar ditambah dengan 5,5 mL pereaksi C, diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit
- Ditambah dengan pereaksi D sebanyak 0,5 mL, kemudian diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit
- Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan Spektrofotometer UV-Vis
- Dibuat kurva standar dengan sumbu X sebagai konsentrasi dan sumbu Y sebagai absorbansi

Hasil

c. Penentuan Kadar Protein dalam Sampel

1 mL larutan sampel

- Ditambah dengan 3 mL akuades
- Ditambah dengan 5,5 mL pereaksi C dan dimasukkan dalam tabung reaksi
- Campuran diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit
- Campuran tersebut ditambah dengan 0,5 mL pereaksi D, lalu diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum
- Penentuan kadar protein dalam sampel dilakukan dengan tiga kali perlakuan

Hasil

3. Penentuan Berat Molekul Protein Gelatin Menggunakan SDS-PAGE

a. Pembuatan Gel SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

- Pembuatan 7,5 % *Resolving Gel*

Akuades

- Dipipet 7,28 mL akuades
- Ditambahkan dengan 30% Akrilamid/bis akrilamid sebanyak 3,75 mL, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 sebanyak 3,75 mL, 150 μ L 10% SDS, 10% APS sebanyak 75 μ L
- Dihomogenkan larutan
- Ditambahkan 7,5 μ L TEMED
- Dicitak ke dalam cetakan gel hingga mencapai 2/3 bagian cetakan
- Didiamkan sampai gel mengeras

Hasil

- Pembuatan 4% *Stacking Gel*

Akuades

- Dipipet 9 mL akuades
- Ditambahkan dengan 30% Akrilamid/bis akrilamid sebanyak 1,98 mL, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 sebanyak 3,78 mL, 150 μ L 10% SDS, 10% APS sebanyak 75 μ L
- Dihomogenkan larutan
- Ditambahkan 15 μ L TEMED
- Dicitak ke dalam cetakan gel
- Dipasang sisir sumur gel
- Didiamkan sampai gel mengeras

Hasil

b. Preparasi dan *Running* Sampel (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

Gelatin

- Sebanyak 5 μL gelatin ditambah dengan 5 μL buffer sampel, perbandingan 1:1 (v/v)
- Dipanaskan pada suhu 90°C selama 5 menit
- Didinginkan sampel pada suhu ruang
- Dimasukkan marker sebanyak 5 μL ke dalam sumur gel
- Dimasukkan sampel gelatin ke dalam sumur gel
- Proses *running* dilakukan pada tegangan 120 V selama ± 90 menit dalam *running* buffer

Hasil

c. Pewarnaan Gel (Mahasri, Fajriah, & Subekti, 2010)

Gel Poliakrilamid

- Direndam gel dalam larutan pewarna (*staining*)
- Proses dilakukan selama 30 menit sambil di *shaker*
- Dicuci dengan aquades
- Direndam dalam larutan *destaining* selama semalam

Hasil

4. Identifikasi Daerah Serapan Menggunakan FTIR (Puspawati, Simpen, & Miwada, 2012)

Gelatin

- Sebanyak 2 mg gelatin dicampur dengan 100 mg serbuk KBr
- Ditumbuk hingga halus
- Dimampatkan campuran dalam cetakan dengan pompa hidrolik untuk membentuk pelet
- Dilakukan proses karakterisasi dengan spektrofotometer FTIR pada panjang gelombang $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$

Hasil

5. Analisis Data

Data

- Ditentukan nilai *Retaration factor* (Rf) pada marker
- Dimasukkan nilai Rf dan nilai log Berat Molekul (BM) marker dalam persamaan regresi linier dengan rumus $y = a + bx$
- Data kadar protein dianalisis dengan ANOVA *Two way* SPSS 16 dan dilanjutkan dengan uji BNT
- Hasil Spektra FTIR dianalisis secara deskriptif yaitu dengan menjelaskan karakteristik yang dimiliki objek penelitian

Hasil



Lampiran 3: Pembuatan Reagen

1. Pembuatan Aseton

- Pembuatan larutan stock 80% (v/v) :

Diketahui: $M_1 = 99\%$

Jawab: $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$

$M_2 = 80\%$

$99,75\% \cdot V_1 = 80\% \times 50 \text{ mL}$

$V_2 = 10 \text{ mL}$

$V_1 = \frac{4000}{99,75} = 40,1 \text{ mL}$

Ditanya : V_1?

Jadi, 40,1 mL aseton 99,75% dilarutkan sampai volume 50 mL.

- Pembuatan aseton 60, 40, dan 20%

Aseton (%)	Volume Aseton 80% (mL)	Volume Air (mL)	Volume Total (mL)
60	18,75	6,25	25
40	12,5	12,5	25
20	6,25	18,75	25

2. Pembuatan Reagen SDS-PAGE

- Akrilamida/bis (30%) 10 mL (b/v)

Sebanyak 2,92 g akrilamida ditambah dengan 0,08 g bis-akrilamida, kemudian dilarutkan dalam 10 mL akuades (disimpan pada suhu 4°C ditempat yang terhindar dari cahaya).

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

Sebanyak 18,15 gram tris base dilarutkan dalam 100 mL akuades.

Kemudian pH disesuaikan hingga 8,8 dengan penambahan 6 N HCl (disimpan pada suhu 4°C).

