

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN
GELATIN KOMERSIAL MENGGUNAKAN SDS-PAGE (SODIUM
DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)
DAN ANALISIS KADAR PROTEIN MENGGUNAKAN
SPEKTROFOTOMETER UV-VIS**

SKRIPSI

**Oleh:
ZAHROTUL MAKNUNAH
NIM. 10630060**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri 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
2015**

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN
GELATIN KOMERSIAL MENGGUNAKAN SDS-PAGE (SODIUM
DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)
DAN ANALISIS KADAR PROTEIN MENGGUNAKAN
SPEKTROFOTOMETER UV-VIS**

SKRIPSI

Oleh:
ZAHROTUL MAKNUNAH
NIM. 10630060

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 09 Januari 2015

Pembimbing I

Pembimbing II

Akyunul Jannah, S.Si., M.P.
NIP. 19750410 200501 2 00 9

Tri Kustono Adi, M. Sc.
NIP. 19710311 200312 1 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia

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

**GELATIN KOMERSIAL MENGGUNAKAN SDS-PAGE (SODIUM
DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)
DAN ANALISIS KADAR PROTEIN MENGGUNAKAN
SPEKTROFOTOMETER UV-VIS**

SKRIPSI

Oleh:
ZAHROTUL MAKNUNAH
NIM. 10630060

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk memperoleh Gelar Sajana Sains (S. Si.)
Tanggal: 09 Januari 2015**

**Penguji Utama : Diana Candra Dewi, M. Si (.....)
NIP. 19770720 200312 2 001**

**Ketua Penguji : Ahmad Hanafi, M. Sc (.....)
NIPT. 20140201 1 422**

**Sekretaris Penguji : Akyunul Jannah, S.Si, M.P (.....)
NIP. 19750410 200501 2 00 9**

**Anggota Penguji : Tri Kustono Adi, M. Sc (.....)
NIP. 19710311 200312 1 002**

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia**

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

HALAMAN PERSEMBAHAN



*Karya kecil ini saya persembahkan untuk
Bunda, Bapak, Kakak, Adik, Keponakan,
Keluarga besar, dan Almamater.*

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Zahrotul Maknunah

NIM : 10630060

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Karakterisasi Profil Protein Gelatin Komersial menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dan Analisis Kadar proteinnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya kuni sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tugas akhir/skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 16 Januari 2015

Yang Membuat Pernyataan,

Zahrotul Maknunah

10630060

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh.

Alhamdulillahirobbil'alamiin. Puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya penulis mampu menyelesaikan laporan hasil penelitian yang berjudul “**Karakterisasi Profil Protein Gelatin Komersial Menggunakan SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) dan Analisis Kadar Proteinnya Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis**”.

Sholawat serta salam semoga terlimpah ke pangkuan Nabi yang agung, Nabi Muhammad Saw. beserta keluarga dan sahabatnya. Di dalam tulisan ini disajikan beberapa pokok bahasan mengenai karakteristik profil protein beberapa gelatin komersial menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis dan SDS-PAGE.

Karakter profil protein gelatin komersial hasil spektrofotometer UV-Vis yang disajikan berupa kadar protein. Hasil analisis SDS-PAGE dideskripsikan dengan memperhatikan pita protein yang terbentuk dan membandingkan berat molekul masing-masing sampel. Hasil penelitian memiliki nilai guna untuk mengekspresikan karakter protein gelatin komersial yang beredar di masyarakat terutama daerah Malang, Jawa Timur sehingga dapat dijadikan sebagai informasi dan bahan pertimbangan penelitian selanjutnya.

Dengan terselesainya tulisan ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, Bapak Prof. H. Mudjia Raharjo, M.Si.

2. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, Ibu Dr. Drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si.
3. Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, Ibu Elok Kamilah Hayati.
4. Para dosen pembimbing, Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P dan Ibu Elly Rustanti, M.Si yang telah meluangkan waktu dengan sabar dan telaten, memberikan masukan dan arahan untuk membimbing penulis serta Bapak Tri Kustono Adi, M.Sc yang telah memberikan saran dan mengarahkan penulis dalam mengintegrasikan sains dengan al-Qur'an.
5. Ibu Diana Candra Dewi, M.Si dan Bapak Ahmad Hanafi, M.Sc selaku dosen penguji tugas akhir yang telah memberikan banyak saran
6. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan dan dukungan yang membangun.
7. Seluruh Bapak/Ibu dosen jurusan Kimia yang telah mendidik dan memberikan banyak pengetahuan.
8. Karyawan Laboratorium dan Administrasi Jurusan Kimia dan Laboran Laboratorium Genetika Jurusan Biologi.
9. Ayah, Bunda, Kakak, Adik, keponakan dan seluruh keluarga besar penulis yang telah memberikan do'a, kasih sayang dan motivasi yang sangat berharga.

10. Keluarga besar LTPLM yang telah memberikan semangat dan guyonan *cementhel*. Khususnya penulis sampaikan kepada Anik, Indah², Iis, Nia, Elfin, Silvi, Anis, mbak Ainun, dan mbak Oca.

11. Seluruh kawan seangkatan Kimia 2010 yang saling memberikan semangat dalam menyelesaikan tugas akhir ini. Khususnya penulis sampaikan kepada *Fashion Holic* (Fitri, Eca, maya). Ikha dan qori yang telah membantu mendapatkan sampel. Oci, Lilik, mbak Liza, Day, Linda, Luluk, Tutus, Asif, Rukmana, dan Fitrah selaku rekan di Laboratorium. Serta pihak-pihak yang telah membantu penulis yang tidak mungkin disebutkan satu per satu.

Semoga dengan tersusunnya skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi dan menambah khasanah ilmu pengetahuan. Amin.

Malang, Januari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Batasan Masalah	6
1.5. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Gelatin	8
2.2 Protein	11
2.3 Presipitasi Protein	15
2.4 Karakterisasi Protein	17
2.4.1 Karakterisasi protein menggunakan SDS-PAGE	18
2.4.2 Karakterisasi protein menggunakan spektrofotometri UV- Vis	22
2.5 Gelatin dalam Perspektif Hukum Islam	25
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28
3.2 Alat dan Bahan	28
3.3 Rancangan Penelitian	29
3.4 Tahapan Penelitian	30
3.5 Prosedur Penelitian	31
3.5.1. Preparasi Sampel	31
3.5.2. Presipitasi Protein	31
3.5.2.1 Presipitasi aseton	31
3.5.2.2 Presipitasi etanol	32
3.5.3. Penentuan berat molekul protein menggunakan SDS-PAGE	32
3.5.3.1 Pembuatan gel SDS-PAGE	33
3.5.3.2 Preparasi dan <i>running</i> sampel	33
3.5.3.3 Pewarnaan dan pelunturan gel	34
3.5.3.4 Analisis berat molekul	34

3.5.4. Penentuan Kadar Protein Gelatin menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	34
3.5.4.1 Pembuatan reagen biuret	
3.5.4.2 Penentuan panjang gelombang maksimum dan pembuatan kurva baku standart.....	34
3.5.4.3 Penentuan kadar protein gelatin hasil presipitasi	36
3.6 Analisis data	36

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel	37
4.2 Presipitasi protein	38
4.3 Karakterisasi profil protein gelatin menggunakan SDS-PAGE	40
4.4 Karakterisasi Profil Protein Gelatin Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	51
4.5 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam	60

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan	64
5.2 Saran	64

DAFTAR PUSTAKA	65
-----------------------------	-----------

DAFTAR TABEL

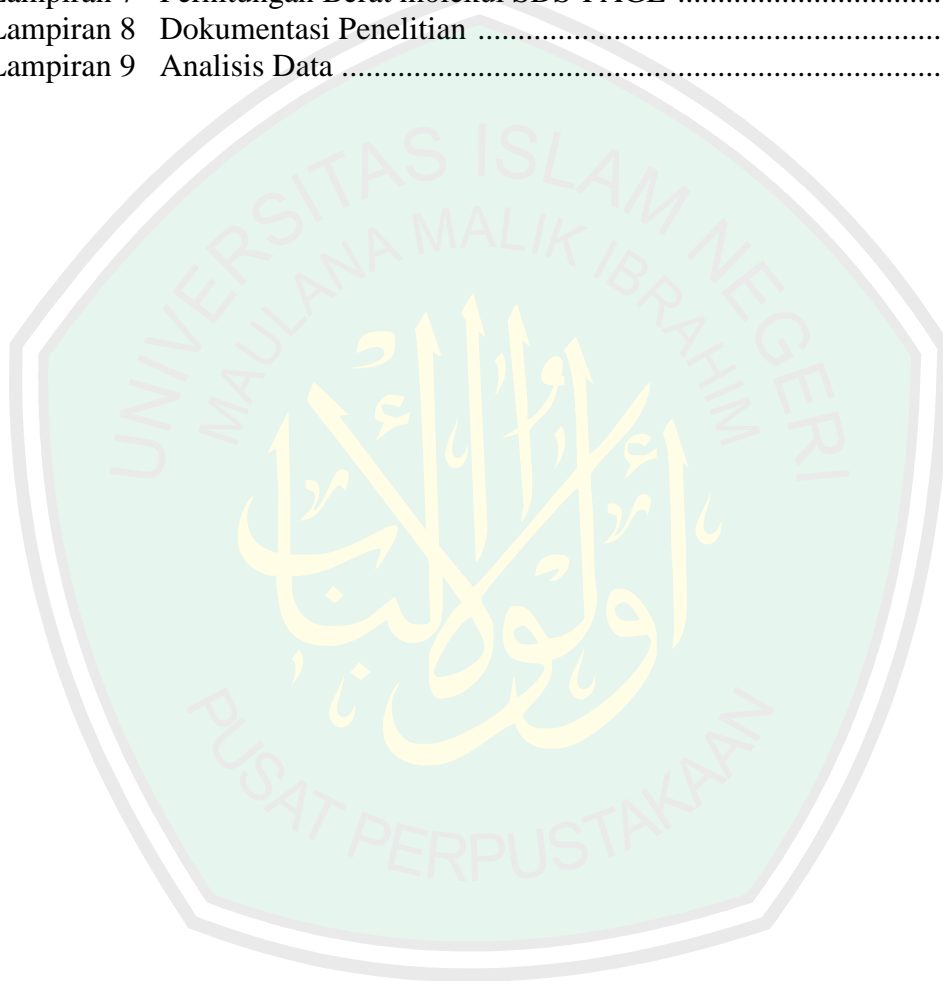
Tabel 2.1	Konsentrasi total akrilamid dan berat molekul protein	20
Tabel 3.1	Rancangan penelitian	30
Tabel 4.1	Perbandingan berat molekul gelatin sapi standar dengan gelatin komersial	48
Tabel 4.2	Perbandingan jumlah pita protein gelatin yang terdeteksi hasil SDS-PAGE sebelum dan setelah presipitasi aseton dan etanol	49
Tabel 4.3	Kadar protein (%) gelatin tanpa perlakuan presipitasi	54
Tabel 4.4	Hasil uji DMRT kadar protein (%) gelatin sapi standar berdasarkan kombinasi pelarut organik dan konsentrasi	56
Tabel 4.5	Hasil uji DMRT kadar protein (%) gelatin sapi komersial berdasarkan kombinasi pelarut organik dan konsentrasi	57
Tabel 4.6	Hasil uji DMRT kadar protein (%) gelatin T1 berdasarkan kombinasi pelarut organik dan konsentrasi	58
Tabel 4.7	Hasil uji DMRT kadar protein (%) gelatin T2 berdasarkan kombinasi pelarut organik dan konsentrasi	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Reaksi pemutusan ikatan hidrogen tropokolagen	8
Gambar 2.2	Reaksi hidrolisis ikatan silang kovalen tropokolagen	9
Gambar 2.3	Struktur kimia gelatin	10
Gambar 2.4	Struktur protein primer, sekunder, tersier, dan kuartener	13
Gambar 2.5	Struktur <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS)	19
Gambar 2.6	Proses elektroforesis	20
Gambar 4.1	Reaksi polimerisasi akrilamid	41
Gambar 4.2	Pengaruh SDS, pemanasan, dan <i>reducing agent</i>	43
Gambar 4.3	Proses <i>running</i> sampel SDS-PAGE	44
Gambar 4.4	Hasil karakterisasi protein sampel gelatin sapi standar dengan SDS-PAGE	45
Gambar 4.5	Hasil karakterisasi protein sampel gelatin sapi komersial dengan SDS-PAGE	46
Gambar 4.6	Hasil karakterisasi protein sampel gelatin T1 dengan SDS-PAGE ..	46
Gambar 4.7	Hasil karakterisasi protein sampel gelatin T2 dengan SDS-PAGE ..	46
Gambar 4.8	Kurva panjang gelombang maksimum	52
Gambar 4.9	Grafik kurva standar BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	53
Gambar 4.10	Reaksi dugaan antara protein dan reagen biuret.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Rancangan Penelitian	70
Lampiran 2	Skema Kerja	71
Lampiran 3	Pembuatan Reagent dan Larutan	76
Lampiran 4	Kurva Panjang Gelombang Maksimum	80
Lampiran 5	Kurva Standar BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>).....	81
Lampiran 6	Hasil Spektrofotometer UV-Vis	85
Lampiran 7	Perhitungan Berat molekul SDS-PAGE	87
Lampiran 8	Dokumentasi Penelitian	94
Lampiran 9	Analisis Data	97



ABSTRAK

Maknunah, Z. 2015. **Karakterisasi Profil Protein Gelatin Komersial Menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dan Analisis Kadar Proteinnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.** Pembimbing I: Akyunul Jannah, S.Si., M.P.; Pembimbing II: Tri Kustono Adi, M.Sc.; Konsultan: Elly Rustanti, M.Si.

Kata kunci: Gelatin komersial, protein, presipitasi etanol dan aseton, SDS-PAGE, spektrofotometer UV-Vis.

Gelatin merupakan salah satu produk turunan protein yang digemari masyarakat. Seringkali gelatin yang beredar di pasaran tidak memiliki label kemasan sehingga tidak memiliki informasi karakteristik gelatin komersial yang jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein gelatin komersial berdasarkan kombinasi perlakuan presipitasi protein dari jenis pelarut dan konsentrasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan SDS-PAGE.

Protein gelatin diperoleh dari presipitasi menggunakan pelarut organik dengan variasi jenis pelarut, yaitu etanol dan aseton serta variasi konsentrasi, yaitu 20, 40, 60, dan 80 %. Hasil presipitasi diuji menggunakan SDS-PAGE metode Laemli untuk mendapatkan berat molekul gelatin. Selanjutnya kadar protein gelatin dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis metode Biuret. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *Duncan* ($\alpha = 0,05$).

Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE, tidak menunjukkan adanya korelasi antara jenis dan konsentrasi pelarut organik yang digunakan terhadap pola pita protein. Gelatin sapi standar memiliki 4 pita protein dimana terdapat kemiripan pada 130 kDa di setiap gelatin komersial. Pita protein gelatin komersial yang tidak dimiliki gelatin sapi standar untuk gelatin sapi komersial, gelatin T1 dan gelatin T2 adalah 6, 3, dan 6 buah pita protein. Hasil analisis kadar protein menunjukkan gelatin tanpa presipitasi pada gelatin sapi standar, gelatin sapi komersial, gelatin T1 dan gelatin T2 memiliki kadar protein berturut-turut ialah 80,51 %, 72,94 %, 73,92 %, dan 86,45 %. Variasi konsentrasi pelarut organik pada presipitasi protein memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar protein masing-masing gelatin dimana hasil presipitasi pada konsentrasi etanol dan aseton 80 % memiliki kadar protein tertinggi.

ABSTRACT

Maknunah, Z. 2015. **Characterization Of Protein Profile of Commercial Gelatin Using SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and The Analysis Of It's Protein Content Using UV-Vis Spectrophotometry.** Supervisor I: Akyunul Jannah, S.Si. M.P; Supervisor II: Tri Kustono Adi, M.Sc; Supervisor III: Elly Rustanti, M.Si.

Keywords: Commercial gelatin, protein, precipitation (ethanol and acetone), UV-Vis Spectrophotometer, SDS-PAGE.

Gelatin is a protein-derived product which favored by society. However, commercial products-with gelatin contained does not provide the information of characteristic of gelatin on their packages. This research aims to characterize protein profile of commercial gelatin based on the variation of organic solvent and its concentration on protein precipitation using UV-Vis spectrophotometer and SDS-PAGE.

Commercial protein gelatin were obtained from precipitation using ethanol and acetone in concentration of 20, 40, 60, and 80 %. The protein content and its molecular weight were determined using Biuret and Laemli method. The data was analysed using ANOVA and Duncan test ($\alpha = 0,05$).

The result showed that protein band pattern of gelatin were uncorrelated with organic solvent and each concentration of precipitation that used. standar bovine gelatin showed the presence of 4 protein bands where is similar with commercial bovine gelatin, T1 gelatin, and T2 gelatin in 130 kDa. Protein band which unrepresented in protein band of standar bovine gelatin were 6, 3, and 6 protein band for commercial bovine gelatin, T1 gelatin, and T2 gelatin. According to analysis, protein content of standar bovine gelatin, commercial bovine gelatin, T1 gelatin, and T2 gelatin were 80,51 %, 72,94 %, 73,92 %, and 86,45 % respectively without precipitation. Variation of concentration of organic solvents on protein precipitation is significantly different ($p < 0.05$) in each gelatin where 80 % ethanol and 80 % acetone yielded the highest protein content.

المكتونة, زهرة. ٢٠١٥. توصيف البروتين الشخصي الجيلاتين التجاري عن طريق إس دي إس بايج (SDS-PAGE) و تحليل محتوى البروتين عن طريق الأشعة فوق البنفسجية طيفي فيس.

المشرف الأولى: أعين الجنة الماجستير، المشرف الثاني: تري كسطان عدي الماجستير، المشرف الثالث: ألي رستتي الماجستير.

كلمات البحث: الجيلاتين التجارية، وترسيب البروتين (الايثانول والأسيتون) والأشعة فوق البنفسجية طيفي فيس، SDS-PAGE.

إنّ الجيلاتين هي إحدى من حصول البروتينات المشتقات الجمهور في المجتمع. و كثيراً من الجيلاتين في السوق لم تكن لها العلامة لذلك لم تكن لها المعلومات في وصفية الجيلاتين التجارية واضحة. تهدف هذه الدراسة لمعرفة الشخصية من البروتين التجارية استناداً إلى تحلّل العمل في ترسيب البروتين الجيلاتين من نوع المذيبات والتركييز باستخدام الأشعة فوق البنفسجية طيفي - فيس و SDS-PAGE إنّ البروتين الجيلاتين محصول من الترسيب باستخدام المذيبات العضوية مع بعض الاختلافات في نوع المذيبات (الايثانول والأسيتون) والتركييز (٢٠، ٤٠، ٦٠، و ٨٠٪). فيقام بتحليل حصول الترسيب باستخدام طريقة البيوريت بالأشعة فوق البنفسجية طيفي - فيس و SDS-PAGE باستخدام طريقة Laemli للحصول على محتوى البروتين والوزن الجزئي من الجيلاتين. فحلّل محتوى البروتين الجيلاتين بواسطة ANOVA، و بواسطة دنكان ($\alpha = 0,05$).

استناداً على حصول التحليل، محتوى البروتين في الجيلاتين البقر (ستندر) و جيلاتين البقر التجارية و الجيلاتين ت١، الجيلاتين ت٢ هي ٨٠,٥١%، ٧٢,٩٤%، ٧٣,٩٢%، و ٨٠,٥١%. توفر اختلافات تركيز المذيبات العضوية في ترسيب البروتينات تأثيراً مختلفاً معنوياً ($P < 0,05$) على محتوى البروتين في كل الجيلاتين. و تحصل الترسيب الإيثانول ٨٠٪ و ٨٠٪ الأسيتون أعلى محتوى البروتين. و لم يظهر حصول SDS-PAGE على وجود ارتباط بين النوع و تركيز المذيبات العضوية المستخدمة في نمط شريطة السروتين. و كانت جيلاتين البقر (ستندر) اربعة أشرطة البروتين متساوية تقريبية في ١٣٠ كيلو دلتون بالجلاتين البقر التجارية و الجيلاتين ت١، الجيلاتين ت٢. فكانت أشرطة البروتين من جيلاتين البقر (ستندر) مختلفة في ٦,٣,٦ أشرطة البروتين بالجلاتين البقر التجارية و الجيلاتين ت١، الجيلاتين ت٢.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah berfirman dalam Q.S An-Nahl ayat 5 yang berbunyi:

وَالآنَعَمَّ خَلَقَهَا لَكُمْ فِيهَا دِفٌّ وَمَنْفَعٌ وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ ﴿٥﴾

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

Ayat di atas mengandung makna bahwa Allah SWT menciptakan binatang ternak (unta, sapi, dan kambing) agar dapat dimanfaatkan oleh manusia dimana sebagian pada binatang ternak tersebut terdapat bulu dan kulit yang dapat dijadikan pakaian yang dapat menghangatkan tubuh manusia dan sebagian lainnya dapat dimanfaatkan untuk dimakan (As-Suyuthi dan Al-Mahalli, 2010). Dengan demikian, binatang ternak memiliki keistimewaan dengan beberapa manfaat tersebut. Ayat ini merupakan uraian menyangkut sebagian nikmat Allah SWT kepada manusia, yaitu nikmat-Nya yang patut untuk disyukuri melalui binatang ternak yang diciptakan-Nya (Shihab, 2002).

Sebagai manusia yang dikaruniai akal, sudah seharusnya manusia dapat lebih memanfaatkan nikmat Allah SWT tersebut. Seiring dengan berkembangnya pengetahuan dan teknologi saat ini, binatang ternak dapat diolah menjadi bahan pangan maupun bahan tambahan pangan bergizi tinggi protein yang variatif dan menarik.

Salah satu bahan pangan kaya protein yang cukup digemari oleh masyarakat adalah gelatin. Akan tetapi, banyak gelatin yang beredar di pasaran

khususnya toko kue tidak memiliki label kemasan sehingga belum diketahui karakteristiknya. Beberapa karakteristik suatu bahan pangan dapat diketahui melalui suatu penelitian. Pada penelitian ini, kami akan melakukan analisis makanan terhadap gelatin yang menitikberatkan pada senyawa yang banyak terkandung di dalamnya, yaitu protein.

Karakterisasi profil protein merupakan salah satu aspek penting untuk mengetahui karakteristik gelatin mengingat penyusun utama gelatin komersial adalah protein dengan kandungan protein berkisar antara 85 sampai 92 % (Scrieber dan Gareis, 2007). Menurut Gilseman and Ross-Murphy (2000) dalam Hafidz, (2011) komposisi dan sekuensi asam amino dalam gelatin dari satu sumber bahan baku hewan yang satu dengan lainnya adalah berbeda. Perbedaan inilah yang kemudian juga menjadikan karakterisasi profil protein penting dilakukan.

Beberapa penelitian mengenai karakterisasi protein gelatin telah dilakukan. Rawdkuen, *et. al.* (2013) melaporkan bahwa gelatin sapi komersial memiliki pita protein mayor dengan intensitas rendah pada β dan α chain. Hafidz, *et al.* (2011) menyatakan bahwa polipeptida gelatin dapat diketahui berdasarkan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dan HPLC dimana berat molekul gelatin sapi di bawah 100 – 200 kDa tidak dapat terdeteksi dengan baik. Gelatin sapi juga memiliki asam amino yang lebih dominan pada glisin, prolin, arginin.

Penelitian lainnya dilakukan oleh Said, *et. al* (2011) yang melaporkan kadar protein gelatin komersial menggunakan metode Kjeldahl yang bernilai 83,36 sampai 89,74 %. Hermanto, *et al.* (2013) telah melaporkan protein gelatin

sapi sebelum dan setelah hidrolisis pepsin menggunakan Spektrofotometri UV-Vis, *Fourier Transfer Infrared Spectroscopy* (FTIR) dan SDS-PAGE. Berdasarkan spektrum UV-Vis, gelatin sapi sebelum dan setelah dihidrolisis menggunakan pepsin berbeda pada serapan 229 nm dan 240 nm. Sementara gugus fungsinya ialah regangan N-H, C=O, dan C-N serta tekukan OCN.

Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi protein gelatin komersial. Metode spektrofotometri UV-Vis sebagai analisis kadar protein dipilih karena memiliki banyak keuntungan, diantaranya dapat digunakan untuk analisis suatu zat dalam jumlah kecil, pengerjaannya mudah, sederhana, cukup sensitif dan selektif, biaya relatif murah dan mempunyai kepekaan analisis yang cukup tinggi (Munson, 1991). Metode analisis protein berikutnya adalah SDS-PAGE yang didasarkan pada perbedaan berat molekul dalam memisahkan protein dari suatu sampel. Metode ini memiliki kelebihan yang dapat digunakan tidak hanya untuk pemisahan berbagai protein, tetapi juga untuk mengetahui serta membandingkan berat molekulnya (Bintang, 2010).

Kemurnian sampel merupakan faktor penting dalam SDS-PAGE. Sampel yang encer, asam, sangat kental, atau yang mengandung senyawa pengganggu seperti kalium, guanidin hidroklorida, atau deterjen ionik dapat mempengaruhi analisis SDS-PAGE. Masalah tersebut dapat diatasi dengan metode presipitasi untuk memekatkan protein dan menghilangkan kontaminan (Anthony, *et al.*, 2002).

Presipitasi protein dapat dilakukan dengan penggunaan pelarut organik. Pelarut organik yang banyak digunakan adalah etanol dan aseton (Suhartono, *et al.*, 1992 dalam Lawati, 2013). Penambahan pelarut organik ke dalam larutan

protein dalam air bekerja dengan cara menurunkan konstanta dielektrik (Wirahadikusumah, 2001).

Protein gelatin, seperti protein pada umumnya, dapat diendapkan dengan pelarut organik. Presipitasi protein gelatin babi dengan pelarut organik, yaitu aseton telah dilaporkan oleh Aina, *et al.* (2013). Azira, *et al.* (2010) juga menggunakan metode presipitasi aseton untuk mendeteksi adanya gelatin (sapi atau babi) dari sampel permen jelly, permen karet, cangkang kapsul, dan *marshmallow*. Kedua penelitian tersebut menunjukkan bahwa presipitasi pelarut organik dapat diaplikasikan pada gelatin. Raharjo, *et al.* (2007) menambahkan bahwa pemilihan jenis dan jumlah pelarut organik sangat penting supaya didapatkan kondisi pengendapan protein yang maksimal tanpa mengendapkan senyawa lain yang tidak diinginkan serta dapat meningkatkan terdeteksinya protein-protein lain yang ukurannya relatif kecil pada analisis SDS-PAGE.

Penelitian mengenai presipitasi protein pada berbagai konsentrasi pelarut organik telah dilakukan. Sharma, *et al.* (2014) menggunakan pelarut organik berupa aseton dengan variasi konsentrasi 40, 60, 80, dan 100 % terhadap protease, bromelain, dan sistein yang diisolasi dari nanas (*Ananas comosus*). Hasil presipitasi menunjukkan bahwa konsentrasi protein maksimum diperoleh pada 80 % aseton. Melas, *et al.* (1994) melaporkan presipitasi aseton pada *Low Molecular Weight Subunit of Glutenin* (LMWSG) dari gandum. Variasi konsentrasi aseton yang diberikan adalah 20, 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 % dimana 40 % konsentrasi aseton dapat memisahkan protein LMWSG dengan baik. Penelitian berikutnya oleh Cahyanto, *et al.* (2008) yang memilih etanol pada konsentrasi 60, 70, dan 80 %. Presipitasi etanol pada konsentrasi 80 % (v/v) menghasilkan larutan enzim

selulase dengan kadar protein terlarut paling tinggi, yaitu 15, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Gemili, *et al.* (2007) memanfaatkan etanol sebagai agen presipitat dalam proses pemurnian parsial lisozim putih telur ayam pada 20, 30, dan 40 % etanol (v/v). Konsentrasi etanol 20 % menghasilkan total protein tertinggi sebesar 98 %.

Penelitian di atas menjelaskan bahwa penentuan jenis dan konsentrasi pelarut organik merupakan hal penting dalam presipitasi karena protein akan mengendap pada konsentrasi (pelarut organik) tertentu. Pada penelitian ini, kami menerapkan presipitasi aseton dan etanol dengan menambahkan modifikasi konsentrasi yaitu, 20, 40, 60, dan 80 % sehingga diharapkan dapat memperoleh konsentrasi pelarut organik yang tepat dalam memaksimalkan jumlah protein dari sampel gelatin dan memudahkan terdeteksinya protein pada pita protein SDS-PAGE.

Berdasarkan permasalahan di atas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai karakterisasi profil protein gelatin komersial dengan memanfaatkan informasi kadar protein spektrofotometri UV-Vis dan berat molekul SDS-PAGE dengan perlakuan presipitasi protein. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan pengetahuan di bidang karakterisasi profil protein terutama dalam penentuan kadar protein dan berat molekul gelatin.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil karakterisasi profil protein gelatin komersial menggunakan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan kombinasi perlakuan presipitasi protein dari jenis pelarut dan konsentrasi?

2. Bagaimana hasil karakterisasi profil protein gelatin komersial menggunakan SDS-PAGE berdasarkan kombinasi perlakuan presipitasi protein dari jenis pelarut dan konsentrasi?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui hasil karakterisasi profil protein gelatin komersial menggunakan SDS-PAGE berdasarkan kombinasi perlakuan presipitasi protein dari jenis pelarut dan konsentrasi.
2. Mengetahui kadar protein gelatin komersial menggunakan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan kombinasi perlakuan presipitasi protein dari jenis pelarut dan konsentrasi.

1.4 Batasan Masalah

1. Pada penelitian ini digunakan sampel gelatin komersial yang diperoleh dari tiga toko kue di daerah kota Malang, Jawa Timur. Dan sebagai standar, digunakan sampel gelatin sapi dengan merk sigma.
2. Karakterisasi profil protein dilakukan dengan menggunakan dan SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul protein dan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui kadar protein.
3. Pada analisis SDS-PAGE, protein gelatin diperoleh dari presipitasi protein menggunakan pelarut organik berupa aseton dan etanol dengan variasi konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 %.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan metode analisis protein gelatin menggunakan spektrofotometer

UV-Vis dan elektroforesis SDS-PAGE dengan perlakuan pemurnian sederhana (presipitasi pelarut organik) bagi mahasiswa peneliti dan kalangan akademis. Di samping itu, hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang nilai gizi protein gelatin komersial bagi masyarakat umum.

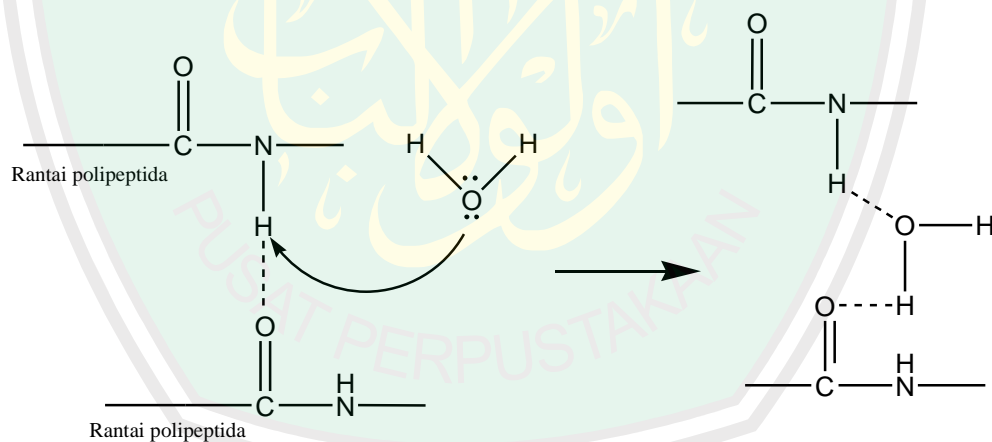


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gelatin

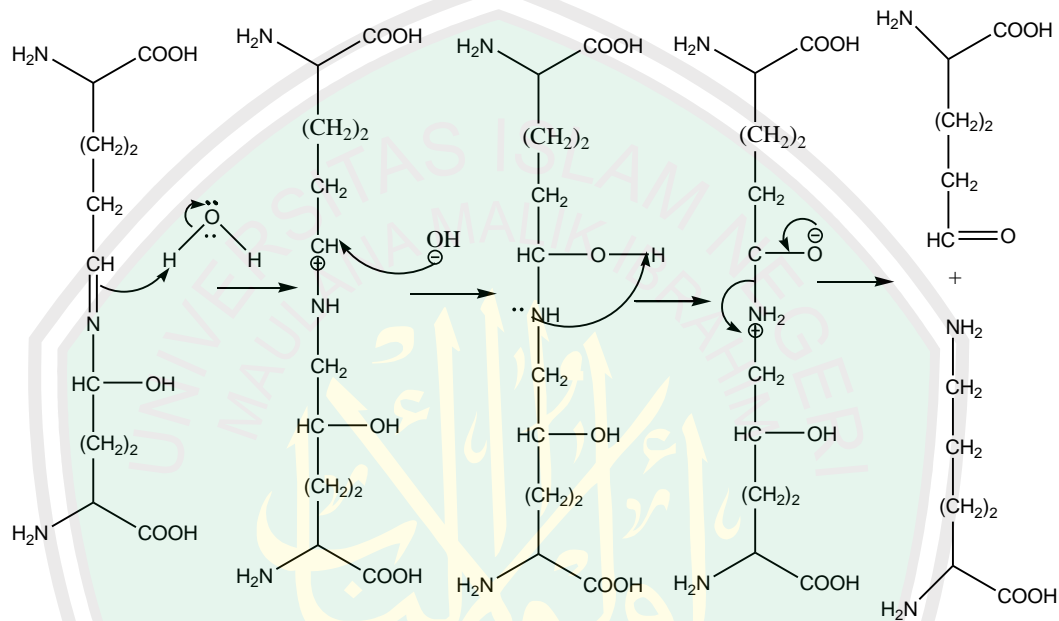
Gelatin merupakan salah satu produk turunan protein yang diperoleh dari hasil hidrolisis kolagen hewan yang terkandung dalam tulang dan kulit. Konversi kolagen menjadi gelatin merupakan perubahan struktur *triple-helix* menjadi *alpha-helix*. Menurut Martianingsih dan Atmaja (2010), reaksi hidrolisis tersebut terjadi melalui pemutusan ikatan hidrogen dan ikatan silang kovalen rantai-rantai tropokolagen sehingga menghasilkan tropokolagen *triple-helix* yang berubah menjadi rantai-rantai α (*alpha-helix*) yang dapat larut dalam air atau disebut gelatin.



Gambar 2.1 Reaksi pemutusan ikatan hidrogen tropokolagen pada hidrolisis kolagen menjadi gelatin (Martianingsih dan Atmaja, 2010)

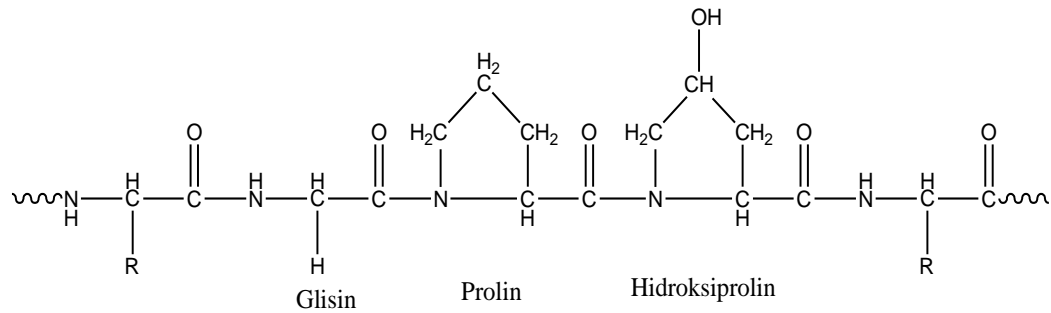
Secara fisik dan kimia, gelatin berwarna kuning cerah atau transparan, berbentuk serpihan atau tepung, berbau dan berasa, larut dalam air panas. Gelatin dapat menyerap air 5 – 10 kali bobot asalnya dan juga mampu mengembang (Raharja, 2004). Menurut Ward dan Courts (1977) dalam Praira (2008) gelatin

larut dalam air minimal pada suhu 49 °C, cenderung membentuk gel pada suhu sekitar 48 °C dan larut baik pada suhu 60 °C sampai 70 °C. Gelatin juga mudah larut dalam gliserol, manitol, sorbitol, dan propilen. Jannah (2008) menambahkan bahwa kelarutan gelatin akan berkurang dalam alkohol, aseton, dan pelarut nonpolar, seperti karbon tetraklorida (CCl₄), petroleum eter, dan karbon disulfida.



Gambar 2.2 Reaksi hidrolisis ikatan silang kovalen tropokolagen pada hidrolisis kolagen menjadi gelatin (Martianingsih dan Atmaja, 2010)

Gelatin merupakan suatu polimer linier asam-asam amino. Pada umumnya rantai polimer tersebut merupakan perulangan dari asam amino glisin-prolin-prolin atau glisin-prolin-hidroksiprolin. Dalam gelatin tidak terdapat asam amino triptofan, sehingga gelatin tidak dapat digolongkan sebagai protein yang lengkap. Asam-asam amino saling terikat melalui ikatan peptida membentuk gelatin. Susunan asam amino berupa *Gly-X-Y* dimana X umumnya asam amino prolin dan Y umumnya asam amino hidroksiprolin (Poppe, 1999 dalam Wiratmaja, 2006). Struktur kimia gelatin dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Struktur Kimia Gelatin (Poppe, 1999 dalam Wiratmaja, 2006)

Schrieber dan Gareis (2007) menyebutkan beberapa kandungan asam amino dalam gelatin, yaitu 9,1 % hidroksiprolin, 2,9 % asam aspartat, 1,8 % treonin, 3,5 % serin, 4,8 % asam glutamat, 13,2 % prolin, 33 % glisin, 11,2 % alanin, 2,6 % valin, 0,36 % metionin, 1 % isoleusin, 2,7 % leusin, 0,26 % tirosin, 1,4 % penilalanin, 0,51 % hidrosilisin, 3 % lisin, 0,4 % histidin, dan 4,9 % arginin. Asam amino yang paling banyak dikandung gelatin adalah glisin, sementara asam amino yang paling sedikit adalah tirosin. Gelatin sama sekali tidak mengandung triptofan. Gelatin dapat diolah lebih lanjut untuk menjadi sumber nutrisi asam amino dimana penyusun utama gelatin komersial adalah protein dengan kandungan protein berkisar antara 85 sampai 92 %. Menurut Hastuti, *et. al*, (2007), gelatin kering dengan kadar air 8 – 12 % mengandung protein sekitar 84 – 86 % protein, lemak hampir tidak ada, dan 2 – 4 % mineral.

Gelatin mempunyai banyak fungsi dan sangat aplikatif di berbagai industri. Penggunaan gelatin bukan hanya pada produk pangan, tetapi juga pada produk farmasi dan kosmetika. Hal ini karena sifatnya yang serba bisa, yaitu bisa berfungsi sebagai bahan pengisi, pengemulsi, pengikat, pengendap, pemer kaya gizi, sifatnya juga luwes dapat membentuk lapisan tipis yang elastis, membentuk film yang transparan dan kuat, kemudian sifat penting lainnya, yaitu daya cernanya yang tinggi. Penggunaan gelatin pada produk pangan, antara lain:

penjernih minuman (sari buah, bir, dan *wine*), pelapis buah-buahan untuk menjaga kesegaran dan keawetan buah, memperbaiki tekstur, konsistensi, stabilitas produk dan menghindari sineresis pada yoghurt, es krim, susu asam, dan keju. Industri farmasi memanfaatkan gelatin sebagai pembungkus kapsul atau tablet obat, sebagai mikroenkapsulasi vitamin dan mineral serta *premix* agar awet (Hastuti, *et al.*, 2007).

2.2 Protein

Kata protein berasal dari bahasa Yunani “protos atau proteos” yang berarti pertama atau utama. Protein merupakan komponen penting atau komponen utama sel hewan atau manusia (Poedjiadi, 2006). Protein digolongkan sebagai makromolekul yang menyusun lebih dari separuh bagian dari sel. Protein menentukan ukuran dan struktur sel, komponen utama dari sistem komunikasi antar sel serta sebagai katalis berbagai reaksi biokimia di dalam sel (Fatchiyah, *et al.*, 2011).

Protein dapat diartikan sebagai suatu polipeptida yang mempunyai bobot molekul yang sangat bervariasi, dari 5000 hingga lebih dari satu juta. Di samping berat molekul yang berbeda-beda, protein mempunyai sifat yang berbeda pula (Poedjiadi, 2006). Polipeptida ini mengandung unsur-unsur C, H, O, dan N yang tidak dimiliki oleh lemak atau karbohidrat. Molekul protein mengandung pula P, S, dan ada jenis protein yang mengandung unsur logam seperti besi dan tembaga (Winarno, 2004). Ciri-ciri utama molekul protein, yaitu berat molekulnya besar, umumnya terdiri atas 20 macam asam amino, terdapatnya ikatan kimia lain, reaktif dan spesifik (Wirahadikusumah, 2001).

Dalam setiap sel yang hidup, protein merupakan bagian yang sangat penting. Pada sebagian besar jaringan tubuh, protein merupakan komponen terbesar setelah air. Diperkirakan separuh atau 50 % dari berat kering sel dalam jaringan seperti, hati dan daging terdiri dari protein, dan dalam keadaan segar sekitar 20 % (Winarno, 2004).

Protein dapat dikelompokkan menjadi empat tingkat struktur dasar, yaitu:

1. Struktur primer

Struktur primer protein menunjukkan jenis, jumlah, dan urutan asam amino dalam molekul protein (Poedjiadi, 2006). Struktur ini juga menunjukkan sekuens linier residu asam amino dalam suatu protein. Sekuens asam amino selalu dituliskan dari gugus terminal amino ke gugus terminal karboksil (Fatchiyah, *et al.* 2011).

2. Struktur sekunder

Struktur sekunder terdiri dari satu rantai polipeptida yang dibentuk karena adanya ikatan hidrogen amida dan oksigen karbonil dari rangka peptida. Struktur sekunder utama meliputi α -heliks dan β -strands (termasuk β -sheet) (Fatchiyah, *et al.* 2011). Bahan yang memiliki struktur ini ialah bentuk α -heliks pada wol, bentuk lipatan-lipatan (wiru) pada molekul-molekul sutera serta bentuk heliks pada kolagen (Winarno, 2004).

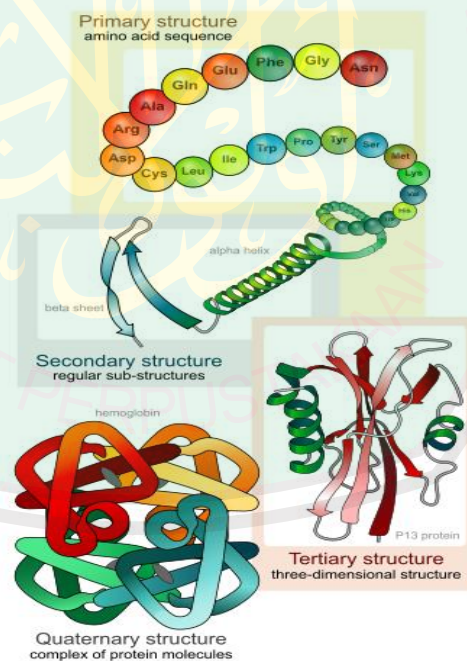
3. Struktur tersier

Struktur tersier menunjukkan kecenderungan polipeptida membentuk gulungan atau lipatan sehingga membentuk struktur yang lebih kompleks. Struktur ini dimantapkan oleh adanya beberapa ikatan antara gugus R pada molekul asam amino yang membentuk protein (Poedjiadi, 2006). Menurut

Fatchiyah, et al., (2011) struktur tersier menggambarkan rantai polipeptida yang mengalami *folded* sempurna dan kompak. Beberapa polipeptida *folded* tersusun atas beberapa protein globular yang berbeda yang dihubungkan oleh residu asam amino.

4. Struktur kuartener

Struktur kuartener melibatkan asosiasi dua atau lebih rantai polipeptida yang membentuk multisubunit atau protein oligomerik. Rantai polipeptida penyusun protein oligomerik dapat sama atau berbeda (Fatchiyah, et al. 2011). Contoh dari protein oligometrik ini adalah hemoglobin, α -amilase, laktat dehidrogenase, katalase, dan virus mosaik tembakau (nukleoprotein) (Page, 1997).



Gambar 2.4 Struktur protein primer, sekunder, tersier, dan kuartener
Sumber: Rustam (2010).

Protein merupakan molekul yang sangat besar, sehingga mudah sekali mengalami perubahan bentuk fisik maupun aktivitas biologis. Sifat fisikokimia

setiap protein tidak sama, tergantung pada jumlah jenis asam aminonya. Banyak faktor yang menyebabkan perubahan sifat alamiah protein, seperti panas, asam, basa, pelarut organik, pH, garam, logam berat, maupun sinar radiasi radioaktif (Sudarmadji, 1989 dan Winarno, 2004).