Mr Tris base = 121,14 g/mol

$$n = \frac{g}{Mr} = \frac{18,15 \text{ g}}{121,14 \text{ g/mol}} = 0,149 \text{ mol}$$

$$M = \frac{n}{V} = \frac{0,149 \text{ mol}}{0,1 \text{ L}} = 1,49 \text{ mol/L} = 1,5 \text{ mol/L} = 1,5 \text{ M}$$

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

Sebanyak 6 gram tris base dilarutkan dalam 100 mL akuades. Kemudian pH disesuaikan hingga 6,8 dengan penambahan 6 N HCl (disimpan pada suhu 4°C).

Mr Tris base = 121,14 g/mol

$$n = \frac{g}{Mr} = \frac{6 \text{ g}}{121,14 \text{ g/mol}} = 0,049 \text{ mol}$$

$$M = \frac{n}{V} = \frac{0,049 \text{ mol}}{0,1 \text{ L}} = 0,49 \text{ mol/L} = 0,5 \text{ mol/L} = 0,5 \text{ M}$$

- d. SDS 10% (b/v)

Sebanyak 1 gram SDS dilarutkan dalam 10 mL akuades.

- e. Amonium Persulfat (APS) 10% (b/v)

Sebanyak 0,1 gram APS dilarutkan dalam 1 mL akuades (dibuat jika hanya pada waktu akan digunakan).

- f. *Bromophenol blue* 0,5% (b/v)

Sebanyak 0,05 gram *Bromophenol blue* dilarutkan dalam 10 mL akuades.

- g. RSB (*Reducing Sample Buffer*)

Bahan	Volume (mL)
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25
Gliserol	2,5
10% SDS	2
0,5% <i>Bromophenol blue</i>	0,2
Akuades	3,55

Reducing sample buffer dibuat dengan mencampurkan 0,25 μL β -merkaptoetanol.

h. *Running buffer 10x*

Sebanyak 30,3 gram tris base ditambah dengan 144,1 gram glisin dan 10 gram SDS. Setelah itu dilarutkan dalam 1000 mL akuades.

i. *Larutan Staining*

Sebanyak 0,2 gram *Coomassie Blue* dilarutkan dalam 45 mL metanol, 45 mL akuades, dan 10 mL asam asetat glasial.

j. *Larutan Destaining*

Sebanyak 25 mL metanol ditambah dengan 65 mL akuades, dan 10 mL asam asetat glasial.

3. Larutan Standar BSA

- Pembuatan larutan stok BSA 0,1 mg/mL :

Sebanyak 1 mg BSA dilarutkan dalam 10 mL akuades.

- BSA 0,08 mg/mL:

Diketahui: $M_1 = 0,1 \text{ mg/mL}$

Jawab: $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$

$M_2 = 0,08 \text{ mg/mL}$

$0,1 \text{ mg/mL} \cdot V_1 = 0,08 \text{ mg/mL} \times 5 \text{ mL}$

$V_2 = 5 \text{ mL}$

$V_1 = 0,4 \text{ mL}$

Ditanya : V_1?

Jadi, 0,4 mL BSA 0,1 mg/mL dilarutkan sampai volume 5 mL.

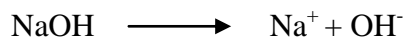
- Pembuatan BSA 0,06; 0,04; 0,02 mg/mL

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Volume BSA 0,1 mg/mL (mL)	Volume Air (mL)	Volume Total (mL)
0,06	0,3	4,7	5
0,04	0,2	4,8	5
0,02	0,1	4,9	5

4. Pembuatan Larutan 0,1 N NaOH

$$N = M \times a$$

a = banyaknya ion OH⁻



$$M = \frac{N}{a} = \frac{0,1 \text{ N}}{1} = 0,1 \text{ M}$$

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

$$n = M \times V = 0,1 \text{ M} \times 0,05 \text{ L} = 0,005 \text{ mol}$$

$$n = \frac{g}{Mr}$$

$$g = n \times Mr = 0,005 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol}$$

$$g = 0,2 \text{ gram NaOH}$$

Jadi, 0,2 g NaOH dilarutkan dalam 50 mL akuades

5. Reagen Lowry

- Pereaksi A:

Pembuatan larutan 0,1 N NaOH

Pembuatan larutan 2% Na₂CO₃ dalam 0,1 N NaOH (Pereaksi A):

Sebanyak 1 gram Na₂CO₃ dilarutkan yang dalam 0,1 N NaOH 50 mL.

- Pereaksi B

Pembuatan larutan 1% Na K Tartrat:

Sebanyak 0,05 g Na K Tartrat dilarutkan dalam 5 mL akuades

- Pembuatan larutan 0,5% CuSO₄.5H₂O dalam 1% Na K Tartrat (Pereaksi B):

Sebanyak 0,025 g CuSO₄.5H₂O dilarutkan dalam 5 mL 1% Na K Tartrat

(dibuat jika hanya pada waktu akan digunakan).