Beberapa jenis protein sangat peka terhadap perubahan lingkungannya. Suatu protein di dalam tubuh dapat melakukan aktivitas biokimiawi yang menunjang kebutuhan tubuh. Aktivitas ini banyak tergantung pada struktur dan konformasi molekul protein yang tepat. Apabila Konformasi molekul protein berubah, misalnya oleh perubahan suhu, pH, atau karena terjadinya reaksi dengan senyawa lain, maka aktivitas biokimiawinya akan berkurang dan mengalami perubahan. Perubahan konformasi alamiah menjadi suatu konformasi yang tidak menentu merupakan suatu proses yang disebut denaturasi. Proses denaturasi ini kadang-kadang dapat berlangsung secara reversibel, kadang-kadang tidak. Protein akan mengalami koagulasi atau penggumpalan apabila dipanaskan pada suhu 50 °C atau lebih. Denaturasi protein dapat pula terjadi oleh adanya gerakan mekanik, alkohol, aseton, eter dan detergen (Poedjiadi, 2006).

Berdasarkan kelarutannya, ada protein yang larut dalam air dan ada pula yang tidak larut dalam air. Tetapi, semua protein tidak larut dalam pelarut lemak seperti dietil eter. Daya larut protein dalam air akan berkurang jika ditambahkan garam, akibatnya protein akan terpisah sebagai endapan. Apabila protein dipanaskan atau ditambahkan alkohol, maka protein akan menggumpal. Hal ini disebabkan alkohol menarik mantel air yang melingkupi molekul-molekul protein (Winarno, 2004).

Sifat lainnya adalah protein mempunyai banyak muatan dan bersifat amfoter (dapat bereaksi dengan asam maupun basa). Hal ini disebabkan adanya gugus amino dan karboksil bebas pada ujung-ujung rantai molekul protein. Dalam larutan asam (pH rendah), gugus amino bereaksi dengan H^+ sehingga protein bermuatan positif. Bila pada kondisi ini dilakukan elektrolisis, molekul protein akan bergerak ke arah katoda. Sebaliknya, dalam larutan basa (pH tinggi) molekul protein akan bereaksi sebagai asam atau bermuatan negatif, sehingga molekul protein akan bergerak menuju anoda (Winarno, 2004).

Pada pH tertentu yang disebut titik isoelektrik (pI), muatan gugus amino dan karboksil bebas akan saling menetralkan sehingga molekul bermuatan nol. Tiap jenis protein mempunyai titik isoelektrik yang berlainan. Pengendapan paling cepat terjadi pada titik isoelektrik ini, dan prinsip ini digunakan dalam proses-proses pemisahan serta pemurnian protein (Winarno, 2004).

2.3 Presipitasi Protein

Beberapa teknik analisis protein membutuhkan prosedur isolasi, yaitu memisahkan protein dari makromolekul lain yang tidak diinginkan dalam analisis. Tahap awal isolasi dapat dilakukan dengan metode pengendapan (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Teknik pengendapan/presipitasi yang ditujukan untuk proses pemisahan protein dapat dilakukan dengan penambahan garam, pelarut organik, polimer organik, atau variasi suhu atau pH pada larutan (Muchtadi (1993) dalam Yatno, 2009; Dynnar, 2011).

Penggunaan pelarut organik untuk mengendapkan protein juga dapat dilakukan, namun untuk menghindari terjadinya denaturasi proses pengendapan dengan cara ini harus dilakukan pada suhu yang rendah (Poedjiadi, 2006). Pelarut

organik yang banyak digunakan ialah aseton dan etanol (Suhartono, *et al.*, 1992 dalam Lawati, 2013). Pelarut organik menyebabkan pengendapan protein dengan cara menurunkan solubilitas/kelarutan protein sehingga protein akan mengendap (Evans, 2004). Penambahan pelarut organik, seperti etanol dan aseton ke dalam larutan protein dalam air bekerja dengan cara menurunkan konstanta dielektrik (Wirahadikusumah, 2001). Pada umumnya, senyawa ion lebih larut dalam pelarut dengan konstanta dielektrik tinggi. Oleh karena itu, interaksi antar molekul protein lebih disukai dibandingkan antara molekul protein dengan air sehingga protein diendapkan karena desakan pelarut organik terhadap air yang berinteraksi dengan protein (Van Oss, 1989 dalam Zeliner, *et al.*, 2005).

Menurut Van Oss, 1989 dalam Zeliner, *et al.* (2005), penurunan konstanta dielektrik ini akan menyebabkan turunnya kelarutan protein dalam air sehingga terjadi pengendapan. Hal ini menunjukkan bahwa kelarutan protein pada pH dan kekuatan ionik tetap merupakan fungsi dari konstanta dielektrik medium. Karena konstanta dielektrik pelarut organik lebih rendah dari konstanta dielektrik air, maka penambahan pelarut organik ke dalam larutan protein menaikkan gaya tarik-menarik antara muatan berlawanan dan menurunkan derajat ionisasi gugus R protein. Akibatnya, molekul protein cenderung beragregasi dan mengendap.

Protein akan mengendap pada konsentrasi pelarut organik tertentu sehingga penentuan jenis dan konsentrasi pelarut organik merupakan hal penting dalam presipitasi. Pemilihan jenis dan jumlah pelarut organik yang tepat memiliki tujuan agar dapat diperoleh kondisi pengendapan protein yang maksimal tanpa mengendapkan senyawa lain yang tidak diinginkan (Raharjo, *et al.*, 2007). Beberapa penelitian menggunakan prinsip ini dengan konsentrasi pelarut organik

yang berbeda-beda mulai dari *range* 20 – 40 % dan 60 – 80 % etanol (Cahyanto, *et al.*, 2008; Gemili, *et al.*, 2007) sedangkan untuk aseton berkisar pada konsentrasi 20 – 80 % dan 40 – 100 % (Sharma, *et al.*, 2014; Melas, *et al.*, 1994).

Penelitian yang telah disebutkan di atas menggunakan konsentrasi pelarut organik yang berbeda dengan perolehan total protein tertinggi yang berbeda pula. Hal ini dipengaruhi oleh jenis dan karakteristik setiap protein yang cenderung tidak sama. Sebagaimana penjelasan sebelumnya bahwa sifat fisikokimia setiap protein tidak sama, tergantung pada jumlah jenis asam aminonya (Winarno, 2004). Pada penelitian Cahyanto, *et al.* (2008) konsentrasi etanol yang menghasilkan larutan enzim selulase dengan kadarprotein terlarut paling tinggi sebesar 15, 20 µg/mL adalah 80 % (v/v). Gemili, *et al.* (2007) memperoleh konsentrasi etanol 20 % dalam proses pemurnian parsial lisozim putih telur ayam dengan total protein tertinggi sebesar 98 %. Penelitian berikutnya oleh Sharma, *et al.* (2014) menggunakan pelarut organik berupa aseton terhadap protease yang diisolasi dari nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi protein maksimum pada 80 % aseton. Melas, *et al.* (1994) melaporkan bahwa konsentrasi aseton 40 % dapat memisahkan protein *Low Molecular Weight Subunit of Glutenin* (LMWSG) dari gandum dengan baik. Berdasarkan penelitian di atas, variasi konsentrasi 20 % – 80 % dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh pelarut organik dalam penentuan karakteristik protein gelatin.

2.4 Karakterisasi Protein

Karakterisasi protein merupakan salah satu cara yang dilakukan untuk mengetahui profil protein suatu sampel, dalam hal ini adalah gelatin komersial.

Metode karakterisasi yang digunakan penelitian ini adalah SDS-PAGE dan spektrofotometer UV-Vis.

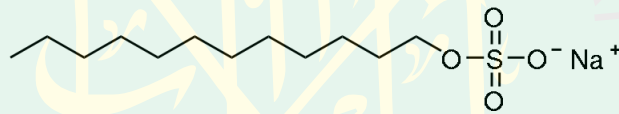
2.4.1 Karakterisasi Protein Menggunakan SDS-PAGE

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan yang memisahkan analit berdasarkan kemampuannya bergerak dalam medium konduksi yang biasanya berupa larutan buffer dan akan memberikan respons setelah ditambahkan medan listrik (Harvey, 2000). Prinsip metode elektroforesis dalam memisahkan molekul-molekul adalah molekul-molekul biologis yang bermuatan listrik, yang besarnya tergantung pada jenis molekul, pH, dan komponen medium pelarutnya dalam larutan akan bergerak ke arah elektroda yang polaritasnya berlawanan dengan muatan molekul (Nur dan Adijuwana, 1987 dalam Riyanto, 2006).

Bintang (2010) menyatakan bahwa SDS-PAGE termasuk salah satu jenis elektroforesis yang digunakan secara luas pada saat ini. SDS-PAGE dinilai lebih menguntungkan dibandingkan dengan elektroforesis kertas dan elektroforesis pati. Kelebihannya, gel poliakrilamida dapat digunakan tidak hanya untuk pemisahan berbagai protein, tetapi juga untuk membandingkan berat molekulnya. Teknik ini diketahui lebih menguntungkan daripada elektroforesis kertas dan gel pati, karena media penyangga yang digunakan dalam SDS-PAGE, yaitu gel poliakrilamid yang bersifat transparan dan dapat dipindai pada daerah sinar tampak maupun UV, serta dapat diperoleh resolusi yang lebih baik dan ukuran pori medium dapat diatur berdasarkan perbandingan konsentrasi akrilamid yang digunakan. Pada medium poliakrilamid pengaruh arus konveksi dapat dikurangi sehingga pemisahan komponen menjadi sempurna dan pita-pita yang terbentuk menjadi lebih jelas. Poliakrilamid merupakan medium yang bersifat inert sehingga tidak

bereaksi dengan sampel dan tidak terjadi ikatan antara sampel dan matrik (Andrews, 1986 dalam Kristina, *et al.*, 2009).

Elektroforesis gel poliakrilamida dikombinasikan dengan suatu detergen *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) biasanya digunakan dalam pemisahan makromolekul dengan cara kualitatif dan kuantitatif. Kegunaan elektroforesis antara lain: 1) menentukan berat molekul (estimasi); 2) mendeteksi terjadinya pemalsuan bahan; 3) mendeteksi terjadinya kerusakan bahan seperti protein dalam pengolahan dan penyimpanan; 4) untuk memisahkan spesies-spesies yang berbeda secara kualitatif, yang selanjutnya masing-masing spesies dapat dianalisis; dan 5) menetapkan titik isoelektrik protein (Nur dan Adijuwana, 1987 dalam Riyanto, 2006).



Gambar 2.5 Struktur *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS)

Dalam metode ini muatan listrik protein akan dirubah menjadi muatan negatif dengan bantuan SDS yang mengandung deterjen anionik. Pengikatan protein dengan SDS akan menyebabkan terputusnya ikatan disulfida atau rusaknya struktur sekunder protein yang terjadi dengan bantuan pemanasan dan penambahan *disulfide reducing agent*, seperti 2-merkaptotanol atau 1,4-dithiothreitol (Fatchiyah, *et al.*, 2011 dan Kumar, 2007).

Elektroforesis SDS-PAGE membutuhkan SDS dan gel buatan sebagai medium penyangga. Gel yang digunakan terbentuk dari polimerisasi akrilamida dengan *N, N'*-metilena bis akrilamida sehingga terbentuk ikatan silang karena polimerisasi akrilamida sendiri hanya menghasilkan ikatan linear yang tidak

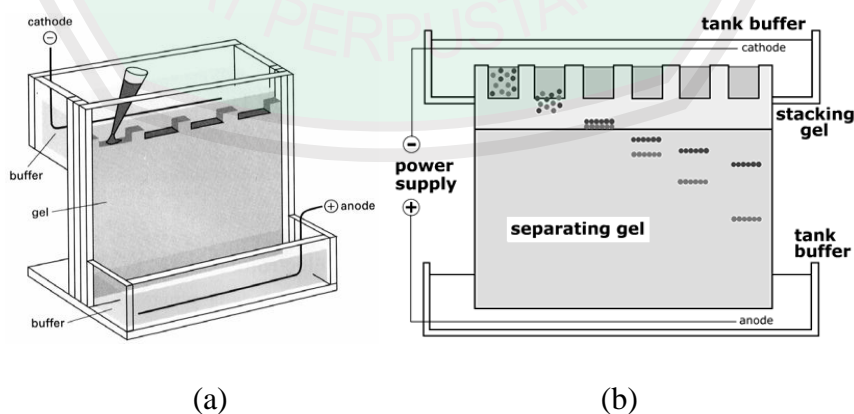
membentuk gel kaku (Girindra, 1993 dalam Anggraeni, 2007). Proses pembentukan polimer ini diawali oleh suatu sistem yang menghasilkan radikal bebas yang dikatalis oleh amonium persulfat (APS) atau riboflavin. Pembentukan radikal bebas dengan penambahan APS sebagai inisiator, dan N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) sebagai akselerator. Pada proses ini TEMED mempercepat pemecahan molekul APS menjadi sulfat radikal bebas. Ukuran pori gel poliakrilamid dipengaruhi oleh konsentrasi total akrilamid (Fatchiyah, dkk., 2011). Pemisahan berdasarkan berat molekul dengan berbagai konsentrasi total akrilamid dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Konsentrasi Total Akrilamid dan Berat Molekul Protein

Total Akrilamid (T %)	Berat Molekul (Dalton)
2,5	$10^5 - 10^6$
7	$10^4 - 10^5$
30	$2 \times 10^2 - 2 \times 10^3$

Sumber: Fatchiyah, *et al.*, 2011

Gel poliakrilamida dibuat menggunakan cetakan gel membentuk lembaran segiempat dengan ketebalan tertentu. Sampel dimasukkan ke dalam sumur gel kemudian gel dialiri arus listrik, seperti Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Proses elektroforesis: memasukkan sampel ke dalam sumuran (a), Perpindahan protein bermuatan pada sistem gel diskontinu (b).

Kecepatan migrasi dari molekul protein dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain (Soedarmadji, 1996):

- a) Ukuran molekul protein. Migrasi molekul protein berukuran besar lebih lambat daripada migrasi molekul berukuran kecil
- b) Konsentrasi gel. Migrasi molekul protein pada gel berkonsentrasi rendah lebih cepat daripada migrasi molekul protein yang sama pada gel berkonsentrasi tinggi.
- c) Bufer (penyangga) dapat berperan sebagai penstabil medium pendukung dan dapat mempengaruhi kecepatan gerak senyawa karena ion sebagai pembawa protein yang bermuatan. Kekuatan ion yang tinggi dalam bufer akan meningkatkan panas sehingga aliran listrik menjadi maksimal. Hal ini dapat mempercepat gerakan molekul protein. Kekuatan ion rendah dalam bufer akan menurunkan panas sehingga aliran listrik akan sangat minimal dan migrasi molekul protein sangat lambat
- d) Medium penyangga. Medium pendukung ideal untuk elektroforesis adalah bahan kimia inert yang bersifat relatif stabil, mudah ditangani dan mempunyai daya serap yang baik, sebagai migrasi elektron atau penyaringan berdasarkan ukuran molekul seperti gel poliakrilamid.

Pada jalur pergerakan protein akan didapatkan jajaran protein yang disebut pita protein. Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan

terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Fatchiyah, *et al.*, 2011 dan Soedarmadji, 1996).

Dalam satu sampel protein bisa lebih dari satu bahkan puluhan pita dalam gel poliakrilamida. Pada kondisi tidak diwarnai, protein tersebut tidak terlihat karena memang protein dalam sampel tidak berwarna. Setelah diwarnai dengan larutan pewarna yang mengandung *Coomassie Brilliant Blue R-250*, protein yang tidak berwarna tersebut menjadi berwarna biru karena mengikat *Coomassie Blue*. Pada kondisi ini, kita bisa mengetahui keberadaan dan mengukur mobilitas protein untuk kemudian menentukan berat molekulnya (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Penentuan berat molekul ini dilakukan dengan pengamatan untuk membandingkan dengan protein standar.

2.4.2 Karakterisasi Protein Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Metode spektrofotometri merupakan salah satu metode yang banyak dipakai untuk menganalisa karakteristik suatu materi dengan cara menganalisa spektrum yang dihasilkan oleh materi tersebut. Gambaran spektra dari materi, yang merupakan hasil interaksi antara energi radiasi dengan atom-atom atau molekul-molekul penyusun materi, dinyatakan sebagai variasi intensitas radiasi atau absorbansi sebagai fungsi panjang gelombang (Irianti, 2010).

Spektrofotometer merupakan alat untuk mempelajari interaksi sinar elektromagnetik dengan materi. Spektrum elektromagnetik meliputi panjang gelombang atau energi yang sangat besar. Untuk keperluan analisis spektrofotometri, cahaya yang digunakan berada pada daerah ultraviolet dan sinar tampak (*visible*). Spektrum sinar tampak mempunyai panjang gelombang berkisar

380 – 780 nm sedangkan spektrum ultraviolet berada pada 180 – 380 nm (Bintang, 2010).

Spektrofotometer selain merupakan alat pengukuran kualitatif juga merupakan alat pengukuran kuantitatif, karena jumlah sinar yang diserap oleh partikel di dalam larutan juga tergantung pada jenis dan jumlah partikel (Bintang, 2010). Prinsip dasar metode spektrofotometri adalah pelewatan cahaya yang memiliki panjang gelombang tertentu melalui sampel. Cahaya tersebut kemudian diserap oleh sampel berwarna dan sebagian lagi diteruskan lalu ditangkap oleh alat pendeteksi/pengukur cahaya yang disebut fotometer. Intensitas cahaya yang diukur oleh fotometer dikonversi menjadi satuan serapan (absorbansi) dan kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel dengan persamaan Lambert-Beer (Praira, 2008).

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon C l \quad (2.1)$$

$$T = \frac{I_0}{I} \quad (2.2)$$

$$A = -\log T \quad (2.3)$$

Keterangan:

A = Serapan cahaya (absorbansi)

I_0 = Intensitas cahaya tanpa absorbansi

I = Intensitas cahaya yang diteruskan oleh sampel

ϵ = Koefisien absorpsi molekul

l = Ketebalan lapisan larutan sampel

C = Konsentrasi

T = Transmitan

Banyak senyawa mempunyai spektra absorpsi yang spesifik pada daerah UV-Vis, sehingga identifikasi materi tersebut dalam suatu campuran dapat dilakukan (Bintang, 2010). Salah satu materi yang dapat diidentifikasi adalah protein. Beberapa metode telah ditemukan untuk pengukuran kadar protein berdasarkan spektroskopi UV-Vis melalui kemampuan protein menyerap (atau memancarkan) cahaya di daerah UV-Vis. Menurut Praira (2008) kadar protein dapat diketahui dengan metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan suatu pereaksi atau reagen berwarna dengan intensitas warna yang dibentuknya sebanding dengan konsentrasi protein sampel. Metode analisis kadar protein dengan teknik spektrofotometri yang umum digunakan adalah metode Biuret, Lowry, dan Bradford. Metode biuret merupakan metode yang cukup efisien, murah, dan lebih sederhana dibandingkan metode Lowry dan Bradford.

Analisis Biuret didasarkan pada reaksi antara ion Cu^{2+} dan ikatan peptida dalam suasana basa. Warna kompleks ungu menunjukkan adanya protein. Intensitas warna yang dihasilkan merupakan ukuran jumlah ikatan peptida yang ada dalam protein. Ion Cu^{2+} dari pereaksi biuret dalam suasana basa akan bereaksi dengan gugus N pada ikatan peptida yang menyusun protein, dan membentuk senyawa kompleks berwarna ungu atau violet. Reaksi ini positif terhadap dua buah ikatan peptida atau lebih, tetapi negatif untuk asam amino bebas atau satu ikatan peptida (Bintang, 2010). Reaksi reagen biuret dengan protein ini menghasilkan dua spektrum cahaya maksimum, yaitu pada panjang gelombang 540 nm lebih disarankan walaupun hasil pada panjang gelombang 270 nm memiliki sensitivitas 6 kali lebih besar. Hal ini disebabkan banyaknya senyawa

pengganggu yang juga menyerap cahaya pada panjang gelombang 270 nm ini (Zaia, *et. al.*, 1998 dalam Praira, 2008).

Gelatin yang termasuk dalam protein juga dapat ditentukan konsentrasi proteinnya menggunakan metode ini. Findianti (2013) dan Mufidah (2013) telah menentukan kadar protein gelatin ayam menggunakan metode biuret dengan spektrofotometer UV-Vis. Kadar protein gelatin ayam ini berturut-turut adalah 39,48 % dan 68,33 %. Praira (2008) juga menggunakan metode biuret untuk menentukan kadar protein gelatin dalam tablet obat. Beberapa sampel obat memiliki kadar protein antara 1 – 5 %.

2.5 Gelatin dalam Perspektif Hukum Islam

Allah SWT berfirman dalam QS. Al-Mu'min ayat 79:

اللَّهُ الَّذِي جَعَلَ لَكُمْ الْأَنْعَامَ لِتَرْكَبُوا مِنْهَا وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ ﴿٧٩﴾

“Allahlah yang menjadikan binatang ternak untuk kamu, sebagiannya untuk kamu kendarai dan sebagiannya untuk kamu makan.”

Firman Allah SWT dalam surat Al-Mu'min ayat 79 di atas merupakan tanda-tanda kebesaran dan kekuasaan Allah yang menjadikan binatang ternak dengan banyak manfaat. Kebanyakan ahli tafsir berpendapat bahwa yang dimaksud dengan binatang ternak dalam ayat ini ialah unta. Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menjadikan binatang ternak bermanfaat bagi manusia, yaitu untuk dikendarai, dimakan/dikonsumsi, dan untuk manfaat-manfaat lain seperti kulitnya dapat dibuat tas, sepatu, dan sebagainya (DEPAG RI, 1990).

Seringkali daging adalah bagian binatang ternak yang banyak dimanfaatkan oleh manusia dengan cara diolah menjadi berbagai macam makanan. Sedangkan bagian tulang dan kulitnya jarang sekali difungsikan padahal

bagian-bagian ini dapat dipotensikan sebagai bahan baku pembuatan gelatin. Gelatin merupakan salah satu produk derivat protein yang diperoleh dari hasil hidrolisis kolagen hewan dimana kolagen yang berfungsi sebagai komponen utama penyusun jaringan hewan ini banyak terdapat dalam tulang dan kulit.

Gelatin merupakan salah satu produk alami yang mempunyai sifat yang aplikatif karena penggunaannya yang sangat luas, yaitu sebagai bahan baku ataupun bahan tambahan pangan dan digunakan di berbagai keperluan industri, baik industri pangan maupun non-pangan. Misalnya, pengemulsi, pengental, pembentuk gel, pembentuk busa, *edible film*, cangkang kapsul keras dan kapsul lunak, dan masih banyak lagi (Hastuti, *et al.*, 2007).

Gelatin tergolong suatu bahan yang kaya akan protein. Menurut Wulandari (2006) dalam Sompie (2012), Gelatin penting untuk diversifikasi menjadi bahan makanan karena tingginya kadar protein khususnya asam amino dan rendahnya kadar lemak sehingga memiliki nilai gizi tinggi yang sangat dibutuhkan tubuh. Oleh karena itu, penulis ingin mengetahui karakteristik protein dari gelatin melalui penelitian ini.

Di samping itu, makanan bergizi tinggi merupakan salah satu makanan yang dianjurkan dalam agama Islam karena makanan ini baik untuk kesehatan terutama kesehatan jasmani. Makanan bergizi ini disebut sebagai makanan yang *thayyib* (baik-baik) dalam syari'at Islam. Allah SWT berfirman dalam QS. Al-Baqarah [2] ayat 168:

يَأْتِيهَا النَّاسُ كُلُّوْا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلٰلًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوْا خُطُوٰتِ الشَّيْطٰنِ اِنَّهٗ

لَكُمْ عَدُوٌّ مُّبِيْنٌ ﴿١٦٨﴾

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

Ayat di atas menjelaskan tentang perintah yang diperutukkan bagi manusia terutama umat Islam untuk mengkonsumsi makanan yang halal dan baik untuk kekuatan jasmani dan rohani. Dalam ayat tersebut juga dijelaskan bahwa Allah SWT melarang kita mengkonsumsi makanan yang sebaliknya, yaitu makanan haram. Karena jika demikian, berarti sama dengan mengikuti langkah-langkah syaitan yang menjadi musuh nyata manusia (Shihab, 2002).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Negeri Islam Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Mei – November 2014.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi neraca analitik, mikropipet dan tip, termometer, seperangkat alat gelas, gelas arloji, *hot plate*, penangas air, tabung reaksi dan rak, lemari pendingin, pengaduk, sentrifus, *shaker*, inkubator, *eppendorf*, seperangkat alat SDS-PAGE, spektrofotometer UV-Vis, kuvet, vorteks, dan lemari asam.

Bahan utama yang digunakan adalah gelatin komersial yang diperoleh dari beberapa toko kue di daerah Kota Malang. Bahan kimia yang digunakan untuk presipitasi adalah aseton, etanol, akuabides, buffer fosfat 0,1 M pH 7,5. Bahan yang digunakan untuk spektrofotometri UV-Vis adalah larutan Bovin Serum Albumin (BSA), dan reagen biuret (CuSO_4 , K.Na.tartat dan NaOH). Bahan-bahan untuk analisis SDS-PAGE adalah *sodium dodesil sulfat* (SDS) 10% (b/v), akrilamid, N,N'-bis-akrilamid (30 %), amonium persulfat 10% (b/v), tetrametil-etilendiamin (TEMED), buffer elektroforesis SDS-PAGE pH 8,3, tris-HCl, gliserol, 0,1% *Bromphenol blue*, *2-mercaptoethanol*, *standar marker protein*

broad molecular weight, larutan *staining* (*coomassie brilliant blue R-250*, metanol 40% (v/v), asam asetat glasial dan akuades) dan larutan *destaining* (metanol 40% (v/v), asam asetat glasial 10%(v/v) dan akuades).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel yang digunakan adalah gelatin komersial. Kadar protein ekstrak kasar gelatin komersial dianalisis dengan metode biuret menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan diisolasi melalui metode presipitasi protein menggunakan pelarut organik, berupa aseton dan etanol dengan variasi konsentrasi yang berbeda (20, 40, 60, dan 80 %).

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari dua faktor, yaitu jenis dan konsentrasi pelarut organik:

Variabel terikat : Jumlah protein yang mengendap

Variabel bebas : Jenis pelarut dan konsentrasi aseton dan etanol

1. Faktor pertama: Jenis pelarut (P)

P₁ = Pelarut etanol

P₂ = Pelarut aseton

2. Faktor kedua: Konsentrasi pelarut organik (T)

T₁ = Konsentrasi 20 %

T₂ = Konsentrasi 40 %

T₃ = Konsentrasi 60 %

T₄ = Konsentrasi 80 %

Tabel 3.1 Rancangan penelitian

P \ T	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
P ₁	P ₁ T ₁	P ₂ T ₁	P ₁ T ₃	P ₁ T ₄
P ₂	P ₂ T ₁	P ₂ T ₂	P ₂ T ₃	P ₂ T ₄

Keterangan:

P₁T₁ : Konsentrasi 20 % pada pelarut etanol

P₁T₂ :Konsentrasi 40 % pada pelarut etanol

P₁T₃ :Konsentrasi 60 % pada pelarut etanol

P₁T₄ :Konsentrasi 80 % pada pelarut etanol

P₂T₁ :Konsentrasi 20 % pada pelarut aseton

P₂T₂ :Konsentrasi 40 % pada pelarut aseton

P₂T₃ :Konsentrasi 60 % pada pelarut aseton

P₂T₄ :Konsentrasi 80 % pada pelarut aseton

Dari kombinasi tersebut, dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali sehingga terdapat 16 kombinasi perlakuan untuk masing-masing sampel gelatin.

Protein gelatin masing-masing sampel hasil presipitasi digunakan untuk tahap selanjutnya, yaitu karakterisasi berat molekul protein sampel menggunakan SDS-PAGE metode Laemli dan analisis kadar protein menggunakan spektrofotometer UV-Vis metode Biuret.

3.4 Tahapan Penelitian

1. Presipitasi protein gelatin dengan 4 variasi konsentrasi (20, 40, 60, dan 80 %).
 - a. Preparasi sampel
 - b. Presipitasi aseton

- c. Presipitasi etanol
2. Penentuan berat molekul menggunakan elektroforesis SDS-PAGE.
 - a. Pembuatan Gel SDS-PAGE
 - b. Preparasi dan *Running* Sampel
 - c. Pewarnaan dan Pencucian Gel
 - d. Analisis berat molekul
3. Penentuan kadar protein menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
 - a. Penentuan kadar protein gelatin tanpa perlakuan presipitasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
 - b. Penentuan kadar protein hasil presipitasi gelatin menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
4. Analisis data.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi sampel

Preparasi sampel dilakukan untuk mendapatkan larutan gelatin. Gelatin sebanyak 150 mg dilarutkan dalam 10 mL akuabides pada suhu 50 °C sampai larut sempurna. Larutan sampel kemudian divorteks pada suhu ruang (Aina, *et al.*, 2013).

3.5.2 Presipitasi Protein

3.5.2.1 Presipitasi aseton

Sebanyak 500 μ L sampel ditambahkan dengan 500 μ L aseton 20 % (-20 °C) kemudian dihomogenkan. Pengendapan dilakukan dengan membiarkan

campuran selama 16 jam (*overnight*) pada 4 °C. Setelah proses pengendapan campuran gelatin dengan aseton dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit (4 °C). Supernatan dibuang, sementara endapan protein dikeringanginkan selama 1 – 2 jam untuk menghilangkan aseton. Endapan kemudian disuspensikan dengan 200 µL buffer fosfat. Perlakuan di atas diulangi untuk konsentrasi aseton 40 %, 60 %, dan 80 % (Sharma, *et al.*, 2014).

3.5.2.2 Presipitasi etanol

Sebanyak 500 µL sampel ditambahkan dengan 500 µL etanol 20 % (-20 °C) kemudian dihomogenkan. Pengendapan dilakukan dengan membiarkan campuran selama 16 jam (*overnight*) pada 4 °C. Setelah proses pengendapan campuran gelatin dengan etanol dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit (4 °C). Supernatan dibuang, sementara endapan protein dikeringanginkan selama 1 – 2 jam untuk menghilangkan etanol. Endapan kemudian disuspensikan dengan 200 µL buffer fosfat. Perlakuan di atas diulangi untuk konsentrasi etanol 40 %, 60 %, dan 80 % (Sharma, *et al.*, 2014).

3.5.3 Penentuan Berat Molekul Protein Menggunakan SDS-PAGE

Analisis protein SDS-PAGE dilakukan dengan komposisi *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*: 12,5 % *separating gel* dan 3 % *stacking gel* metode Laemli.

3.5.3.1 Pembuatan Gel SDS-PAGE

Pembuatan gel SDS-PAGE diawali dengan pembuatan *separating gel* 12,5 %. Akuades sebanyak 1,8 mL ditambahkan dengan 1,3 mL *Lower gel Buffer* (LGB), akrilamid/bis-akrilamid (30 % b/v) 2 mL, 70 μ L SDS 10 %, 7 μ L APS (amonium persulfat) 10 %, dan 7 μ L TEMED. Campuran tersebut kemudian divorteks dan dicetak ke dalam cetakan gel hingga mencapai 2/3 bagian cetakan, kemudian 1/3 bagian diisi dengan akuades dan didiamkan sampai gel mengeras.

Gel yang kedua adalah 3 % *stacking gel* yang dibuat dengan mencampurkan 812 μ L akuades, akrilamid/bis-akrilamid (30 % b/v) 220 μ L, *Upper Gel Buffer* (UGB) sebanyak 314 μ L, 8,25 μ L APS 10 %, dan 5,5 μ L TEMED. Selanjutnya campuran tersebut divorteks, sementara itu akuades dalam 1/3 bagian cetakan dibuang, untuk kemudian diganti dengan campuran *stacking gel*. Sisir pencetak sumur disisipkan pada cetakan.

3.5.3.2 Preparasi dan *Running* Sampel

Running elektroforesis SDS-PAGE dilakukan dengan menambahkan 20 μ L sampel protein gelatin ke dalam 20 μ L buffer sampel dengan perbandingan 1:1 (v/v), lalu dipanaskan pada suhu 100 °C selama 3 menit untuk denaturasi protein. Sampel kemudian didinginkan pada suhu ruang dan dimasukkan ke dalam sumur gel dengan volume 10 μ L, sedangkan volume marker protein yang digunakan sebanyak 5 μ L. *Running* dilakukan pada tegangan 100 V dengan arus 30 mA selama \pm 85 menit dalam buffer elektroforesis.

3.5.3.3 Pewarnaan dan Pelunturan Gel

Proses pewarnaan gel diawali dengan merendam gel dalam larutan pewarna (*staining*). Pewarnaan dilakukan selama 25 – 30 menit sambil di-*shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Setelah proses pewarnaan, gel dicuci dengan aquades lalu direndam dalam larutan peluntur (*destaining*) selama semalam. Pelunturan warna (*destaining*) pada gel dilakukan secara berulang kali sampai diperoleh pita protein berwarna biru dengan latar gel bening.

3.5.3.4 Analisis Berat molekul Protein

Gel yang telah didestaining diambil dan dilakukan dokumentasi dengan *scanner*. Berat molekul dianalisis dengan membandingkan hasil pita protein dan standar protein marker.

3.5.4 Penentuan Kadar Protein Gelatin Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Gornall, *et al.*, 1948)

3.5.4.1 Pembuatan reagen biuret

Reagen biuret dibuat dengan mencampurkan larutan A dan larutan B. Larutan A terdiri dari CuSO_4 sebanyak 0,15 gram ditambahkan dengan K.Na.tartat 0,6 gram kemudian dilarutkan ke dalam 10 mL akuades. Larutan B terdiri dari sebanyak 3 gram NaOH dilarutkan ke dalam 30 mL akuades selanjutnya larutan A dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan dituangkan larutan B ke dalam larutan A dan ditera dengan akuades sampai tanda batas.

3.5.4.2 Penentuan panjang gelombang maksimum dan pembuatan kurva baku standart

Panjang gelombang maksimum dicari dengan mengukur salah satu campuran standar dan reagen biuret yang telah diinkubasi selama 30 menit pada panjang gelombang 450 – 650 nm, panjang gelombang yang memiliki absorbansi maksimum merupakan panjang gelombang maksimum.

Pembuatan kurva baku standart dilakukan dengan cara dipipet masing-masing larutan stok BSA 15 mg/mL sebanyak 0,05 mL, 0,125 mL, 0,25 mL, 0,75 mL, 1 mL, 1,25 mL, dan 1,5 mL dari untuk konsentrasi 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 1,25 mg/mL, dan 1,5 mg/mL larutan protein standar dan dimasukkan ke dalam tujuh tabung reaksi yang telah disiapkan. Kemudian ditambahkan dengan akuades sampai volume total masing-masing sebesar 3 mL lalu ditambahkan dengan reagen biuret sebanyak 4,5 mL pada masing-masing tabung reaksi dan divorteks sampai homogen. Selanjutnya didiamkan tabung reaksi pada suhu ruang selama 30 menit atau sampai warna larutan menjadi ungu sempurna. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum yang telah ditemukan sehingga diperoleh persamaan regresi linier, $y = ax + b$.

3.5.4.3 Penentuan kadar protein

Kadar protein gelatin tanpa perlakuan presipitasi dan hasil presipitasi ditentukan dengan metode yang sama. Masing-masing larutan gelatin dipipet sebanyak 0,5 mL dan diletakkan dalam tabung reaksi yang berbeda lalu ditambahkan dengan akuades sampai volume larutan sebanyak 3 mL.

Ditambahkan dengan reagen biuret sebanyak 4,5 mL ke dalam campuran larutan dan divorteks sampai homogen kemudian didiamkan selama 30 menit atau sampai larutan berwarna ungu sempurna. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang yang telah ditemukan. Hasil absorbansi larutan gelatin diinterpolasikan pada persamaan $y = ax + b$ sehingga diperoleh konsentrasi protein dari larutan gelatin. Maka kadar protein (%) dapat ditentukan berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Kadar protein} = \frac{\text{konsentrasi akhir}}{\text{konsentrasi awal}} \times \text{faktor pengenceran} \times 100 \%$$

3.6 Analisis Data

Data-data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik dan deskriptif. Data dari perhitungan kadar protein dianalisis uji statistik analisis varian dua faktor (ANOVA). Apabila terdapat pengaruh nyata ($p < 0,05$), maka digunakan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 5 % ($\alpha = 0,05$). Sedangkan data berat molekul protein yang diperoleh dideskripsikan dalam bentuk tabel.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi sampel

Gelatin merupakan salah satu bahan tambahan pangan yang cukup digemari oleh masyarakat karena sifat aplikatif yang dimilikinya. Gelatin komersial yang ada di pasaran seringkali tidak mencantumkan label kemasan sehingga tidak ada kejelasan informasi tentang produk gelatin tersebut, seperti: komposisi, nilai gizi dan asal hewan yang dijadikan bahan baku. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana karakteristik gelatin komersial yang beredar di toko kue dimana fokus penelitian yang digunakan adalah karakteristik profil protein gelatin komersial, meliputi kadar protein dan berat molekul protein.

Gelatin yang digunakan sebagai bahan baku penelitian ini adalah gelatin komersial yang diperoleh dari tiga toko kue yang berbeda di daerah kota Malang yang selanjutnya disebut gelatin sapi komersial, gelatin T1, dan gelatin T2. Di samping itu, digunakan pula gelatin sapi standar yang telah diketahui asal bahan bakunya sebagai pembandingan.

Sampel gelatin yang digunakan berbentuk serbuk dilarutkan dalam akuades dengan suhu 50 °C. Gelatin dibuat dalam bentuk larutan karena tahap selanjutnya (presipitasi protein) membutuhkan sampel yang berwujud larutan. Akan tetapi, gelatin memiliki sifat yang sukar larut dalam air pada suhu ruang sehingga diberikan suhu sebesar 50 °C agar gelatin larut dengan baik. Sebagaimana yang telah disebutkan oleh Ward dan Courts (1977) dalam Praira (2008) bahwa gelatin larut dalam air minimal pada suhu 49 °C, cenderung membentuk gel pada suhu sekitar 48 °C dan larut baik pada suhu 60 °C sampai 70

°C. Raharja (2004) juga menyatakan bahwa gelatin larut dalam air panas dengan bentuk serpihan atau tepung (serbuk), berbau dan berasa. Larutan gelatin yang dihasilkan pada penelitian ini berwarna bening kekuningan dengan bau yang khas.

4.2 Presipitasi Protein

Karakterisasi profil protein gelatin komersial diawali dengan presipitasi protein terlebih dahulu. Presipitasi protein yang juga dikenal dengan pengendapan protein pada penelitian ini dimaksudkan untuk mendapatkan protein berkonsentrasi tinggi dengan lebih sedikit kontaminan (senyawa nonprotein). Metode presipitasi disini juga digunakan sebagai pembandingan metode untuk mengetahui seberapa besar pengaruhnya terhadap hasil analisis profil protein menggunakan SDS-PAGE dan analisis kadar protein menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Presipitasi pelarut organik didasarkan pada penurunan konstanta dielektrik (K_d) pelarut sehingga kelarutan protein terhadap pelarut (air) menurun dan menyebabkan protein mengendap. Artinya, pelarut organik menyebabkan pengendapan protein dengan cara menurunkan solubilitas/kelarutan protein terhadap pelarut (Wirahadikusumah, 2001). Presipitasi yang dipilih pada penelitian ini adalah presipitasi pelarut organik yang memiliki konstanta dielektrik tinggi dan tingkat toksisitas rendah, yaitu aseton dan etanol. Konsentrasi aseton maupun etanol dibuat dengan variasi konsentrasi 20 %, 40 %, 60 %, dan 80 %.

Protein dalam larutan gelatin dapat diendapkan melalui presipitasi. Akan tetapi, metode presipitasi menggunakan pelarut organik ini harus ditambahkan dalam keadaan dingin atau pada suhu rendah. Persyaratan ini dilakukan untuk menghindari terjadinya denaturasi protein dimana peristiwa denaturasi ini dapat

terjadi oleh adanya penambahan aseton dan alkohol (Poedjiadi, 2006 dan Winarno (2004). Pada penelitian ini, aseton dan etanol didinginkan terlebih dahulu selama \pm 2 jam dalam *freezer* bersuhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hal ini dimaksudkan agar protein gelatin tidak mengalami denaturasi, yaitu perubahan konformasi alamiah protein menjadi suatu konformasi yang tidak menentu. Menurut Winarno (2004) denaturasi protein merupakan perubahan susunan ruang atau rantai polipeptida suatu molekul protein.

Pelarut organik dingin ditambahkan ke dalam sampel gelatin secara perlahan dan diinkubasi dalam *freezer* bersuhu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama semalam (16 jam) setelah dihomogenkan dengan vorteks. Tahap inkubasi ditujukan untuk memaksimalkan kontak antara pelarut organik dengan larutan protein (gelatin). Pada tahap ini terjadi proses penurunan Kd pelarut air dalam larutan protein oleh aseton dan etanol.

Penambahan pelarut organik ke dalam larutan protein akan mengurangi kelarutan air terhadap residu hidrofilik protein, sehingga terjadi penurunan Kd pelarut. Posisi air di sekitar daerah hidrofobik dari permukaan protein akan digantikan oleh pelarut organik dan segera terjadi interaksi hidrofobik. Interaksi ini menaikkan gaya tarik-menarik antara muatan berlawanan dan menurunkan derajat ionisasi gugus R protein. Akibatnya, molekul protein cenderung beragregasi dan mengendap (Van Oss, 1989 dalam Zelinier, *et al.*, 2005 dan Scopes, 1987).

Campuran gelatin dengan pelarut organik kemudian dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit dengan suhu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk memisahkan suspensi dan supernatan sehingga protein akan mengendap dan

membentuk pelet. Supernatan dibuang, sementara endapan protein dikeringanginkan selama 1 – 2 jam untuk menghilangkan pelarut organik. Hasil presipitasi protein gelatin yang didapatkan berupa endapan/pelet. Pelet tersebut selanjutnya diresuspensi menggunakan buffer fosfat pH 7 untuk menjaga kestabilan pH sampel.

4.3 Karakterisasi profil protein gelatin menggunakan SDS-PAGE

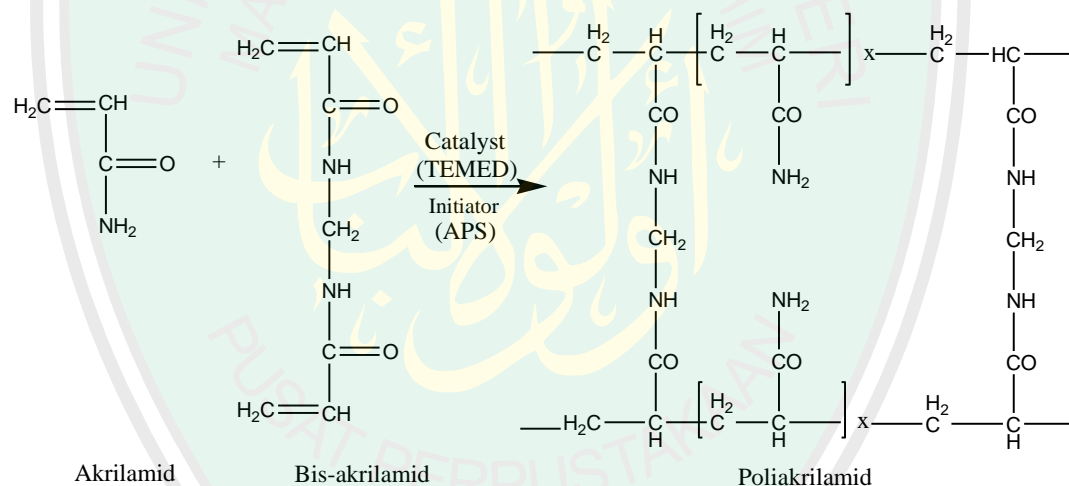
Gelatin termasuk polimer dengan berat molekul tinggi. Berat molekul merupakan variabel yang teristimewa penting karena berhubungan langsung dengan sifat kimia polimer. Umumnya polimer dengan berat molekul tinggi mempunyai sifat yang lebih kuat (Cowd, 1991). Karakterisasi profil protein gelatin yang kedua dilakukan untuk mengetahui pola pita protein dan berat molekul gelatin sapi komersial menggunakan SDS-PAGE.

Analisis berat molekul gelatin komersial menggunakan SDS-PAGE memerlukan suatu gel sebagai tempat terjadinya pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya, yaitu gel poliakrilamid. Gel ini berperan penting dalam SDS-PAGE karena metode ini hampir selalu dilakukan dalam gel dan tidak dalam larutan. Hal ini dikarenakan gel dapat mengurangi arus listrik yang timbul akibat perbedaan suhu yang kecil yang diperlukan agar pemisahan menjadi efektif, gel juga bertindak sebagai saringan molekul yang meningkatkan pemisahan (Styrer, 2000).

Gel poliakrilamid pada penelitian ini dibuat menggunakan cetakan berbentuk segi empat dengan ketebalan 0,75 mm. Komponen penting dalam pembuatan gel poliakrilamid adalah akrilamid, N,N'-bis-akrilamid, ammonium persulfat (APS), dan N,N,N',N'tetrametil-etilendiamin (TEMED). Akrilamid

merupakan senyawa utama yang menyusun gel, sementara bis-akrilamid berfungsi sebagai *cross-linking agent* yang membentuk kisi-kisi (saringan molekul protein) bersama polimer akrilamid.