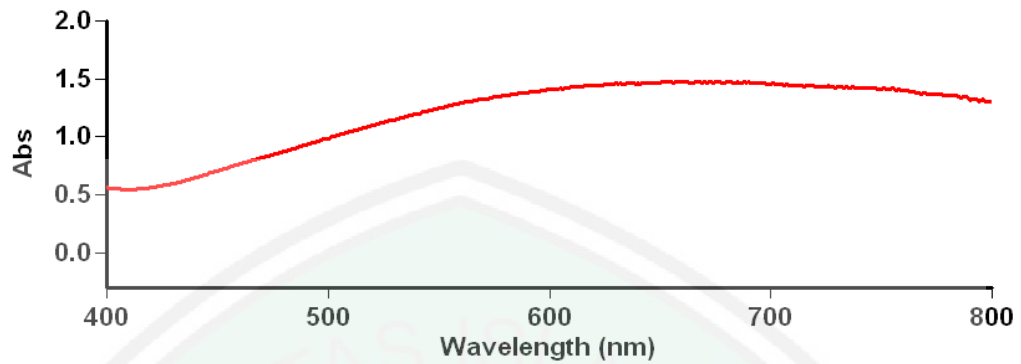
- Pereaksi C:

Pereaksi C dibuat dari campuran 50 mL pereaksi A dan 1 mL pereaksi B.

- Pereaksi D:

Sebanyak 20 mL pereaksi Folin Ciocalteau dicampur dengan 20 mL akuades (1 : 1).

Lampiran 4: Kurva Panjang Gelombang Maksimum Spektrofotometer UV-Vis



Scan Analysis Report

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

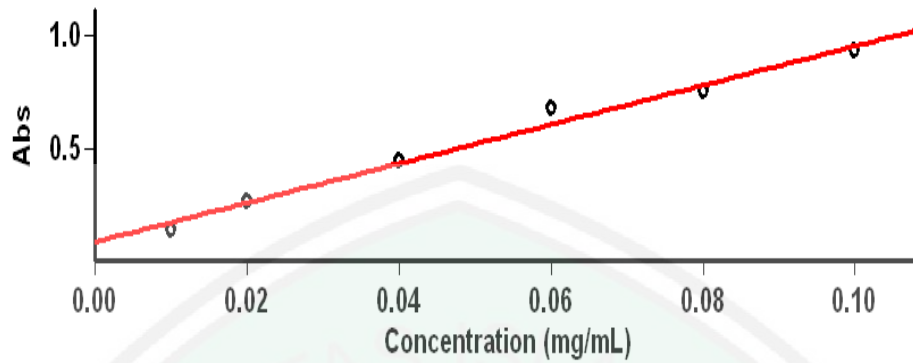
Sample Name: Protein Gelatin

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

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 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: Kurva standar BSA Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



Concentration Analysis Report

Report time 9/20/2017 3:56:43 PM
 Method
 Batch name D:\Dhienda Risa\Kurva Standar protein Gelatin (20-09-2017).BCN
 Application Concentration 3.00 (339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 654.0
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Standard/Sample averaging OFF
 Weight and volume corrections OFF
 Fit type Linear
 Min R² 0.95000
 Concentration units mg/mL

Comments:

Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.1184)	654.0

Calibration

Collection time 9/20/2017 3:57:00 PM

Standard	Concentration mg/mL	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1	0.01		0.1427	0.0004	0.31	0.1425
						0.1432
						0.1424
Std 2	0.02		0.2697	0.0002	0.08	0.2698
						0.2698
						0.2694
Std 3	0.04		0.4507	0.0004	0.10	0.4512
						0.4504
						0.4505

Std 4					0.6786
					0.6784
	0.06	0.6785	0.0002	0.02	0.6783
Std 5					0.7529
					0.7529
	0.08	0.7532	0.0005	0.07	0.7538
Std 6					0.9334
					0.9303
	0.10	0.9314	0.0017	0.18	0.9305
Calibration eqn	Abs = 8.59209*Conc +0.09378				
Correlation Coefficient	0.98339				
Calibration time	9/20/2017 3:58:26 PM				

Results Flags Legend

U = Uncalibrated O = Overage
 N = Not used in calibration R = Repeat reading



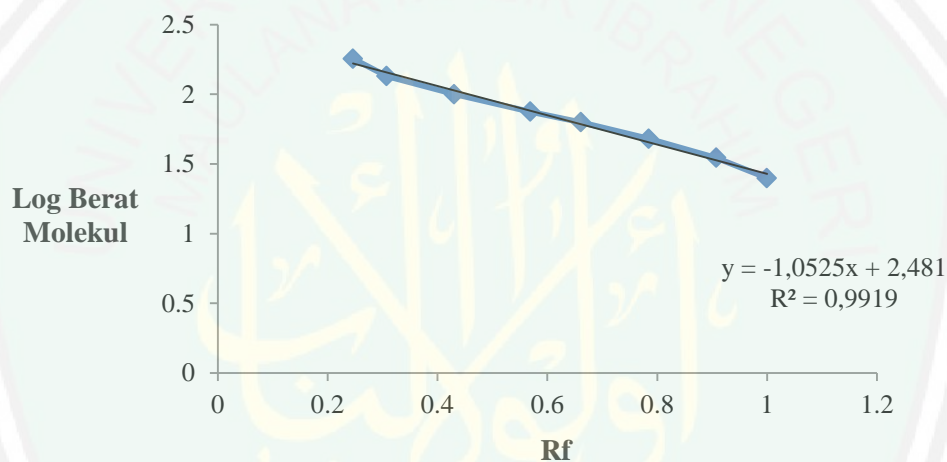
Lampiran 6: Data Kadar Protein

No.	Sampel Gelatin	Konsentrasi Aseton (%)	Absorbansi			Kadar Protein (mg/mL)			Rata-rata kadar protein (mg/mL)
			Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
1.	12 jam	EK	0,821	0,842	0,824	0,0846	0,087	0,085	0,086
		20	0,244	0,232	0,189	0,0175	0,016	0,011	0,015
		40	0,196	0,227	0,214	0,0119	0,016	0,014	0,014
		60	0,282	0,297	0,292	0,0219	0,024	0,023	0,023
		80	0,859	0,792	0,833	0,0890	0,081	0,086	0,085
2.	24 jam	EK	0,960	0,969	0,968	0,1007	0,102	0,102	0,101
		20	0,218	0,236	0,206	0,0145	0,017	0,013	0,015
		40	0,211	0,220	0,218	0,0137	0,015	0,014	0,014
		60	0,289	0,317	0,289	0,0288	0,026	0,023	0,026
		80	0,865	0,936	0,970	0,0898	0,098	0,102	0,097
3.	36 jam	EK	0,956	0,961	0,970	0,1003	0,101	0,102	0,101
		20	0,279	0,318	0,280	0,0216	0,026	0,022	0,023
		40	0,292	0,299	0,280	0,0146	0,024	0,021	0,020
		60	0,447	0,362	0,314	0,0411	0,031	0,026	0,033
		80	0,672	0,752	0,711	0,0673	0,077	0,072	0,072
4.	48 jam	EK	0,904	0,948	0,882	0,0943	0,1000	0,092	0,095
		20	0,190	0,260	0,238	0,0112	0,019	0,017	0,016
		40	0,228	0,206	0,224	0,0156	0,013	0,015	0,015
		60	0,438	0,533	0,489	0,0401	0,051	0,046	0,046
		80	0,731	0,788	0,790	0,0742	0,081	0,081	0,079
5.	60 jam	EK	0,883	0,983	0,810	0,0918	0,104	0,083	0,093
		20	0,214	0,310	0,258	0,0139	0,025	0,019	0,019
		40	0,301	0,280	0,308	0,0241	0,022	0,025	0,024
		60	0,264	0,276	0,350	0,0198	0,021	0,030	0,024
		80	0,610	0,683	0,750	0,0601	0,069	0,076	0,068

Lampiran 7: Data Hasil SDS-PAGE

1. a. Tabel Marker Protein Gelatin U3 12 Jam

No.	Berat Molekul (kDa)	Log Berat Molekul	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf
1.	180	2,255	6,5	1,6	0,246
2.	135	2,130	6,5	2	0,308
3.	100	2	6,5	2,8	0,431
4.	75	1,875	6,5	3,7	0,569
5.	63	1,799	6,5	4,3	0,662
6.	48	1,681	6,5	5,1	0,785
7.	35	1,544	6,5	5,9	0,908
8.	25	1,398	6,5	6,5	1

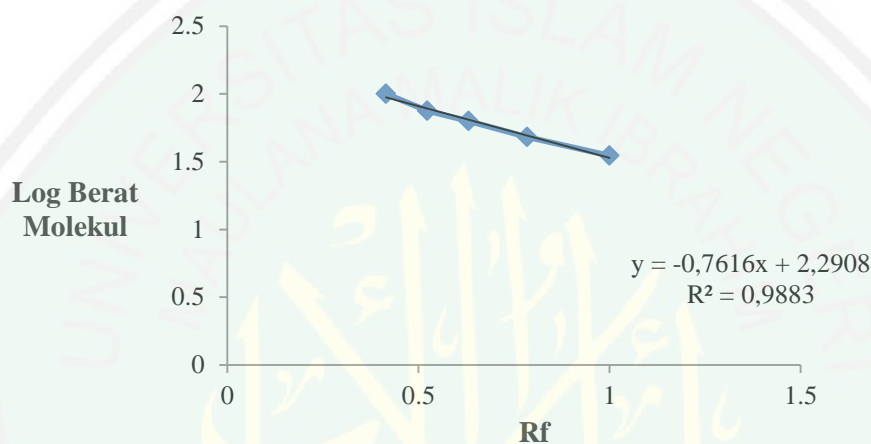


b. Sampel Gelatin U3 12 Jam

No.	Sampel Gelatin U3 12 Jam	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf	Log Berat Molekul	Berat Molekul (kDa)
1.	Ekstrak kasar	6,5	2,2	0,339	2,125	133
		6,5	2,5	0,385	2,076	119
		6,5	2,8	0,431	2,028	107
		6,5	2,9	0,446	2,011	103
		6,5	3,3	0,508	1,946	88
		6,5	3,4	0,523	1,930	85
		6,5	3,7	0,569	1,882	76
		6,5	4,2	0,646	1,881	63
		6,5	5,3	0,81	1,623	42
		6,5	5,6	0,862	1,574	38
2.	Aseton 20%	6,5	5,2	0,8	1,639	44
3.	Aseton 40%	6,5	5,3	0,815	1,623	42
4.	Aseton 60%	6,5	2,8	0,431	2,028	107
		6,5	5,3	0,815	1,623	42
5.	Aseton 80%	6,5	2,8	0,431	2,028	107
		6,5	5,3	0,815	1,623	42

2. a. Tabel Marker Protein Gelatin U3 24 Jam

No.	Berat Molekul (kDa)	Log Berat Molekul	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf
1.	100	2	6,5	2,7	0,415
2.	75	1,875	6,5	3,4	0,523
3.	63	1,799	6,5	4,1	0,631
4.	48	1,681	6,5	5,1	0,785
5.	35	1,544	6,5	6,5	1