Komposisi gel poliakrilamid berikutnya adalah APS. Tingginya konsentrasi APS dapat mempengaruhi terbentuknya gel poliakrilamid karena penambahan APS berfungsi sebagai inisiator yang mengaktifkan akrilamid agar bereaksi dengan molekul akrilamid lainnya untuk membentuk rantai polimer yang panjang. Konsentrasi APS yang dipakai penelitian ini sebesar 10 %. Sedangkan TEMED berperan sebagai katalisator reaksi polimerisasi akrilamid menjadi gel poliakrilamid. Reaksi polimerisasi dari akrilamid ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Reaksi polimerisasi akrilamid (Walker, 2002)

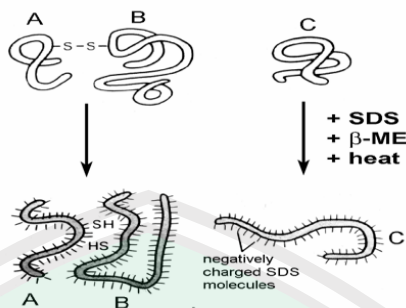
Pada penelitian ini, gel SDS-PAGE yang digunakan adalah sistem diskontinu yang terdiri dari 2 bagian, bagian atas disebut *stacking gel* yang berfungsi sebagai gel pengumpul atau tempat sampel protein. Sementara bagian bawah disebut *separating gel* sebagai tempat migrasi protein. Masing-masing bagian mengandung buffer tertentu, yaitu *Upper Gel Buffer* (UGB) dan *Lower Gel Buffer* (LGB).

Upper Gel Buffer merupakan *buffer stacking gel* yang memiliki pH 6,8 yang mendekati netral (pH 7), dengan adanya buffer ini protein berada dalam bentuk ion dipolar atau disebut juga ion *zwitter* (bermuatan negatif dan positif) yang dapat bereaksi dengan asam maupun basa. Sedangkan LGB yang diberikan pada *separating gel* mempunyai pH sebesar 8,8 yang dapat menjadikan protein bermuatan negatif. Menurut Winarno (2004), molekul protein pada pH tinggi (basa) akan bereaksi sebagai asam atau bermuatan negatif sehingga saat proses *running* sampel, molekul protein dapat bergerak atau bermigrasi menuju anoda.

Gel poliakrilamid yang berbentuk lembaran gel diletakkan di antara dua *running buffer chamber* dengan pH 8,3 sebagai sarana untuk menghubungkan kutub negatif dan kutub positif. Posisi gel yang digunakan pada penelitian ini adalah posisi vertikal.

Reducing sample buffer (RSB) ditambahkan ke dalam sampel dan direbus pada suhu 100 °C sebelum dimasukkan ke dalam perangkat elektroforesis. Pemanasan dan penambahan RSB ini dapat membantu proses terjadinya disosiasi protein. Adapun RSB terdiri dari SDS, β -merkaptoetanol, gliserol, dan bromofenol biru. SDS akan mengikat pada bagian hidrofobik dan residu asam amino, sehingga menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi protein (menjadi *unfolding*). Selain itu, SDS juga menyebabkan seluruh rantai peptida bermuatan negatif dan berada dalam keadaan sejajar. Ikatan disulfida yang tergolong ikatan kuat pada protein akan terputus dengan terjadinya ikatan antara protein dengan SDS. Hal ini menyebabkan struktur sekunder protein menjadi rusak dimana proses ini terjadi dengan bantuan penambahan *disulfide reducing agent* (β -merkaptoetanol) dan pemanasan (Fatchiyah, *et al.*, 2011 dan Kumar, 2007).

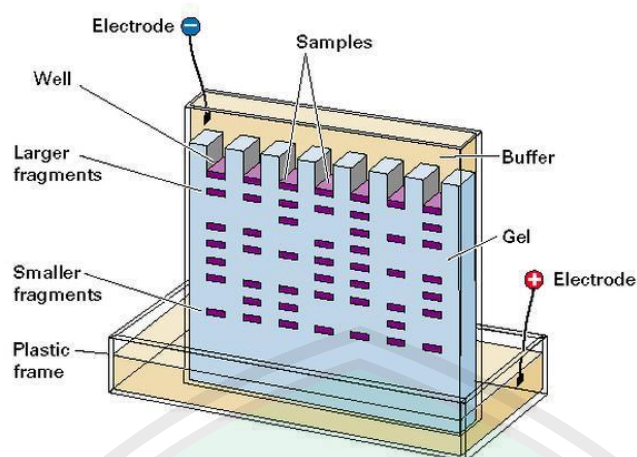
Pengaruh dari SDS, β -merkaptotanol, dan pemanasan pada struktur protein dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Pengaruh SDS, pemanasan dan *reducing agent* (β -merkaptotanol) pada struktur protein.

Lebih lanjut, proses pemanasan dengan cara merebus sampel pada suhu 100 °C ini mendukung terurainya protein menjadi struktur yang lebih sederhana atau lebih kecil karena adanya peningkatan energi kinetik dari panas yang diberikan. Sugiharsono, *et. al.* (2014) menjelaskan bahwa proses pemanasan dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein yang mengakibatkan terbukanya struktur 3 dimensi molekul protein menjadi struktur acak. Panas meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul mengalami vibrasi secara cepat, yaitu pada saat kondisi mendidih yang dapat menyebabkan kerusakan ikatan rangkap pada rantai panjang sehingga protein terpecah menjadi monomer-monomer yang lebih sederhana. Protein yang lebih sederhana ini dapat mempermudah proses pemisahan protein saat perangkat elektroforesis dijalankan (*running* sampel).

Proses *running* sampel dilakukan pada tegangan 100 V selama \pm 85 menit. Pada proses ini terjadi pergerakan dan pemisahan protein. Saat elektroforesis dijalankan, akan terjadi pergerakan ion-ion yang ada di dalam bufer dari kutub negatif ke kutub positif sebagaimana terlihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Proses *running* sampel SDS-PAGE

Pergerakan ion-ion dalam bufer selanjutnya diikuti oleh pergerakan protein pada sampel yang telah dikondisikan bermuatan negatif. Ketika sampel berada pada *stacking gel*, protein dikondisikan berada pada zona yang sesuai dengan berat molekulnya kemudian protein memasuki *separating gel* secara bertahap sesuai dengan zona berat molekulnya. Protein dengan berat molekul rendah akan masuk terlebih dahulu dalam *separating gel*. Dengan demikian, saat bergerak dalam *separating gel*, protein telah berjajar sesuai dengan zona berat molekulnya. Protein yang berukuran kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan protein berukuran besar sehingga protein terpisah sesuai dengan ukuran/berat molekulnya, bukan berdasarkan muatannya.

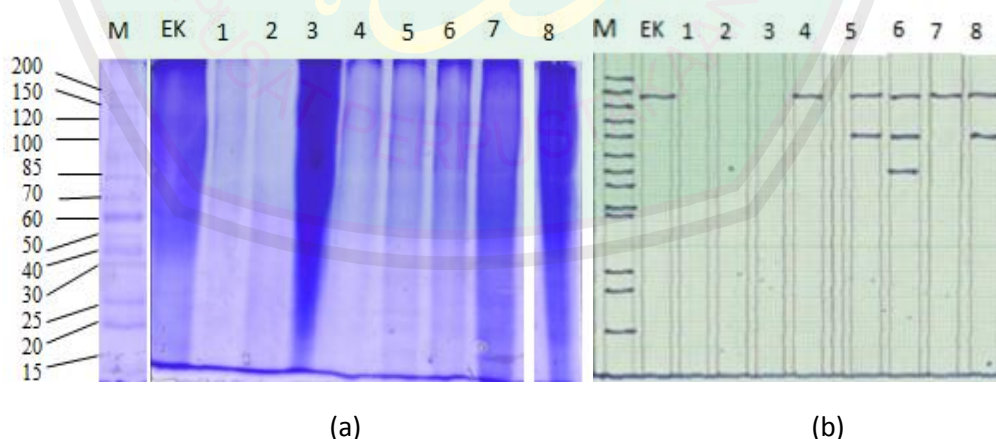
Beratmolekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya dengan cara membandingkan nilai mobilitas relatif (R_f) menggunakan rumus (Fatchiyah, *et. al.*, 2011):

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan pita protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

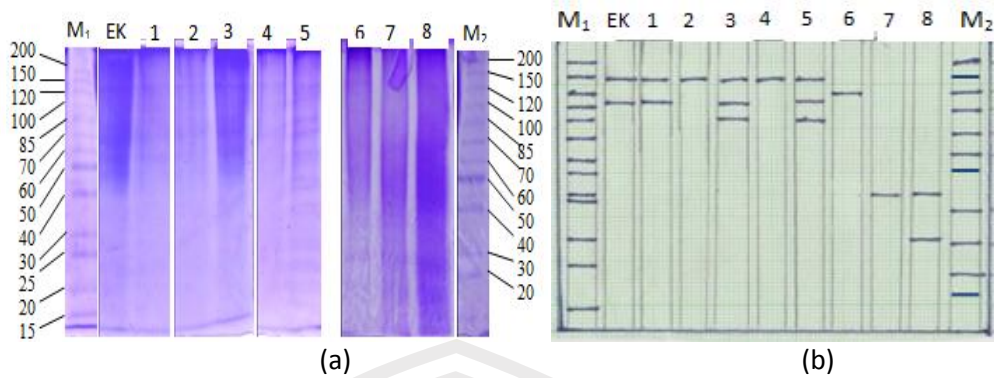
Kemudian nilai Rf sampel gelatin dimasukkan dalam persamaan regresi linear marker protein dengan rumus: $y = a + bx$ dimana y = berat molekul, dan x = nilai Rf sampel.

Berdasarkan hasil perhitungan yang diperoleh, dapat diketahui adanya perbedaan berat molekul pada masing-masing sampel (Lampiran 7). Berat molekul gelatin sapi standar adalah 63 – 130 kDa, gelatin sapi komersial berada pada range 27 – 130 kDa, gelatin T1 mempunyai kisaran berat molekul 109 – 194 kDa, kisaran berat molekul gelatin T2 sebesar 91 – 130 kDa.

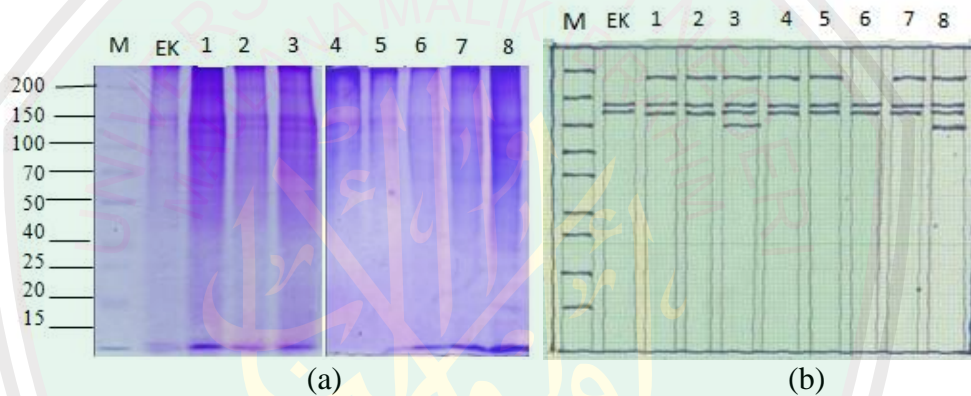
Dengan demikian, dapat diketahui bahwa gelatin komersial memiliki berat molekul yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa gelatin tersusun atas urutan atau sekuen asam amino yang cukup panjang sebagaimana struktur gelatin yang terlihat pada gambar sebelumnya (Gambar 2.3) dimana gelatin merupakan suatu polimer linier asam-asam amino yang umumnya tersusun dari pengulangan glisin-prolin-prolin atau glisin-prolin-hidroksiprolin (Schrieber dan Gareis, 2007).



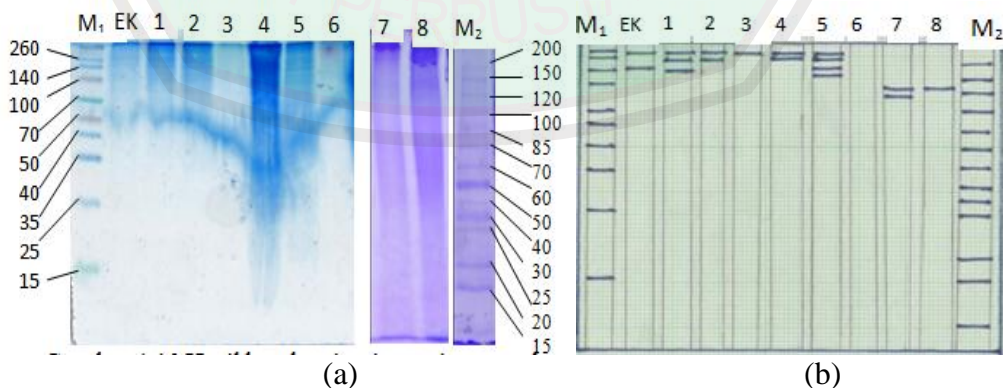
Gambar 4.4.(a) Hasil SDS-PAGE Gelatin Sapi Standar, (b) *Redrawing* Hasil SDS-PAGE Gelatin Sapi Standar. Keterangan: M= Marker; EK = ekstrak kasar; 1 = Etanol 20 %; 2 = Etanol 40 %; 3 = Etanol 60 %; 4 = Aseton 20 %; 5 = Aseton 40 %; 6 = Aseton 60 %; 7 = Aseton 80 %; 8 = Etanol 80 %



Gambar 4.5.(a) Hasil SDS-PAGE Gelatin Sapi Komersial, (b) *Redrawing* Hasil SDS-PAGE Gelatin Sapi Komersial. Keterangan: M₁= Marker 1, M₂= Marker 2, EK = ekstrak kasar, 1 = Etanol 40 %, 2 = Etanol 60 %, 3 = Etanol 80 %, 4 = Etanol 20 %, 5 = Aseton 20 %, 6 = Aseton 40 %, 7 = Aseton 60 %, 8 = Aseton 80 %.



Gambar 4.6.(a) Hasil SDS-PAGE Gelatin T1, (b) *Redrawing* Hasil SDS-PAGE Gelatin T1. Keterangan: M= Marker, EK = ekstrak kasar, 1 = Aseton 20 %, 2 = Aseton 40 %, 3 = Aseton 60 %, 4 = Aseton 80 %, 5 = Etanol 20 %, 6 = Etanol 40 %, 7 = Etanol 60 %, 8 = Etanol 80 %.



Gambar 4.7 (a) Hasil SDS-PAGE Gelatin T2, (b) *Redrawing* Hasil SDS-PAGE Gelatin T2. Keterangan: M₁= Marker 1, M₂= Marker 2, EK = ekstrak kasar, 1 = Aseton 20 %, 2 = Aseton 40 %, 3 = Aseton 60 %, 4 = Aseton 80 %, 5 = Etanol 20 %, 6 = Etanol 40 %, 7 = Etanol 60 %, 8 = Etanol 80 %.

Dari hasil yang diperoleh, profil protein gelatin sapi standar menunjukkan adanya 3 buah pita protein pembeda yang tidak ditemukan pada sampel gelatin komersial, yaitu pada berat molekul 63 kDa, 84 kDa, dan 123 kDa. Namun, ditemukan 1 pita protein sama pada berat molekul 130 kDa di setiap sampel. Kemunculan pita protein yang sama ini diduga merupakan pita protein spesifik yang dimiliki oleh gelatin sapi, yaitu pada kisaran berat molekul 130 kDa. Penelitian sebelumnya yang dilaporkan oleh Azira, *et. al.* (2012) menyatakan profil protein gelatin sapi mempunyai 2 pita protein dengan berat molekul 135 kDa dan 110 kDa.

Di samping kemunculan pita protein yang sama, terdapat beberapa pita protein gelatin komersial yang tidak ditemukan pada gelatin sapi standar, di antaranya adalah 6 buah pita protein (gelatin sapi komersial), 3 buah pita protein (gelatin T1), dan 6 buah pita protein (gelatin T2). Perbandingan berat molekul gelatin sapi standar dengan gelatin komersial pada penelitian ini dirangkum dalam Tabel 4.1.

Berdasarkan Tabel 4.1, terlihat bahwa pola pita protein keempat sampel pada penelitian ini beragam dan berbeda satu sama lain. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan berat molekul yang dimiliki. Perbedaan berat molekul protein yang terdeteksi ini dimungkinkan karena adanya perbedaan dalam proses hidrolisis kolagen menjadi gelatin. Menurut Sarbon, *et. al.* (2013), berat molekul gelatin dapat dipengaruhi oleh proses hidrolisis yang berperan dalam proses pemutusan ikatan peptida dan ikatan silang intramolekuler di antara rantai-rantai peptida. Kaewruang (2013) melaporkan bahwa protein penyusun gelatin yang diekstrak dari kulit *unicorn leatherjacket* dengan suhu ekstraksi yang lebih tinggi

dan waktu ekstraksi yang lebih lama dapat mendegradasi α_2 -chain dengan lebih maksimal sehingga dapat memunculkan lebih banyak pita protein.

Tabel 4.1 Perbandingan berat molekul gelatin standar dan gelatin komersial

Berat molekul (kDa)	Gelatin sapi standar	Gelatin sapi komersial	Gelatin T1	Gelatin T2
194	-	-	✓	-
130	✓	✓	✓	✓
123	-	✓	✓	-
115	-	-	-	✓
119	-	✓	-	✓
109	-	-	✓	-
105	-	-	-	✓
99	-	✓	-	-
97	-	-	-	✓
94	-	-	-	✓
91	-	-	-	✓
84	✓	-	-	-
80	✓	✓	-	-
76	✓	-	-	-
63	✓	-	-	-
42	-	✓	-	-
27	-	✓	-	-

Pengamatan visual terhadap hasil SDS-PAGE pada masing-masing sampel menunjukkan bahwa pita protein yang terbentuk adalah pita protein dengan intensitas tipis. Hal ini mengindikasikan, protein yang terseparasi memiliki konsentrasi protein yang sedikit. Menurut Tanjung dan Kusnadi (2014), tebal tipisnya pita (intensitas pita) yang terbentuk menunjukkan konsentrasi protein pada suatu senyawa. Semakin tebal pita maka konsentrasi semakin tinggi dan jika konsentrasi semakin sedikit maka pita semakin tipis.

Konsentrasi protein yang dimaksudkan di atas berbeda dengan konsentrasi/kadar protein hasil Spektrofotometer UV-Vis. Apabila dilihat dari kenampakan pita protein yang diperoleh, nilai kadar protein Konsentrasi protein

yang dimaksudkan di atas berbeda dengan konsentrasi/kadar protein hasil Spektrofotometer UV-Vis. Apabila dilihat dari kenampakan pita protein yang diperoleh, nilai kadar protein hasil Spektrofotometer UV-Vis baik sebelum dan setelah presipitasi tidak dapat menentukan ketebalan dari pita protein. Oleh karenanya, kadar protein terlarut tidak dapat merepresentasikan jumlah maupun berat molekul pita-pita protein (Handayani, *et.*, 2007).

Hasil SDS-PAGE juga menunjukkan beberapa jumlah pita protein dalam satu lajur protein karena dalam satu sampel protein bisa lebih dari satu bahkan puluhan pita yang teridentifikasi dalam gel poliakrilamid. Tanjung dan Kusnadi (2014) menjelaskan bahwa jumlah pita yang terbentuk menunjukkan jenis protein penyusun. Semakin banyak pita yang terbentuk maka jenis protein yang menyusun senyawa tersebut semakin banyak dan sebaliknya jika jumlah pita yang terbentuk sedikit maka jenis protein penyusun suatu senyawa semakin sedikit. Setiap pita protein mewakili berat molekul tertentu.

Tabel 4.2 Perbandingan jumlah pita protein yang terdeteksi hasil SDS-PAGE gelatin komersial sebelum dan setelah presipitasi aseton dan etanol

Sampel	Range BM (kDa)	Jumlah pita protein yang terdeteksi								
		Tanpa presipitasi	Konsentrasi Presipitasi etanol (%)				Konsentrasi Presipitasi aseton (%)			
			20	40	60	80	20	40	60	80
Gelatin sapi standar	63 – 130	1	-	-	-	1	2	3	2	2
Gelatin sapi komersial	27 – 130	2	1	2	1	3	3	1	1	2
Gelatin T1	109 – 194	2	2	2	3	4	3	3	4	3
Gelatin T2	91 – 130	2	4	-	2	1	3	3	1	2

Profil protein hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa perlakuan presipitasi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan sampel protein tanpa perlakuan presipitasi (Tabel 4.2). Perlakuan presipitasi etanol pada gelatin sapi standar memberikan hasil visual pita protein yang tidak terdeteksi dengan baik dan terdapat *smear* dimana hasil presipitasi etanol 20, 40, dan 60 % tidak memunculkan pita protein yang terseparasi sementara hasil presipitasi etanol 80 % hanya memunculkan 1 pita protein, yaitu pada 130 kDa. *Smear* tersebut dimungkinkan karena tingkat kemurnian sampel yang rendah dimana tingkat kemurnian sampel juga dapat mempengaruhi visualisasi pita protein. Menurut Nareswari (2007), pita protein yang menumpuk (*smear*) dapat disebabkan oleh rendahnya kemurnian suatu sampel.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE, terlihat bahwa pemisahan protein gelatin komersial dan gelatin standar masih kurang maksimal. Hal ini ditunjukkan dengan visualisasi pita protein yang tidak konsistennya berat molekul yang diperoleh dan kurang jelasnya penampakan pita protein. Hal ini dimungkinkan karena metode presipitasi menggunakan pelarut organik merupakan metode isolasi protein yang tergolong sederhana sehingga tingkat kemurnian yang dihasilkan belum maksimal. Oleh karena itu, masih diperlukan validasi metode presipitasi pelarut organik dan juga penggunaan metode isolasi protein dengan tingkat kemurnian yang lebih baik, misalnya menggunakan metode hidrolisis pepsin atau kromatografi filtrasi gel.

4.4 Analisis Kadar Protein Gelatin Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Gornall, *et al.*, 1948)

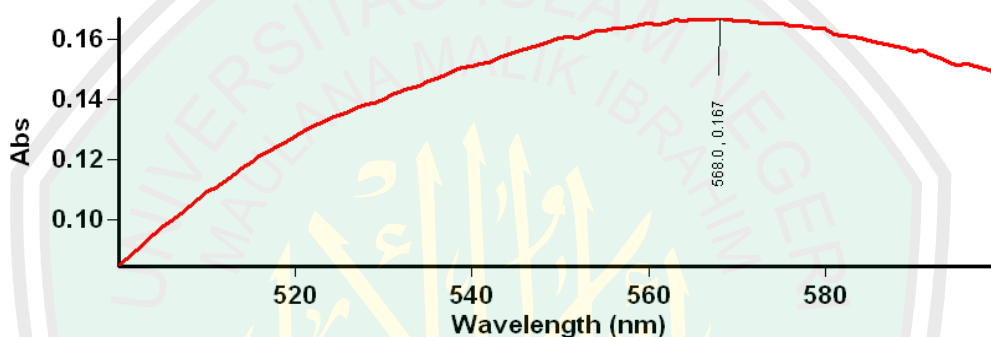
Profil protein gelatin dapat dikarakterisasi berdasarkan kadar protein dimana kadar protein ini menunjukkan seberapa besar kandungan protein yang terdapat dalam bahan pangan gelatin. Kadar protein gelatin komersial ditentukan dari penggabungan dua metode, yaitu pengompleksan protein gelatin dengan penambahan reagen biuret yang dikenal dengan metode biuret dan metode Spektrofotometri UV-Vis. Hal ini dikarenakan analisis kuantitatif protein secara Spektrofotometri UV-Vis dapat diketahui menggunakan reagen berwarna (pereaksi). Intensitas warna dari kompleks yang terbentuk sebanding dengan kadar protein sampel (Praira, 2008).