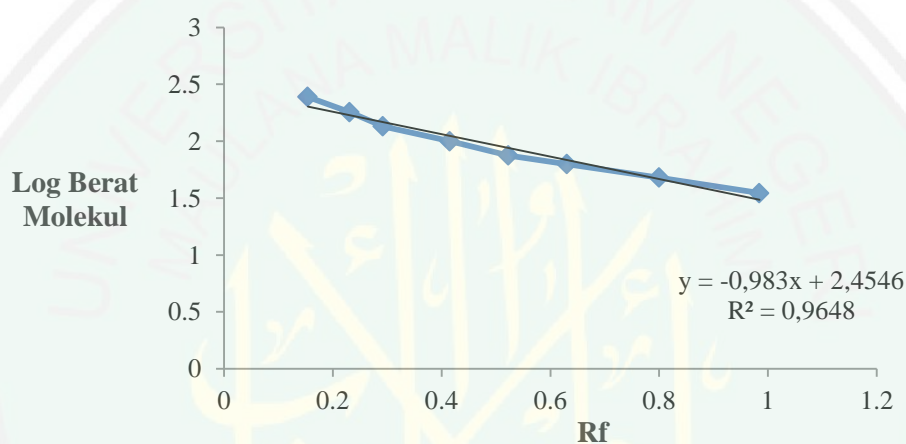


b. Sampel Gelatin U3 24 Jam

No.	Sampel Gelatin U3 24 Jam	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf	Log Berat Molekul	Berat Molekul (kDa)
1.	Ekstrak kasar	6,5	2,2	0,339	2,033	108
		6,5	2,5	0,385	1,998	100
		6,5	2,8	0,431	1,963	92
		6,5	3,2	0,492	1,916	82
		6,5	3,6	0,554	1,869	74
		6,5	3,8	0,585	1,846	70
		6,5	4,2	0,646	1,799	63
		6,5	4,9	0,754	1,717	52
2.	Aseton 20%	-	-	-	-	-
3.	Aseton 40%	-	-	-	-	-
4.	Aseton 60%	6,5	4	0,615	1,822	66
		6,5	2,2	0,339	2,03	108
		6,5	2,5	0,385	1,998	100
		6,5	2,8	0,431	1,963	92
		6,5	3,2	0,492	1,916	82
		6,5	3,6	0,554	1,869	74
		6,5	4,9	0,754	1,717	52
5.	Aseton 80%	6,5	4	0,615	1,822	66
		6,5	2,2	0,339	2,03	108
		6,5	2,5	0,385	1,998	100
		6,5	2,8	0,431	1,963	92
		6,5	3,2	0,492	1,916	82
		6,5	3,6	0,554	1,869	74

3. a. Tabel Marker Protein Gelatin U3 36 Jam

No.	Berat Molekul (kDa)	Log Berat Molekul	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf
1.	245	2,389	6,5	1	0,154
2.	180	2,255	6,5	1,5	0,231
3.	135	2,130	6,5	1,9	0,292
4.	100	2	6,5	2,7	0,415
5.	75	1,875	6,5	3,4	0,523
6.	63	1,799	6,5	4,1	0,631
7.	48	1,681	6,5	5,2	0,8
8.	35	1,544	6,5	6,4	0,985

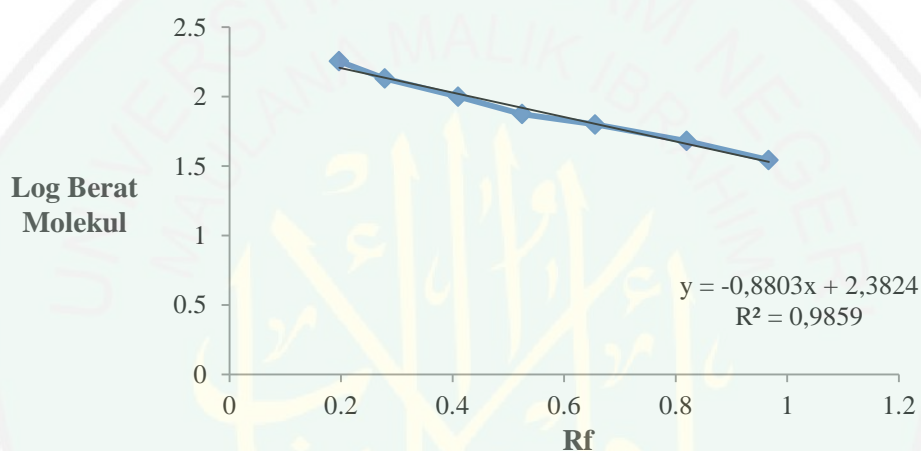


b. Sampel Gelatin U3 36 Jam

No.	Sampel Gelatin U3 36 Jam	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf	Log Berat Molekul	Berat Molekul (kDa)
1.	Ekstrak kasar	6,5	2	0,308	2,152	142
		6,5	2,2	0,339	2,122	132
		6,5	2,7	0,415	2,046	111
		6,5	3,1	0,477	1,986	97
		6,5	3,5	0,539	1,925	84
		6,5	4,2	0,646	1,819	66
		6,5	6,4	0,985	1,487	31
2.	Aseton 20%	-	-	-	-	-
3.	Aseton 40%	-	-	-	-	-
4.	Aseton 60%	-	-	-	-	-
5.	Aseton 80%	6,5	2	0,308	2,152	142
		6,5	2,2	0,339	2,122	132
		6,5	2,7	0,415	2,046	111
		6,5	3,1	0,477	1,986	97
		6,5	3,5	0,539	1,925	84
		6,5	4,2	0,646	1,819	66
		6,5	6,4	0,985	1,487	31

4. a. Tabel Marker Protein Gelatin U3 48 Jam

No.	Berat Molekul (kDa)	Log Berat Molekul	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf
1.	180	2,255	6,1	1,2	0,197
2.	135	2,130	6,1	1,7	0,279
3.	100	2	6,1	2,5	0,410
4.	75	1,875	6,1	3,2	0,525
5.	63	1,799	6,1	4	0,656
6.	48	1,681	6,1	5	0,820
7.	35	1,544	6,1	6,9	0,9867

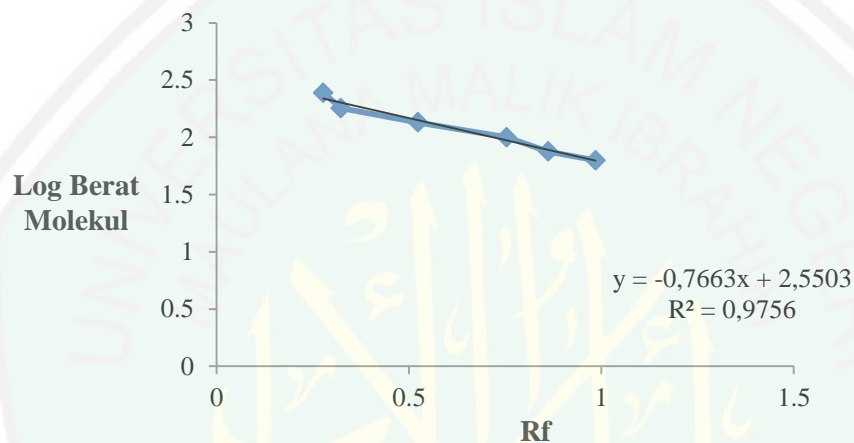


b. Sampel Gelatin U3 48 Jam

No.	Sampel Gelatin U3 48 Jam	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf	Log Berat Molekul	Berat Molekul (kDa)
1.	Ekstrak kasar	6,1	1,7	0,279	2,137	137
		6,1	1,9	0,312	2,108	128
		6,1	2,2	0,361	2,065	116
		6,1	2,3	0,377	2,051	113
		6,1	2,7	0,443	1,993	98
		6,1	3,2	0,525	1,920	83
		6,1	3,9	0,639	1,820	66
2.	Aseton 20%	-	-	-	-	-
3.	Aseton 40%	-	-	-	-	-
4.	Aseton 60%	6,1	1,7	0,279	2,137	137
		6,1	1,7	0,279	2,137	137
		6,1	1,9	0,312	2,108	128
		6,1	2,2	0,361	2,065	116
		6,1	2,3	0,377	2,051	113
		6,1	2,7	0,443	1,993	98
		6,1	3,2	0,525	1,920	83
5.	Aseton 80%	6,1	1,7	0,279	2,137	137
		6,1	1,7	0,279	2,137	137
		6,1	1,9	0,312	2,108	128
		6,1	2,2	0,361	2,065	116
		6,1	2,3	0,377	2,051	113
		6,1	2,7	0,443	1,993	98
		6,1	3,2	0,525	1,920	83

5. a. Tabel Marker Protein Gelatin U3 60 Jam

No.	Berat Molekul (kDa)	Log Berat Molekul	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf
1.	245	2,389	6,5	1,8	0,277
2.	180	2,255	6,5	2,1	0,323
3.	135	2,130	6,5	3,4	0,523
4.	100	2	6,5	4,6	0,754
5.	75	1,875	6,5	5,6	0,862
6.	63	1,799	6,5	6,4	0,985

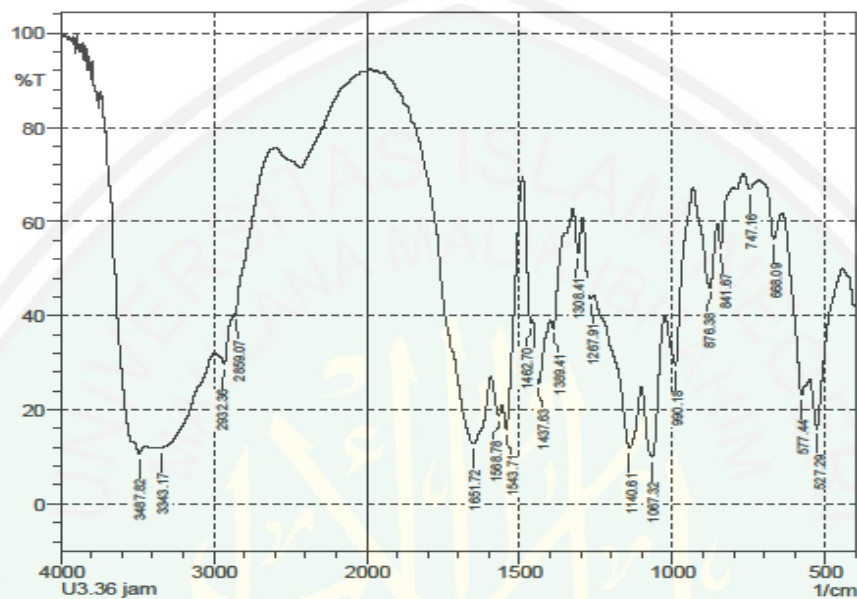


b. Sampel Gelatin U3 60 Jam

No.	Sampel Gelatin U3 60 Jam	Panjang Gel (cm)	Jarak Pita (cm)	Rf	Log Berat Molekul	Berat Molekul (kDa)
1.	Ekstrak kasar	6,5	3,5	0,539	2,140	138
		6,5	4	0,615	2,079	120
		6,5	4,5	0,692	2,020	105
		6,5	6,2	0,954	1,820	66
2.	Aseton 20%	-	-	-	-	-
3.	Aseton 40%	-	-	-	-	-
4.	Aseton 60%	-	-	-	-	-
5.	Aseton 80%	6,5	3,5	0,539	2,140	138
		6,5	4	0,615	2,079	120
		6,5	4,5	0,692	2,020	105