Analisis kadar protein pada penelitian ini terdiri dari 3 tahap, di antaranya adalah penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan kurva standar, dan pengukuran kadar protein sampel gelatin. *Bovine Serum Albumin* (BSA) merupakan protein yang digunakan sebagai protein standar pada penentuan panjang gelombang maksimum dan kurva baku standar. BSA banyak digunakan dalam pembuatan kurva baku standar karena sedikitnya efek dalam reaksi biokimia. BSA ini merupakan protein albumin yang berasal dari sapi (Mufidah, 2013).

Tahap penentuan panjang gelombang maksimum atau λ_{maks} dimaksudkan untuk mengetahui absorbansi maksimum protein pada kisaran panjang gelombang 500 – 650 nm. Menurut Gandjar dan Rohman (2007) panjang gelombang maksimum dapat memberikan kepekaan maksimum, hal ini dikarenakan pada panjang gelombang maksimum tersebut perubahan absorbansi untuk setiap konsentrasi adalah yang paling besar. Pada kondisi tersebut hukum Lambert-Beer

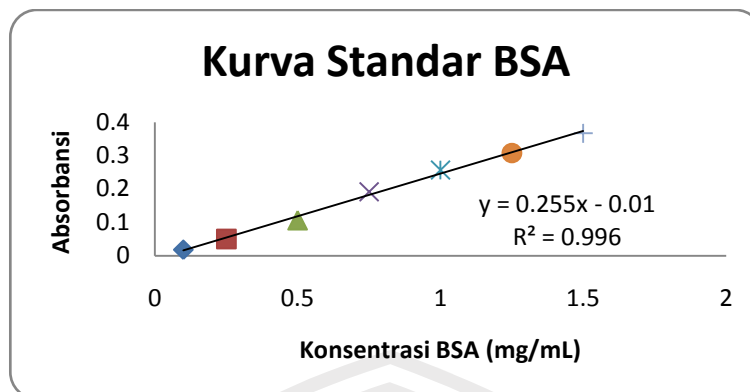
akan terpenuhi dan apabila dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali.

Hasil pengukuran dengan Spektrofotometer UV-Vis menunjukkan λ_{maks} protein pada penelitian ini sebesar 568 nm. Pada absorbansi 568 nm ini terjadi pengabsorbansian sinar tampak/*visible* dengan warna komplementer ungu oleh kompleks Tembaga-BSA yang lebih sensitif dimana sinar tampak ungu (lembayung) ini berada pada *range* 560 – 580 nm (Gandjar dan Rohman, 2007).



Gambar 4.8 Kurva panjang gelombang maksimum

Tahap yang kedua, yaitu pembuatan kurva standar BSA yang diukur absorbansinya pada λ_{maks} yang telah ditemukan, yaitu 568 nm. Kurva standar dibuat dengan memplotkan absorbansi sebagai ordinat (sumbu Y) dan konsentrasi BSA sebagai absis (sumbu X). Absorbansi larutan standar yang diukur diplotkan terhadap konsentrasinya sehingga diperoleh garis lurus berupa grafik. Grafik ini disebut plot hukum Lambert-Beer, dan jika garis yang dihasilkan merupakan suatu garis lurus maka dapat dikatakan bahwa Lambert-Beer terpenuhi pada kisaran konsentrasi yang diamati.



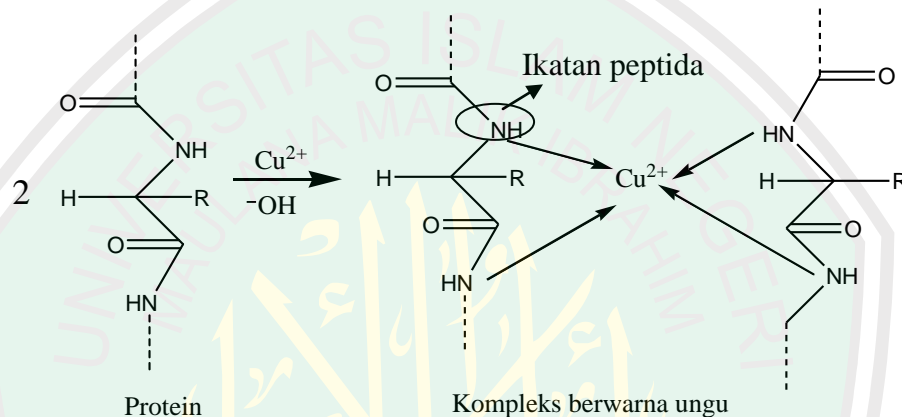
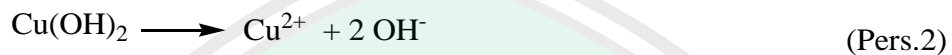
Gambar 4.9 Grafik kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Nilai absorbansi yang terukur pada penelitian ini mengalami kenaikan seiring dengan meningkatnya konsentrasi BSA sehingga terbentuk garis linier yang menunjukkan hubungan linier antara absorbansi dan konsentrasi. Dengan demikian, absorbansi (A) berbanding lurus dengan konsentrasi (c) dan memenuhi hukum Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$) yang harus dipenuhi pada analisis Spektrofotometri UV-Vis.

Persamaan regresi linier kurva baku yang diperoleh selanjutnya digunakan dalam penentuan konsentrasi/kadar sampel gelatin. Penentuan kadar protein gelatin dilakukan dengan perlakuan yang sama sebagaimana tahap sebelumnya, yaitu penambahan reagen biuret, vorteks, inkubasi, dan pengukuran absorbansi menggunakan λ_{maks} yang telah ditemukan (Gambar 4.10). Inkubasi yang dilakukan bertujuan agar reaksi antara protein gelatin dan reagen biuret dapat berlangsung sempurna yang ditandai dengan perubahan warna larutan dari bening menjadi biru/ungu sehingga terbentuk senyawa kompleks berwarna biru/ungu.

Warna kompleks ungu atau violet terbentuk karena adanya reaksi antara Ion Cu^{2+} dari pereaksi biuret dalam suasana basa dengan polipeptida atau ikatan-

ikatan peptida yang menyusun protein. Reagen biuret pada metode ini mengandung ion Cu^{2+} yang akan bereaksi dengan gugus N pada ikatan peptida protein dalam suasana basa dimana ion Cu^{2+} hanya dapat mengikat protein jika larutan dikondisikan menjadi basa, dalam hal ini NaOH pada reagen biuret merupakan agen pembuat suasana basa (Bintang, 2010).



Gambar 4.10 Reaksi dugaan antara protein dan reagen biuret (Gilvery, 1996 dalam Mufidah, 2013)

Kadar protein sampel gelatin ditentukan berdasarkan hasil pengukuran absorbansi. Absorbansi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku standar yang telah diperoleh dari tahap sebelumnya. Dari hasil penelitian, diperoleh kadar protein gelatin tanpa presipitasi sedikit berbeda pada masing-masing sampel yang berkisar antara 72,94 – 86,45 % yang ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Kadar protein (%) gelatin tanpa perlakuan presipitasi

Sampel	Kadar Protein (%)
Gelatin sapi standar	80,51
Gelatin sapi komersial	72,94
Gelatin T1	73,92
Gelatin T2	86,45

Hasil yang telah diperoleh tersebut menunjukkan bahwa gelatin sapi standar memiliki kadar protein yang lebih tinggi dibandingkan gelatin sapi komersial dan gelatin T1 tetapi lebih rendah dibandingkan gelatin T2. Gelatin komersial yang digunakan pada penelitian ini mengandung protein yang lebih rendah jika dibandingkan dengan nilai kadar protein gelatin komersial hasil penelitian Said, *et. al*(2011) yang berkisar antara 83,36 sampai 89,74 % menggunakan metode Kjeldahl.

Perbedaan nilai kadar protein terukur ini diduga karena perbedaan metode analisis yang digunakan. Menurut Winarno (2004) metode Kjeldahl dilakukan untuk menganalisis kadar protein kasar dalam bahan makanan secara tidak langsung, karena yang dianalisis adalah kadar nitrogennya atau total nitrogen sehingga purin, pirimidin, vitamin-vitamin, asam amino besar, kreatina, dan kreatinina ikut teranalisis sebagai nitrogen protein. Sedangkan menurut Bintang (2010) metode Biuret menganalisis kadar protein berdasarkan ikatan-ikatan peptida penyusun protein karena reagen biuret bereaksi secara spesifik dengan protein, bukan gugus N ataupun asam amino. Oleh karena itu, hasil yang diperoleh pada metode Kjeldahl cenderung lebih tinggi dibandingkan metode Biuret.

Analisis selanjutnya adalah analisis ragam gelatin komersial hasil perlakuan presipitasi. Berdasarkan analisis ragam menggunakan SPSS nilai $p < 0,05$ (Lampiran 10) menunjukkan adanya pengaruh perlakuan kombinasi pelarut organik (etanol dan aseton) dan konsentrasi terhadap kadar protein gelatin komersial, maka akan dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range*

Test). Hasil uji DMRT rerata kadar protein gelatin sapi standar berdasarkan kombinasi pelarut organik dan konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil Uji DMRT Kadar Protein (%) Gelatin Sapi Standar dengan Perlakuan Presipitasi menggunakan Variasi Jenis dan Konsentrasi Pelarut Organik

Perlakuan	Jenis Pelarut Organik	Konsentrasi Pelarut Organik (%)	Rerata Kadar Protein (%)
Tanpa presipitasi	-	-	80,51
Presipitasi	Etanol	20	25,10 ^b
		40	71,70 ^c
		60	72,50 ^c
		80	76,15
Presipitasi	Aseton	20	12,20 ^a
		40	21,60 ^b
		60	22,90 ^b
		80	86,30 ^d

Keterangan: notasi yang sama berarti tidak ada beda yang nyata ($p > 0,05$) pada taraf 5% menurut uji *Duncan*

Berdasarkan Tabel 4.4 dapat dilihat bahwa gelatin sapi standar pada presipitasi menggunakan konsentrasi etanol 20 % berbeda nyata dengan konsentrasi etanol 40, 60, dan 80 % sedangkan konsentrasi 40, 60, dan 80 % tidak menunjukkan perbedaan yang nyata satu sama lain, artinya kombinasi perlakuan presipitasi etanol pada ketiga konsentrasi ini menghasilkan kadar protein yang sama. Pada presipitasi aseton, konsentrasi 40 % dan 60 % menunjukkan tidak ada beda nyata namun berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan presipitasi etanol 20 % dan 80 %. Kadar protein gelatin sapi standar tertinggi diperoleh dari presipitasi aseton 80 % (86,30 %).

Hasil analisis berikutnya pada Tabel 4.5, terlihat bahwa nilai kadar protein gelatin sapi komersial dengan kombinasi perlakuan presipitasi etanol 20 % berbeda nyata dengan presipitasi etanol 40, 60, dan 80 %. Akan tetapi, presipitasi

etanol 60 dan 80 % tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Sementara pada presipitasi aseton, masing-masing konsentrasi menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Kadar protein gelatin sapi komersial tertinggi ditunjukkan pada presipitasi aseton 80 %.

Tabel 4.5 Hasil Uji DMRT Kadar Protein (%) Gelatin sapi komersial dengan Perlakuan Presipitasi menggunakan Variasi Jenis dan Konsentrasi Pelarut Organik

Perlakuan	Jenis Pelarut Organik	Konsentrasi Pelarut Organik (%)	Rerata Kadar Protein (%)
Tanpa presipitasi	-	-	72,94
Presipitasi	Etanol	20	8,20 ^a
		40	54,90 ^c
		60	69,05 ^d
		80	70,40 ^d
Presipitasi	Aseton	20	8,80 ^a
		40	22,75 ^b
		60	55,85 ^c
		80	74,35 ^d

Keterangan: notasi yang sama berarti tidak ada beda yang nyata ($p > 0,05$) pada taraf 5 % menurut uji *Duncan*

Hasil uji DMRT gelatin T1 yang tercantum pada Tabel 4.6 menunjukkan bahwa kadar protein hasil kombinasi perlakuan presipitasi etanol 20 % berbeda nyata dengan presipitasi etanol 40, 60, dan 80 % sementara pada konsentrasi 60 % dan 80 % tidak menunjukkan nilai kadar protein yang berbeda nyata. Pada pelarut aseton, kadar protein presipitasi aseton 20, 40, 60, dan 80 % terlihat saling berbeda nyata.

Kombinasi perlakuan yang memberikan nilai kadar protein tertinggi pada gelatin T1 adalah presipitasi etanol 80 % sebesar 91,60 %. Akan tetapi, presipitasi etanol 80 % tidak berbeda nyata dengan presipitasi etanol 60 % sehingga dapat

disimpulkan bahwa presipitasi etanol 60 % dan 80 % dapat memberikan nilai kadar protein yang tinggi.

Tabel 4.6 Hasil Uji DMRT Kadar Protein (%) Gelatin T1 dengan Perlakuan Presipitasi menggunakan Variasi Jenis dan Konsentrasi Pelarut Organik

Perlakuan	Jenis Pelarut Organik	Konsentrasi Pelarut Organik (%)	Rerata Kadar Protein (%)
Tanpa presipitasi	-	-	73,92
Presipitasi	Etanol	20	15,90 ^b
		40	61,60 ^e
		60	90,20 ^g
		80	91,60 ^g
Presipitasi	Aseton	20	11,80 ^a
		40	28,65 ^c
		60	53,10 ^d
		80	79,80 ^f

Keterangan: notasi yang sama berarti tidak ada beda yang nyata ($p > 0,05$) pada taraf 5% menurut uji *Duncan*

Tabel 4.7 Hasil Uji DMRT Kadar Protein (%) Gelatin T2 dengan Perlakuan Presipitasi menggunakan Variasi Jenis dan Konsentrasi Pelarut Organik

Perlakuan	Jenis Pelarut Organik	Konsentrasi Pelarut Organik (%)	Rerata Kadar Protein (%)
Tanpa presipitasi	-	-	86,45
Presipitasi	Etanol	20	10,50 ^a
		40	26,55 ^b
		60	70,55 ^d
		80	89,20 ^e
Presipitasi	Aseton	20	10,85 ^a
		40	11,65 ^a
		60	52,30 ^c
		80	80,40 ^d

Keterangan: notasi yang sama berarti tidak ada beda yang nyata ($p > 0,05$) menurut uji *Duncan*

Berdasarkan hasil uji DMRT pada Tabel 4.7, kombinasi perlakuan presipitasi etanol dengan konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 % pada gelatin T2 menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Berbeda dengan pelarut aseton, kombinasi perlakuan yang diberikan pada konsentrasi aseton 20 dan 40 % tidak

berbeda nyata namun keduanya berbeda nyata dengan konsentrasi 60 dan 80 %. Kadar protein tertinggi diperoleh dari presipitasi etanol 80 %.

Data yang diperoleh dari masing-masing sampel gelatin menunjukkan bahwa perlakuan presipitasi dengan konsentrasi 80 % mempunyai nilai kadar protein yang paling tinggi. Kadar protein yang diperoleh pada konsentrasi ini terhitung lebih tinggi dari kadar protein gelatin tanpa perlakuan presipitasi. Di antara gelatin komersial yang di analisis, gelatin T1 hasil presipitasi etanol 80 % memberikan nilai kadar protein tertinggi (91,6 %). Sama halnya dengan presipitasi etanol, presipitasi aseton dengan konsentrasi 80 % juga memberikan kadar protein yang lebih tinggi dari presipitasi aseton lainnya dengan konsentrasi yang lebih rendah. Gelatin sapi standar memberikan nilai kadar protein tertinggi (86,3 %).

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa variabel yang mempengaruhi kadar protein gelatin adalah konsentrasi agen pengendap protein. Semakin tinggi konsentrasi pelarut organik yang digunakan, semakin meningkat kadar protein yang terukur. Sebagaimana yang dilaporkan oleh Nurhayati, *et.al.*(2010), konsentrasi protein semakin bertambah dengan bertambahnya konsentrasi pelarut organik. Dengan kata lain, meningkatnya konsentrasi pelarut organik yang ditambahkan pada larutan protein gelatin, akan meningkatkan kemampuan pelarut organik dalam menurunkan kelarutan pelarut (air) sehingga protein yang dipisahkan dari senyawa nonprotein memiliki nilai kadar protein yang lebih tinggi.

Presipitasi menggunakan etanol pada penelitian ini menghasilkan kadar protein yang cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan aseton ((Lampiran 6).

Hal ini dikarenakan adanya perbedaan tingkat kepolaran kedua pelarut tersebut. Menurut Ahmad (1996) etanol bersifat lebih polar dibandingkan aseton karena memiliki konstanta dielektrik yang lebih tinggi, yaitu 24,3. Sementara aseton bersifat semipolar karena memiliki konstanta dielektrik yang lebih rendah sebesar 20,7. Senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang lebih tinggi akan menarik air lebih kuat dibandingkan senyawa semipolar. Hal inilah yang menjadikan etanol dapat memisahkan protein gelatin dari air yang bertindak sebagai pelarutnya lebih banyak dibandingkan aseton.

Hasil analisis juga menunjukkan bahwa kadar protein terlarut setiap sampel gelatin komersial berbeda satu sama lain (Lampiran 6). Perbedaan ini dimungkinkan karena adanya perbedaan pada proses pembuatan dan bahan baku kolagen yang digunakan. Hal ini didukung oleh pendapat GMIA (2001) bahwa perbedaan kadar protein gelatin dapat dipengaruhi oleh proses pembuatan gelatin terutama pada proses hidrolisis yang dilakukan. Ward dan Courts (1997) dalam Praira (2008) juga berpendapat bahwa kadar protein gelatin dapat bervariasi tergantung dari spesies bahan baku hewan, sumber kolagen dan jenis kolagen yang digunakan.

4.5 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam

Gelatin merupakan salah satu produk yang dihasilkan dari upaya pemanfaatan limbah hewan karena gelatin dibuat dari tulang dan kulit hewan yang mengandung banyak kolagen. Gelatin yang banyak digemari oleh masyarakat luas ini ternyata memiliki kandungan gizi cukup tinggi, khususnya protein. Pada penelitian ini, tiga sampel gelatin komersial yang diperoleh dari toko kue yang berbeda dan satu sampel gelatin sapi standar yang dijadikan sebagai objek

penelitian mengandung kadar protein yang cukup tinggi sesuai pada Tabel 4.3. Tingginya kandungan protein ini menunjukkan bahwa gelatin komersial termasuk makanan dengan nilai gizi tinggi yang bermanfaat bagi kesehatan manusia dimana protein merupakan komponen penting atau penyusun utama sel hewan atau manusia (Poedjiadi, 2006).

Konsumsi makanan bergizi tinggi yang baik untuk tubuh sangat dianjurkan dalam agama Islam karena dapat menunjang kesehatan sehingga dengannya manusia dapat menjalankan tugas dan kewajibannya dengan baik. Dalam Islam, makanan seperti ini digolongkan sebagai makanan yang *thayyib*(baik-baik). Perintah untuk memakan makanan yang baik-baik ini dijelaskan dalam QS. Al-Baqarah [2] ayat 168 sebagai berikut:

عَدُوِّكُمْ إِنَّهُمُ الشَّيْطَانُ خُطُوتٍ تَتَّبِعُونَ أَوْ لَا طَيْبًا حَلَالًا إِلَّا أَرْضِ فِي مِمَّا كَلُوا النَّاسُ يُتَأَيُّهَا
 مُبِين ۞

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.”

Ayat di atas menjelaskan tentang perintah yang diperutukkan bagi seluruh manusia terutama umat Islam untuk mengkonsumsi makanan yang halal dan baik untuk kekuatan jasmani dan rohani. Menurut Shihab (2002) makanan *thayyib* adalah makanan yang memiliki gizi yang cukup dan seimbang, lezat, baik serta proporsional dan tidak berlebihan. Dalam ayat tersebut juga dijelaskan bahwa Allah SWT melarang kita mengkonsumsi makanan yang sebaliknya, yaitu makanan haram. Karena jika demikian, berarti sama dengan mengikuti langkah-langkah syaitan yang menjadi musuh nyata manusia.

Di samping baik untuk kesehatan, konsumsi gelatin yang diperoleh dari hasil hidrolisis kolagen hewan ini merupakan salah satu cara memanfaatkan dan mensyukuri nikmat yang telah diberikan oleh Allah SWT yang telah menciptakan bahan baku gelatin berupa hewan (binatang ternak). Hal ini tercantum dalam Q.S An-Nahl ayat 5 yang berbunyi:

﴿تَأْكُلُونَ مِنْهَا وَمَنْفَعٌ دِفٌّ فِيهَا لَكُمْ خَلْقَهَا وَالْآنَ نَعْمَ﴾

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

Pada ayat di atas terdapat beberapa kata yang perlu digarisbawahi. Pertama, kata (دِفٌّ) yang mengandung arti bulu binatang (hewan) yang dapat digunakan untuk menghangatkan badan dengan cara membuatnya menjadi mantel dan jubah dari bulu dan woolnya. Kedua, kata (مَنْفَعٌ) yang memiliki artibeberapa manfaat, misalnya keturunan, air susu, dan kendaraan. Kata yang ketiga adalah (وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ) yang artinya sebagian lainnya bermanfaat sebagai makanan. Ketiga kata tersebut adalah petunjuk dari Allah SWT mengenai tujuan diciptakannya hewan untuk manusia (As-Suyuthi dan Al-Mahalli, 2010).