Lampiran 8: Spektra FTIR

1. Spektra FTIR gelatin 36 jam hasil pemurnian dengan aseton 80%

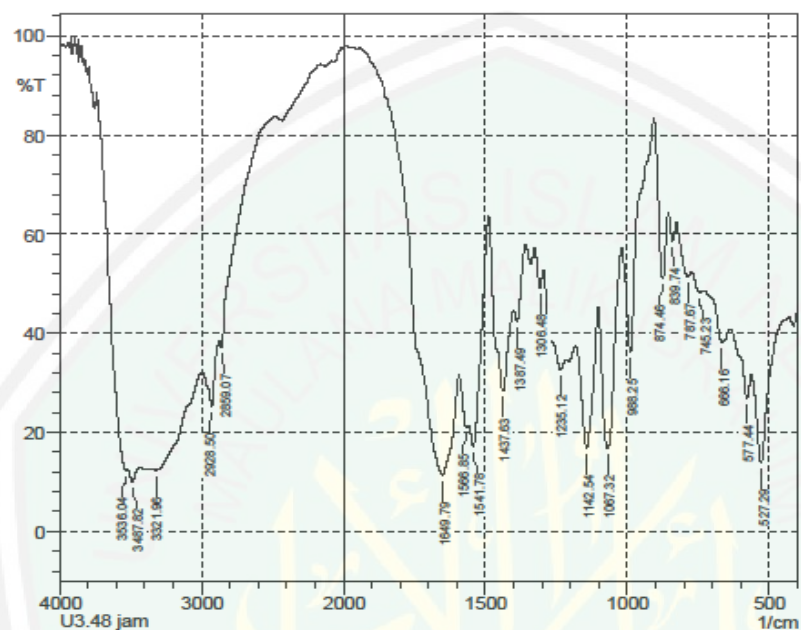


Comment:
U3.36 jam

Date/Time; 4/11/2018 9:23:40 AM
No. of Scans; 10
Resolution; 4.0
User; Kimia FMIPA-UB

Peak	Intensity	Corr. Ints	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are	
1	527.29	15.983	15.563	550.44	444.36	52.523	6.947
2	577.44	23.166	13.282	641.09	552.37	38.619	3.736
3	668.09	56.312	8.033	716.3	641.09	15.196	1.236
4	747.16	66.921	2.649	768.38	716.3	8.666	0.418
5	841.67	54.411	6.927	853.24	803.09	10.531	0.559
6	876.38	46.028	15.817	932.32	853.24	20.602	4.91
7	990.18	29.323	20.757	1024.89	932.32	33.047	6.539
8	1067.32	10	21.401	1100.11	1026.82	53.625	16.865
9	1140.61	11.832	17.897	1254.41	1102.04	91.233	17.88
10	1267.91	43.594	5.908	1292.98	1256.34	11.717	1.281
11	1308.41	53.263	8.515	1325.77	1292.98	7.821	0.974
12	1389.41	37.295	5.666	1399.06	1354.7	14.985	0.561
13	1437.63	25.653	13.371	1456.92	1399.06	28.288	4.628
14	1462.7	38.607	5.832	1489.71	1456.92	10.02	0.739
15	1543.71	15.739	14.986	1557.21	1489.71	31.909	3.722
16	1568.78	18.83	4.139	1593.85	1557.21	24.231	1.454
17	1651.72	12.749	26.587	1667.73	1593.85	124.283	38.739
18	2859.07	40.209	0.942	2864.86	2598.7	57.743	-10.809
19	2932.36	29.841	3.435	2951.65	2866.79	38.899	1.175
20	3343.17	11.998	0.608	3352.61	2999.86	255.581	7.768
21	3467.82	10.58	2.275	3524.47	3443.46	75.249	2.935

2. Spektra FTIR gelatin 48 jam hasil pemurnian dengan aseton 80%

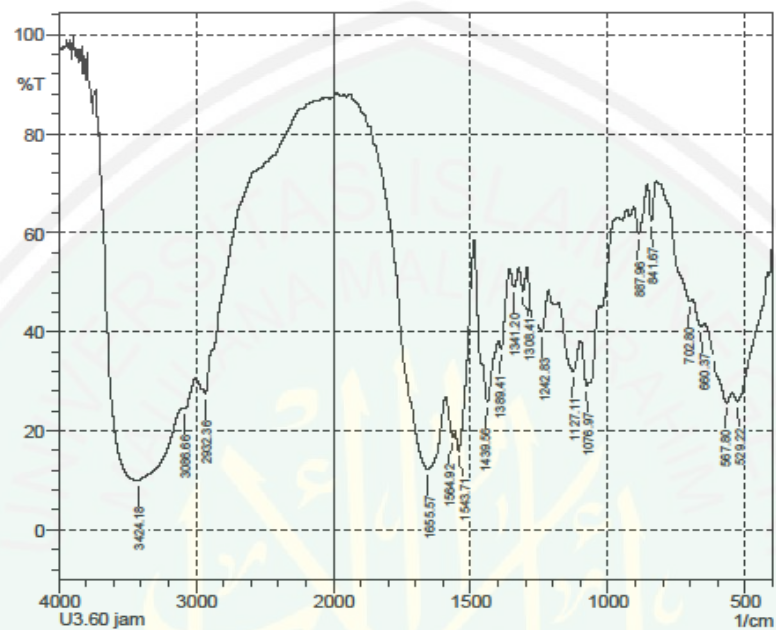


Comment;
U3.48 jam

Date/Time; 4/11/2018 9:26:48 AM
No. of Scans; 10
Resolution; 4.0
User; Kimia FMIPA-UB

Peak	Intensity	Corr. Int	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area	
1	527.29	13.876	21.155	562.01	446.29	63.247	13.233
2	577.44	26.937	6.777	633.37	562.01	33.816	2.164
3	666.16	37.997	5.447	731.73	633.37	35.927	1.406
4	745.23	48.21	1.623	772.24	731.73	12.366	0.316
5	787.67	51.4	3.726	826.24	772.24	14.118	0.96
6	839.74	58.636	4.652	855.17	826.24	6.249	0.513
7	874.46	51.031	20.737	905.31	855.17	10.419	3.671
8	988.25	36.075	28.312	1019.11	905.31	25.467	7.247
9	1067.32	16.654	33.782	1102.04	1021.04	41.808	18.173
10	1142.54	16.845	24.442	1183.05	1103.97	44.89	14.363
11	1235.12	32.654	3.466	1265.98	1215.83	22.907	0.956
12	1306.48	49.236	5.09	1325.77	1294.91	8.721	0.669
13	1387.49	42.316	5.904	1399.06	1356.63	13.295	0.807
14	1437.63	26.267	24.626	1487.78	1399.06	36.472	12.222
15	1541.78	17.093	13.69	1557.21	1487.78	34.804	4.741
16	1566.85	20.88	3.217	1593.85	1557.21	22.271	0.848
17	1649.79	11.364	32.577	1848.44	1593.85	122.31	51.389
18	2859.07	37.178	2.54	2870.64	2481.05	68.801	0.334
19	2928.5	25.278	10.325	2999.86	2872.57	64.606	6.771
20	3321.96	12.372	1.87	3352.81	3001.79	253.041	9.309
21	3487.62	10	2.75	3522.54	3437.68	79.481	3.659
22	3536.04	12.363	4.443	3728.91	3524.47	96.546	4.025

3. Spektra FTIR gelatin 60 jam hasil pemurnian dengan aseton 80%



Comment;
U3.60 jam

Date/Time; 4/11/2018 9:31:20 AM
No. of Scans; 10
Resolution; 4.0
User; Kimia FMIPA-UB

Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are	
1	529.22	25.97	4.94	546.58	417.36	58.77	4.61
2	567.8	25.66	4.66	648.8	548.51	50.22	3.13
3	660.37	40.97	2.08	691.23	648.8	15.59	0.5
4	702.8	46.23	2.46	822.38	691.23	31.7	-0.03
5	841.67	62.33	7.76	857.1	822.38	6.12	0.77
6	887.96	59.67	7.14	905.31	857.1	9.49	1.24
7	1076.97	29.18	3.14	1100.11	1067.32	16.03	0.58
8	1127.11	31.96	8.83	1179.19	1100.11	34.51	4.56
9	1242.83	39.98	3.65	1256.34	1215.83	14.99	0.82
10	1308.41	48.28	4.62	1323.84	1294.91	8.59	0.59
11	1341.2	49	3.73	1358.56	1323.84	10.22	0.57
12	1389.41	36.67	4.99	1399.06	1358.56	14.99	0.88
13	1439.56	25.84	21.74	1485.85	1399.06	40.23	11.76
14	1543.71	15.95	11.16	1557.21	1487.78	38.21	5.52
15	1564.92	18.77	2.48	1590	1557.21	21.82	0.83
16	1655.57	12.19	27.32	1846.51	1591.93	136.08	49.16
17	2932.36	27.51	3.06	2951.65	2536.98	116.61	0.74
18	3086.66	24.44	0.75	3096.3	3005.65	51.66	0.88
19	3424.18	10	0.62	3435.75	3096.23	283.58	13.8

Lampiran 9: Analisis Data *Two Way* ANOVA SPSS 16

Univariate Analysis of Variance

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: kadar protein

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.085 ^a	24	.004	176.731	.000
Intercept	.173	1	.173	8.614E3	.000
sampel	.000	4	.000	5.833	.001
Konsentrasi aseton	.082	4	.020	1.017E3	.000
sampel * konsentrasi aseton	.003	16	.000	9.354	.000
Error	.001	50	2.012E-5		
Total	.260	75			
Corrected Total	.086	74			

a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .983)

Homogeneous Subsets

Kadar protein

Tukey HSD

Konsentrasi aseton	N	Subset			
		1	2	3	4
40	15	.0172			
20	15	.0176			
60	15		.0301		
80	15			.0802	
EK	15				.0952
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2.01E-005.