Penjelasan yang sama juga disebutkan dalam Kalam Allah, yaitu pada QS. Yaasiin ayat 72 dan QS. Al-Mu'min ayat 79 yang berbunyi:

﴿يَأْكُلُونَ مِنْهَا رُكُوبًا فَمِنْهَا هُمْ وَذَلَّلْنَاهَا﴾

“Dan Kami tundukkan binatang-binatang itu untuk mereka; Maka sebahagiannya menjadi tunggangan mereka dan sebahagiannya mereka makan.” (QS. Yaasiin: 72)

تَأْكُلُونَ وَمِنْهَا مِمَّنْ لَبَسُوا لَكُمْ تَعَمُّ لَكُمْ جَعَلَ الَّذِي اللَّهُ

“Allahlah yang menjadikan binatang ternak untuk kamu, sebahagiannya untuk kamu kendarai dan sebahagiannya untuk kamu makan.” (QS. Al-Mu’min: 79)

Dalam Tafsir Al-Mishbah, Shihab (2002) menjelaskan bahwa kedua ayat di atas diinterpretasikan sebagai keistimewaan dari hewan atau binatang yang diciptakan Allah SWT bagi manusia dengan memiliki berbagai manfaat. Manfaat tersebut merupakan nikmat dan karunia Allah SWT kepada manusia yang kemudian wajib untuk disyukuri dengan cara memanfaatkannya untuk hal-hal yang baik.

Eksplorasi riset pada binatang ternak dapat dijadikan sebagai cara manusia mensyukuri nikmat Allah SWT sehingga binatang ternak/hewan lebih banyak dimanfaatkan dengan mengolahnya menjadi bahan pangan maupun bahan tambahan pangansalah satunya ialah gelatin sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya. Berdasarkan hasil penelitian, gelatin memiliki karakteristik protein yang menarik karena gelatin yang berasal dari tulang dan kulit hewan ini selain memiliki banyak manfaat yang telah diketahui sebelumnya juga memiliki nilai gizi tinggi (protein) yang dapat membantu proses metabolisme tubuh. *Wallahua’lam.*

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Variasi jenis dan konsentrasi pelarut organik pada presipitasi tidak mempengaruhi pola pita protein gelatin komersial. Gelatin sapi standar memiliki 4 buah pita protein dimana terdapat kemiripan pada 130 kDa di setiap gelatin komersial. Jumlah berat molekul gelatin komersial yang tidak dimiliki gelatin sapi standar untuk gelatin sapi komersial, gelatin T1 dan gelatin T2 adalah 6, 3, dan 6 berat molekul.
2. Kadar protein gelatin tanpa presipitasi pada gelatin sapi standar, gelatin sapi komersial, gelatin T1 dan gelatin T2 berturut-turut ialah 80,51 %, 72,94 %, 73,92 %, dan 86,45 %. Variasi konsentrasi pelarut organik pada presipitasi protein memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap kadar protein masing-masing gelatin dimana hasil presipitasi pada konsentrasi etanol dan aseton 80 % memiliki kadar protein tertinggi.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah:

1. Perlu adanya penelitian lanjutan tentang pemurnian protein menggunakan metode hidrolisis pepsin dan pengujian spesifikasi berat molekul menggunakan metode *Western Blot* pada gelatin komersial.
2. Perlu adanya penelitian lanjutan tentang pengujian waktu kestabilan pada analisis kadar protein metode biuret dan identifikasi serapan maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

DAFTAR PUSTAKA

- Aina, M.A., Amin, I., Hafidz, R.N., dan Yaakob, C.M. 2013. Identification Polypeptide Biomarkers of Porcine Skin Gelatine by Two-Dimensional Electrophoresis. *International Food Research Journal* 20 (3): 1395 – 1399.
- Akhmad, H. 1996. *Kimia Larutan*. Bandung: Citra Aditya Bakti.
- Anggraeni, R. 2007. Elektroforesis SDS-PAGE, Immunoblotting, dan Penentuan Asam Amino Antigen dari Sarung Tangan Lateks Karet Alam. *Skripsi*. Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Anonim. 2010. Troubleshooting Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Hycult Biotech*.
- Anthony, C. G., dan Richard, R.B. 2002. *Preparation of Protein Samples for SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: procedures and tips*. Madison: Novagen, Inc. and 2McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin-Madison.
- As - Suyuthi dan Al - Mahalli. 2010. *Tafsir Jalalain*. Penrj. Junaedi, N. Surabaya: PT elBa Fitrah Mandiri Sejahtera.
- Azira, N., Amin, I., dan Che M.Y.B. 2013. Differentiation of Bovine and Porcine Gelatine in Processed Products via Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electroforesis (SDS-PAGE) and Principal Component Analysis (PCA) Techniques. *International Food Research Journal* 19 (3): 1175-1180.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia: teknik penelitian*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Cahyanto, M.N., Utami, T., Richana, N., dan Haliza, E. 2008. Produksi Enzim Selulase dan Penggunaannya untuk Biodegradasi Limbah Jagung menjadi Gula sebagai Substrat Fermentasi Bioetanol. *Ringkasan Eksekutif Hasil-Hasil Penelitian Tahun 2008*.
- Cowd, M.A. 1991. *Kimia Polimer*. Bandung : Penerbit ITB.
- [DEPAG RI] Departemen Agama Republik Indonesia. 1990. *Al-Qur'an dan Tafsirnya*. Jakarta: Departemen Agama Republik Indonesia.
- Dynnar, N. 2011. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Katepsin dari Ikan Bandeng (*Chanos-Chanos Forskall*). *Skripsi*. Departemen Teknologi Hasil Perairan Institut Pertanian Bogor.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., dan Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.

- Findianti, Y. 2013. Pengaruh Konsentrasi Asam Asetat dan Lama Perendaman (Demineralisasi) terhadap Kualitas Gelatin Tulang Ayam Kampung. (*Gallus Domesticus*). *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Gandjar, G.H., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Gemili, S., Umdu, E.S, Yaprak, N., Ostok, S.I, Yener, F.Y.G., Gucbilmes, C.M., Altinkaya, S.A., dan Yemenicioglu, A. 2007. Partial Purification of Hen Egg White Lysozyme by Ethanol Precipitation Method and Determination of the Thermal Stability of Its Lyophilized Form. *Turk J Agric For* 31: 125-134.
- GMIA. 2001. *Gelatin*. Gelatin Manufactures Institute of America. http://www_gmia.com/html/gelatine.html. Diakses tanggal 4 April 2014).
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., dan David, M.M. 1948. Determination of Serum Protein by Means of The Biuret Reaction. *J Biol Chem* 20: 751 – 766.
- Hafidz, R. N., Yaakob, C. M., Amin, I. dan Noorfaizan, A. 2011. Chemical and Functional Properties of Bovine and Porcine Skin Gelatin. *International Food Research Journal* 18: 813-817.
- Handayani, W., Ratnadewi, A. A. I., Santoso, A. B. 2007. Pengaruh Variasi Konsentrasi Sodium Klorida terhadap Hidrolisis Protein Ikan Lemuru (*Sardinella lemuru Bleeker*, 1835) oleh Protease Ekstrak nanas (*Ananas comous [L.] Merr. var. Dulcis*). *Jurnal Teknologi Proses* 6(1) Januari 2007: 1 – 9. Jember: Universitas Jember.
- Hastuti, D. dan Sumpe, I. 2007. Pengenalan dan Proses Pembuatan Gelatin. *Artikel Ilmiah Vol 3. No 1*: Papua.
- Hermanto, S., Sumarlin, L.O., dan Fatimah, W. 2013. *Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis*. *J.Food Pharm.Sci.* 1 (2013) 68-73.
- Irianti, N. D. 2010. Karakterisasi Absorbansi Spektral untuk Penentuan Penurunan Kandungan Protein Susu Sapi Akibat Proses Pemanasan. *Jurnal Teknik Fisika*. Institut Teknologi Surabaya.
- Jannah, A. 2008. *Gelatin*. Malang: UIN Press.
- Kaewruang, P. 2013. Effect of Extracting Conditions and Phosphorilation on Characteristic and Functional Properties of Gelatin from the Skin of Unicorn leatherjacket. *Thesis*. Food and Science Tecnology. Thailand: Prince of Songkla University.
- Kristina, N. N., Kusumah, E. D., dan Lailani, P. K. 2009. Analisis Fitokimia dan Penampilan Pola Pita Protein Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Hasil Koservasi *In Vitro*. *Bul. Littro*. Vol. 20 No. 1, 2009, 11 – 20.

- Kumar, U. 2007. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). *The Journal of Department of Applied Sciences & Humanities* Vol. VI pp. 98-100.
- Lawalati, N. 2013. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari *Beauveria bassiana*. *Skripsi*. Program Studi Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Martianingsih, N. dan Atmaja, L. 2010. Analisis Sifat Kimia, Fisik, dan Termal Gelatin dari Ekstraksi Kulit Ikan Pari (*Himantura gerrardi*) melalui Variasi Jenis Larutan Asam. *Prosiding Skripsi Semester Gasal 2009/2010*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Melas, V., Moerl, M.H, Autran, J.C., dan Feilet, P. 1994. Simple and Rapid Method for Purifying Low Molecular Weight Subunits of Glutenin from Wheat. *American Association of Cereal Chemistry*.
- Mufidah, Z. 2013. Isolasi Gelatin Menggunakan Pelarut Asam Sitrat Dari Tulang Ayam Broiler dengan Variasi Konsentrasi dan Lama Perendaman. *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Munson, J. W. 1991. *Analisis Farmasi Metode Modern*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Nareswari, A. 2007. Enzim Xilanase *Bacillus licheniformis* AQ1: Pemekatan, Studi Termostabilitas, dan Zimogram. *Skripsi*. Bogor: Institut pertanian Bogor.
- Nurhayati, T., Suhartono, M. T., Nuraida, L., dan Poerwanto, S. B. 2010. Pemurnian dan Karakterisasi Inhibitor Protease dari *Chromohalobacter sp.* 6A3, Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Xetospongia testudinaria*. *J. Teknol. dan Industri Pangan, Vol. XXI No. 2*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-prinsip Biokimia Edisi Kedua*. Jakarta: Erlangga.
- Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Praira, W. 2008. Identifikasi Gelatin Dalam Beberapa Obat Bentuk Sediaan Tablet Menggunakan Metode Spektrofotometri. *Skripsi*. Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Raharja, K. 2004. *Manfaat Gelatin Tulang Pari (1)*. Yogyakarta: Kedaulatan Rakyat.
- Raharjo, T.J., Suprihatin, R., dan Pranowo, D. 2007. Pengaruh Pengendapan Protein Serum dengan Pelarut Organik terhadap Profil SDS PAGE Protein Serum. *Indo. J. Chem.*, 7 (3), 337 – 341

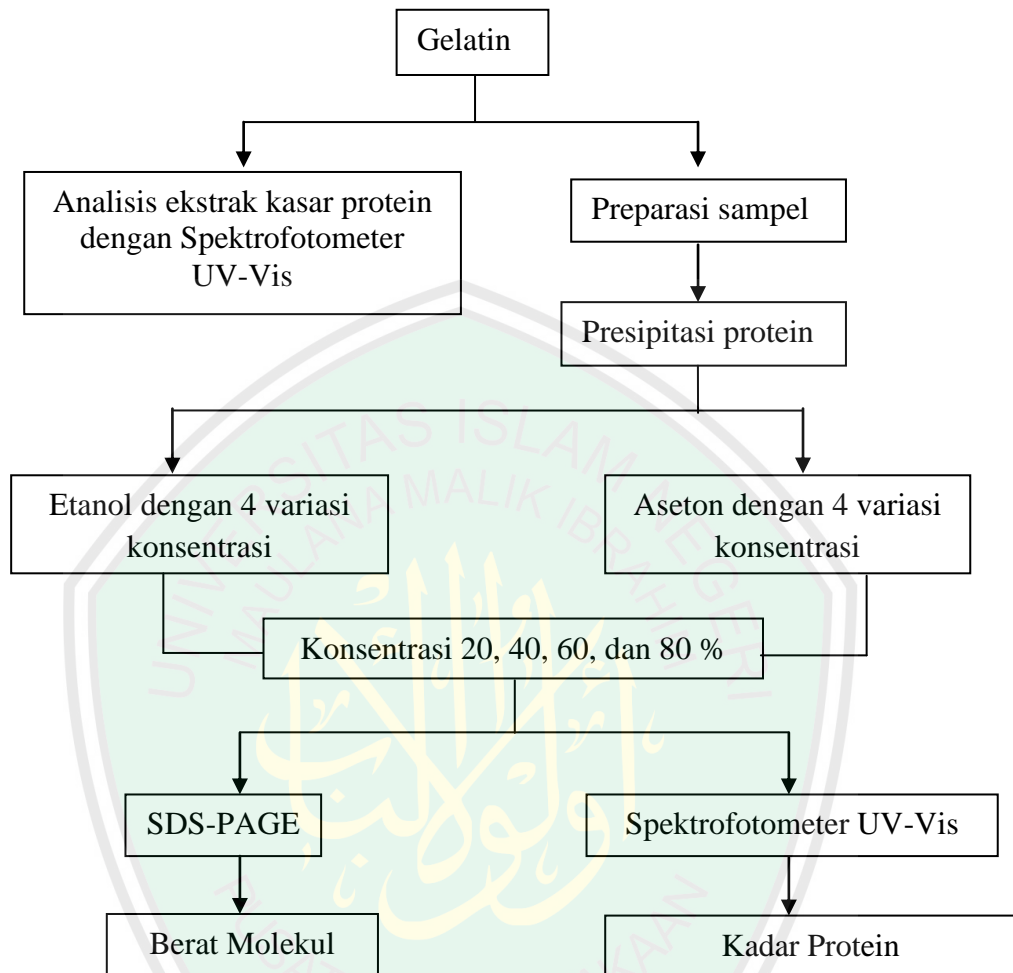
- Rawdkuen, S., Thitipramote, N., dan Benjangkul, S. 2013. Preparation and Functional characterisation of Fish Skin Gelatin and Comparison with Commercial Gelatin. *International Journal of Food Science and Thecnology* 48, 1093 – 1102.
- Riyanto, I. 2006. Analisis Kadar, Daya Cerna dan Karakteristik Protein Daging Ayam Kampung Dan Hasil Olahannya. *Skripsi*. Program Studi Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.
- Rustam, Y.H., 2010. *Struktur Molekul Protein*. <http://sciencebiotech.net/struktur-molekul-protein/>. Diakses tanggal 19 Februari 2014.
- Said, M.I., Triatmodjo, Y., Erwanto, dan Fudholi, A. 2011. gelatin Properties of Goat Skin Produced by Calcium Hydroxide as Curing Material. *Media Peternakan*, pp. 184 – 189. ISSN 0126-0472.
- Sarbon, N., Mhd., Badii, F., dan Howell, N. K. 2013. Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids* 30, page:143 – 151.
- Scrieber, R dan Gareis, H. 2007. *From Collagen to Gelatin*. Gelatin Handbook. Jerman: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.
- Sharma, H.KR., Srivastava, R., dan Shukla, S. 2014. Isolation, Purification and Quantitative Analysis of Cysteine Protease, Bromelain from Ananas Comosus (Pineapple). *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 5(1): (B) 429 – 437. ISSN 0975 – 6299.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera hati.
- Sompie, M., Triatmojo, S., pertiwiningrum, A., dan Pranoto, Y. 2012. Pengaruh Umur Potong dan Konsentrasi larutan Asam Asetat terhadap Sifat Fisika dan Kimia Gelatin Kulit Babi. *Jurnal*. Yogyakarta: Fakultas Peternakan UGM.
- Sudarmadji, S., 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Edisi Pertama. Yogyakarta: Liberty.
- Sugiharsono, A. C., Dewanti, I. D. A., dan Sulistyani, E. 2014. Analisis Profil Protein Ekstrak Biji Mimba (*Azadirachta Indica A. Juzz*) dengan Pemanasan Basah sebelum Ekstrasi melalui Metode SDS-PAGE. *Artikel Ilmiah Penelitian Mahasiswa*. Jember: Universitas Jember.
- Tanjung, Y. L. R dan Kusnadi, J. 2014. Biskuit Bebas Gluten dan Bebas Kasein Bagi Penderita Autis. *Jurnal Pangan dan Agroindustri Vol. 3 No. 1 p. 11 – 12*. Malang: Universitas Brawijaya.

- Underwood, A.L. dan Day, R.A. 2001. *Analisa Kimia Kuantitatif Edisi Keempat*. Jakarta: Erlangga.
- Walker, J. M. 2002. *The Protein Protocols Handbook. Second Edition*. New Jersey: Human Press, Inc.
- Winarno, F.G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi Cetakan Kesebelas*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia: protein, enzim, dan asam nukleat*. Bandung: Penerbit ITB.
- Yatno. 2009. *Isolasi Protein Bungkil Inti Sawit dan Kajian Nilai Biologinya Sebagai Alternatif Bungkil Kedelai pada Puyuh. Skripsi*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.



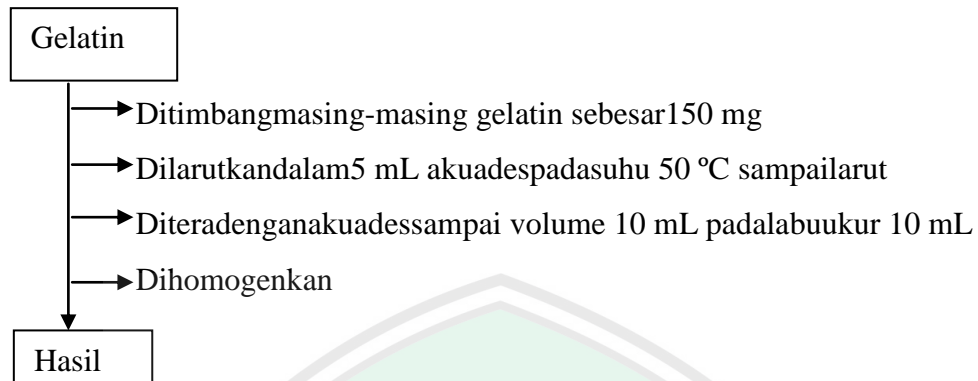
LAMPIRAN

Lampiran 1: Rancangan Penelitian



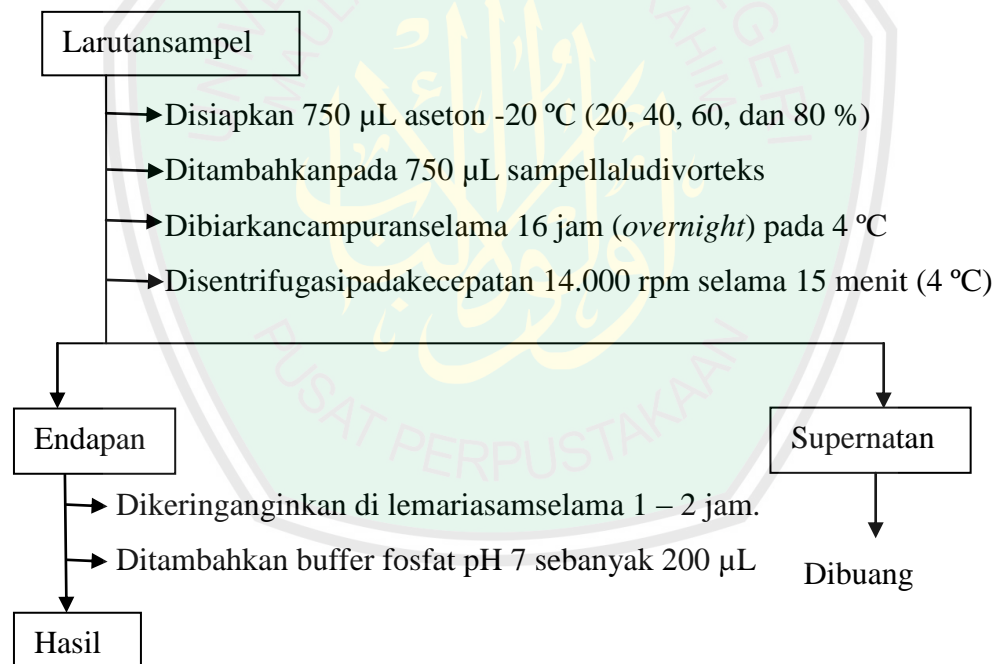
Lampiran 2: Skema Kerja

1. Preparasi sampel

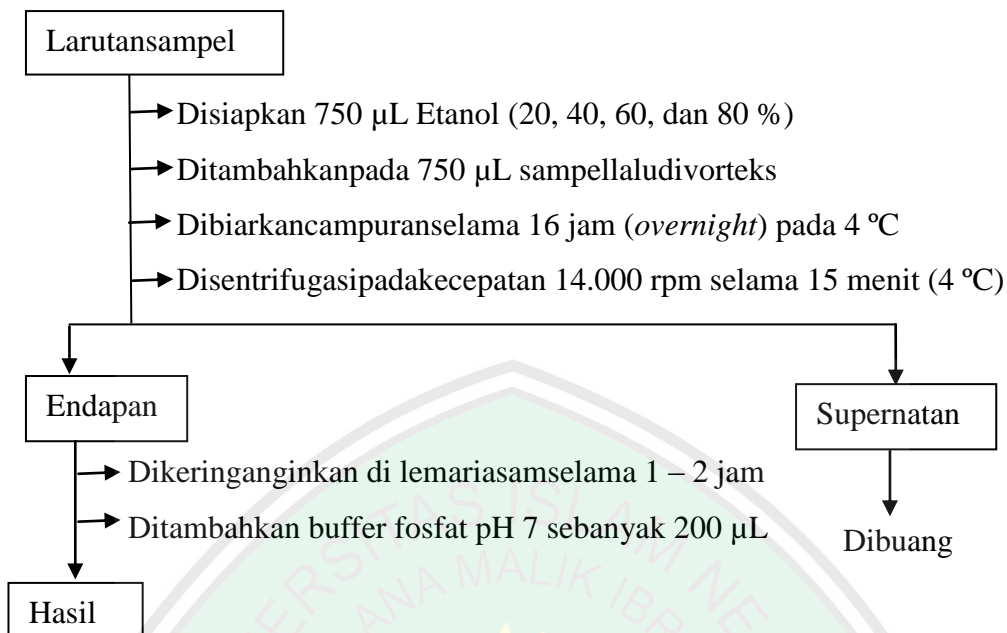


2. Presipitasi Protein

a. Presipitasi Aseton

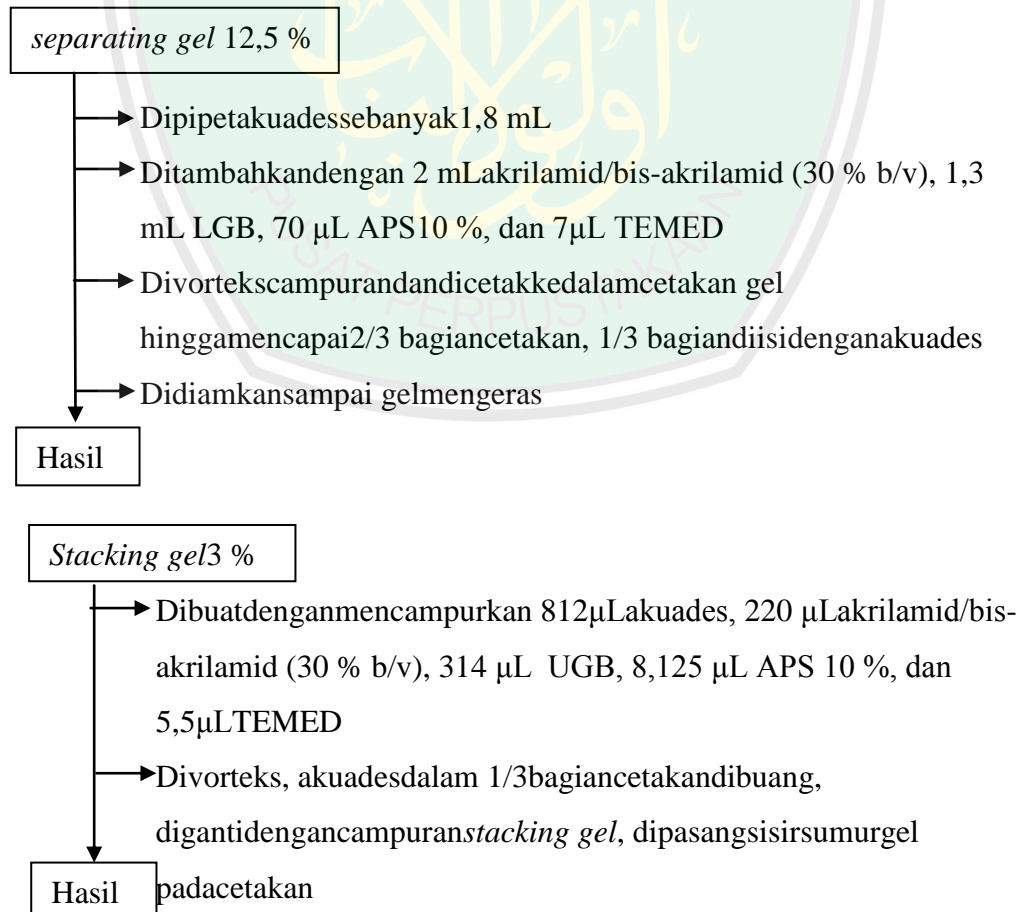


b. Presipitasi Etanol

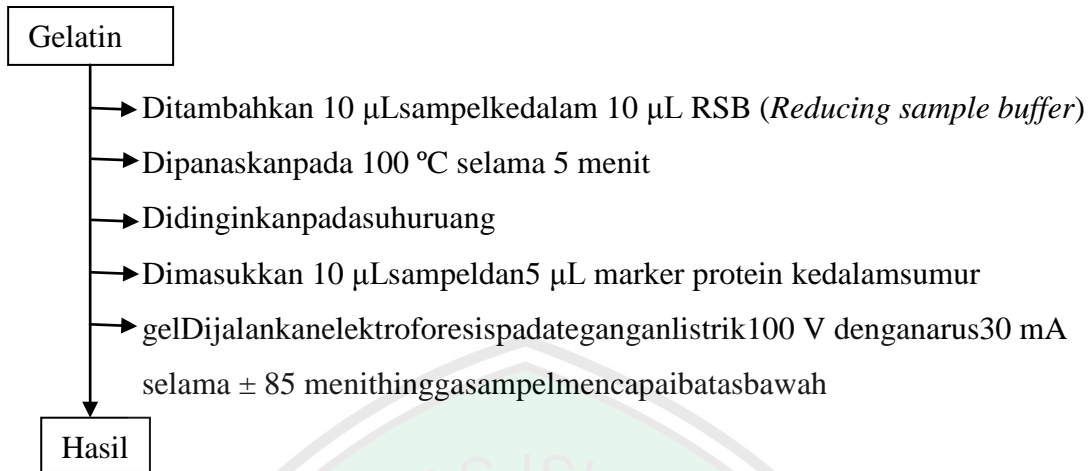


3. Karakterisasi Protein menggunakan SDS-PAGE

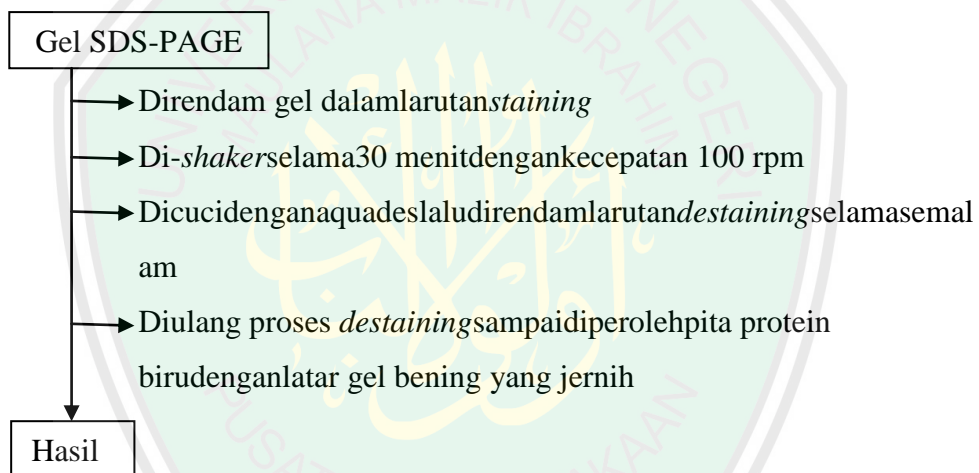
➤ Pembuatan gel SDS-PAGE



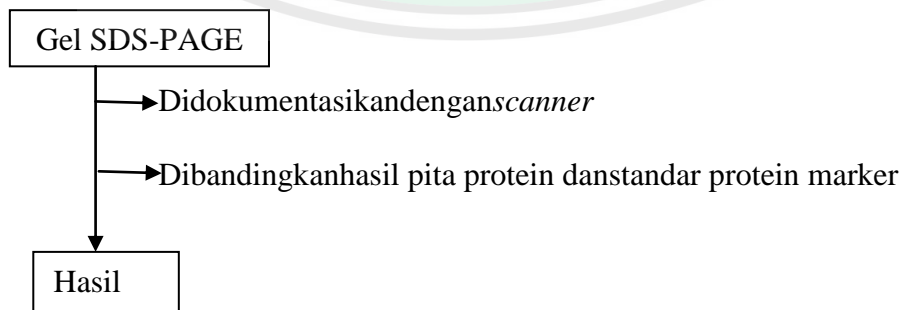
➤ Preparasi dan *running* sampel



➤ Pewarnaan dan pelunturan gel

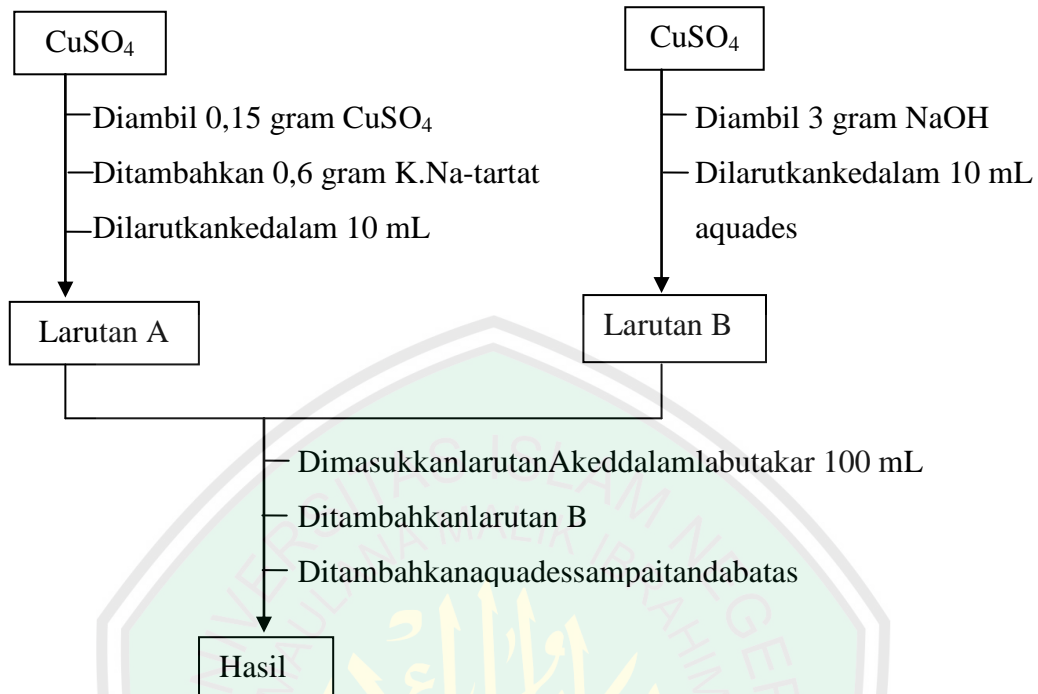


➤ Analisis berat molekul protein

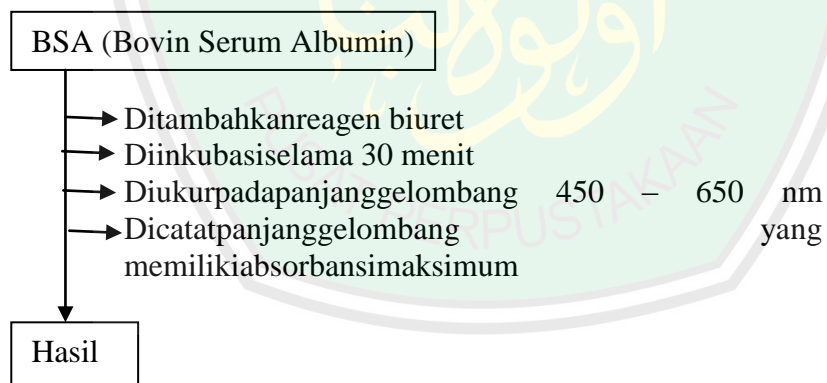


4. Penentuan Kadar Protein Gelatin Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

a. Pembuatan Reagen Biuret



b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Pembuatan Kurva Baku Standar dan



BSA (Bovin Serum Albumin)

- Dimasukkan Larutan BSA 20 mg/mL kedalam 6 tabung reaksi masing-masing 0,05 mL, 0,125 mL, 0,25 mL, 0,375 mL, 0,5 mL dan 0,625 mL untuk konsentrasi 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, dan 1,25 mg/mL
- Ditambahkan akuades sampai volume 3 mL.
- Ditambahkan reagen biuret sebanyak 4,5 mL, divortekssampai homogen. Didiamkan tabung reaksi pada suhu ruang selama 30
- menit sampai terbentuk warna ungu.
- Diukur campuran standar dan pereaksi pada panjang gelombang maksimum
- yang telah ditemukan sehingga diperoleh persamaan regresi linier. Dibuatkurva standart.

Hasil

c. Penentuan kadar protein dalam sampel

Gelatin

- Dipipet 0,5 mL, diletakkan dalam tabung reaksi.
- Ditambahkan akuades sampai volume
- larutan menjadi 3 mL. Ditambahkan 4,5 mL reagen biuret
- kedalam campuran larutan.
- Divortekssampai homogen.
- Didiamkan selama 30 menit sampai terbentuk warna ungu.
- Diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang
- telah ditemukan.
- Diinterpolasikan absorbansi pada persamaan $y = ax + b$
- Dihitung kadar protein (%) dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar protein} = \frac{\text{konsentrasi sampel}}{\text{faktor}} \times 100\%$$

Hasil

Lampiran 3: Pembuatan Reagen dan Perhitungan

1. Pembuatan Konsentrasi Etanol (% v/v)

- Larutan stok :

Diketahui: $M_1 = 96\%$ $V_2 = 10\text{ mL}$

$M_2 = 80\%$

Ditanya: V_2?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$96\% V_1 = 80\% \times 10\text{ mL}$

$V_1 = 800/96 = 8,33\text{ mL}$

Jadi 8,33 mL etanol 96 % dilarutkan sampai volume 10 mL.

- Konsentrasi 60 %

Diketahui: $M_1 = 80\%$ $V_2 = 10\text{ mL}$

$M_2 = 60\%$

Ditanya: V_2?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$80 V_1 = 60 \times 10$

$V_1 = 600/80 = 7,5\text{ mL}$

Jadi 7,5 mL larutan stok 80 % dilarutkan sampai volume 10 mL.

- Konsentrasi 40 %

Diketahui: $M_1 = 60\%$ $V_2 = 10\text{ mL}$

$M_2 = 40\%$

Ditanya: V_2?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$60\% V_1 = 40\% \times 10$

$V_1 = 400/60 = 5\text{ mL}$

Jadi 5 mL larutan 60 % dilarutkan sampai 10 mL.

- Konsentrasi 20 %

Diketahui: $M_1 = 40\%$ $V_2 = 10\text{ mL}$

$M_2 = 20\%$

Ditanya: V_2?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$40\% V_1 = 20\% \times 10$

$$V_1 = 200/40 = 5 \text{ mL}$$

Jadi 5 mL larutan 40 % dilarutkan sampai volume 10 mL.

2. Pembuatan Konsentrasi Aseton (% v/v)

➤ Larutan stok :

$$\text{Diketahui: } M_1 = 99 \% \quad V_2 = 10 \text{ mL}$$

$$M_2 = 80 \%$$

Ditanya: V_2?

$$\text{Jawab: } M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$99 \% V_1 = 80 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 800/99 = 8,08 \text{ mL}$$

Jadi 8,08 mL aseton 99 % dilarutkan sampai volume 10 mL.

➤ Konsentrasi 60 %

$$\text{Diketahui: } M_1 = 80 \% \quad V_2 = 10 \text{ mL}$$

$$M_2 = 60 \%$$

Ditanya: V_2?

$$\text{Jawab: } M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$80 V_1 = 60 \times 10$$

$$V_1 = 600/80 = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi 7,5 mL larutan stok 80 % dilarutkan sampai volume 10 mL.

➤ Konsentrasi 40 %

$$\text{Diketahui: } M_1 = 60 \% \quad V_2 = 10 \text{ mL}$$

$$M_2 = 40 \%$$

Ditanya: V_2?

$$\text{Jawab: } M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$60 \% V_1 = 40 \% \times 10$$

$$V_1 = 400/60 = 5 \text{ mL}$$

Jadi 5 mL larutan 60 % dilarutkan sampai 10 mL.

➤ Konsentrasi 20 %

$$\text{Diketahui: } M_1 = 40 \% \quad V_2 = 10 \text{ mL}$$

$$M_2 = 20 \%$$

Ditanya: V_2?

$$\text{Jawab: } M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$40 \% V_1 = 20 \% \times 10$$

$$V_1 = 200/40 = 5 \text{ mL}$$

Jadi 5 mL larutan 40 % dilarutkan sampai volume 10 mL.

3. Pembuatan Reagen SDS-PAGE

- Akrilamida/bis (30 %) 100 mL

Larutan 1 : Sebanyak 30 gram akrilamida dilarutkan dalam 30 mL akuades.

Larutan 2 : Sebanyak 0.8 gram *N, N'*-metilena-bis-akrilamida dilarutkan dalam 20 mL akuades.

Larutan 2 perlahan-lahan ditambahkan ke dalam larutan 1 lalu ditambahkan akuades sampai 100 mL.

- Pembuatan LGB (*Lower Gel Buffer*) pH 8,8

Sebanyak 18,2 gram Tris dilarutkan dalam 30 mL akuades, 0,4 gram SDS dilarutkan dalam 30 mL akuades, kedua larutan tersebut dicampur. pH larutan kemudian diukur lalu ditentukan sampai menjadi 8,8 dengan menambahkan larutan HCl 1 N sedikit demi sedikit. Setelah pH menjadi 8,8, larutan ditambahkan akuades sampai 100 mL.

- Pembuatan UGB (*Upper Gel Buffer*) pH 6,8

Sebanyak 7,5 gram tris dilarutkan dalam 25 mL akuades ditambahkan dengan 0,4 gram SDS yang telah dilarutkan dalam 35 mL akuades kemudian pH diatur menjadi 6,8 dengan menambahkan larutan HCl 1 N. Lalu larutan ditambah akuades sampai 100 mL.

- Pembuatan Larutan SDS 10%

Sebanyak 10 gram SDS dilarutkan dalam akuades lalu ditera sampai 100 mL.

➤ Bufer elektroforesis pH 8,3

Sebanyak 1,5 gram tris, 7,2 gram glisin dan 0,5 gram SDS 0,1 % (b/v) dilarutkan dan dihomogenkan dengan 500 mL akuades. Lalu pH larutan diukur tanpa harus menambahkan asam atau basa ke dalam larutan.

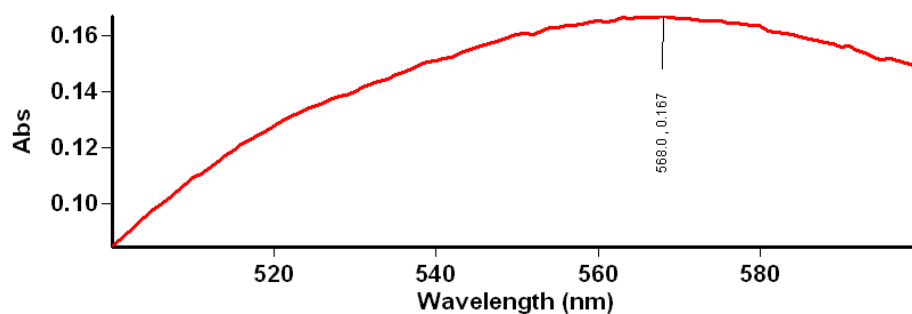
➤ Pembuatan RSB (*Reducing Sample Buffer*)

Larutan stok dibuat dengan menambahkan 4,8 mL akuades pada campuran 1,2 mL 0,5 M tris-HCl pH 6,8, 1 mL gliserol, 2 mL SDS 10%, 0,1% *Bromphenol blue* sebanyak 0,5 mL, dihomogenkan dan disimpan dalam botol gelap. *SDS-reducing buffer* dibuat dengan mencampurkan 475 μ L stok RSB dengan 25 μ L 2-*mercaptoethanol*. *SDS-reducing buffer* ini digunakan dalam keadaan *fresh*.

➤ Larutan destaining

Sebanyak 70 mL metanol ditambahkan dengan 70 mL asam asetat glasial lalu ditera dengan akuades hingga volume total 1 L.

Lampiran 4: Kurva Panjang Gelombang Maksimum Spektrofotometer UV-Vis



Scan Analysis Report

Report Time : Mon 29 Sep 01:18:04 PM 2014
 Method:
 Batch: D:\Zahrotul M\Lamda Maks gelatin 0,75 (29-09-2014).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: Rika

Sample Name: Gelatin

Collection Time 9/29/2014 1:18:59 PM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 600.0nm to 500.0nm

Wavelength (nm)	Abs
568.0	0.167

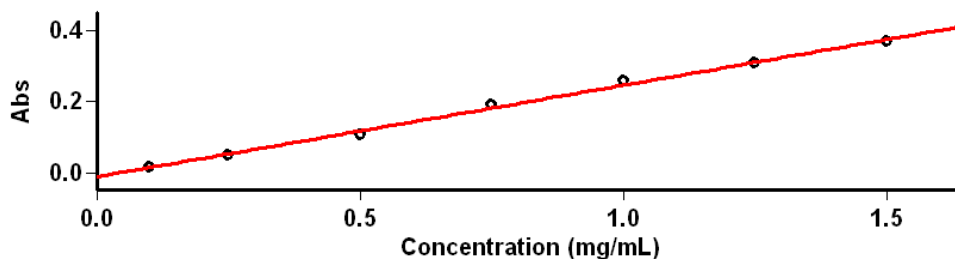
Advanced Reads Report

Report time 11/6/2014 11:46:45 AM
 Method
 Batch name D:\Zahrotul M\Absorbansi Gelatin Sapi C (06-11-2014).BAB
 Application Advanced Reads 3.00(339)
 Operator susi

Instrument Settings

Instrument	Cary 50
Instrument version no.	3.00
Wavelength (nm)	568.0
Ordinate Mode	Abs
Ave Time (sec)	0.1000
Replicates	3
Sample averaging	OFF

Lampiran 5: Kurva standar BSA menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



Concentration Analysis Report

Report time 9/29/2014 1:22:32 PM
 Method
 Batch name D:\Zahrotul M\Kurva standart gelatin (29-09-2014).BCN
 Application Concentration 3.00 (339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 568.0
 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	(0.1415)	568.0

Calibration

Collection time 9/29/2014 1:23:13 PM

Standard	Concentration mg/mL	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1	0.10		0.0180	0.0001	0.40	0.0181
						0.0181
						0.0180
Std 2	0.25		0.0502	0.0002	0.31	0.0503
						0.0501
						0.0500
Std 3	0.50		0.1065	0.0002	0.18	0.1064
						0.1064
						0.1067
Std 4	0.75		0.1916	0.0004	0.20	0.1911
						0.1917
						0.1919
Std 5	1.00		0.2566	0.0002	0.09	0.2569
						0.2564
						0.2566

Std 6					0.3075
					0.3075
	1.25	0.3080	0.0009	0.29	0.3090
Std 7					0.3676
					0.3663
	1.50	0.3667	0.0008	0.23	0.3660

Calibration eqn Abs = 0.25562*Conc -0.00999
Correlation Coefficient 0.99608
Calibration time 9/29/2014 1:28:00 PM

Results Flags Legend

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



Lampiran 6. Hasil analisis spektrofotometer UV-Vis

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi akhir}}{\text{Konsentrasi awal}} \times \text{faktor pengenceran} \times 100 \%$$

Misal:

Kadar protein gelatin sapi standar sebelum presipitasi

- Diketahui:

Persamaan regresi: $y = 0,255x - 0,01$

Absorbansi (y) ulangan₁ = 0,198; Absorbansi (y) ulangan₂ = 0,193

Konsentrasi awal = 15 mg/mL

- Ditanya: kadar protein.....?
- Jawab:

a. Ulangan₁ :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi akhir} &= \frac{0,198 + 0,01}{0,255} \\ &= 0,814 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi akhir}}{\text{Konsentrasi awal}} \times \text{faktor pengenceran} \times 100 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar protein (\%)} &= \frac{0,814 \text{ mg/mL}}{15 \text{ mg/mL}} \times \frac{7,5 \text{ mL}}{0,5 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= 81,412 \% \end{aligned}$$

a. Ulangan₂ :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi sampel} &= \frac{0,193 + 0,01}{0,255} \\ &= 0,796 \end{aligned}$$

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi akhir}}{\text{Konsentrasi awal}} \times \text{faktor pengenceran} \times 100 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar protein (\%)} &= \frac{0,796 \text{ mg/mL}}{15 \text{ mg/mL}} \times \frac{7,5 \text{ mL}}{0,5 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= 79,608 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata - Rata Kadar protein (\%)} &= \frac{U_1 + U_2}{2} = \frac{81,412 \% + 79,608 \%}{2} \\ &= 80,51 \% \end{aligned}$$

No	Sampel	Absorbansi		Konsentrasi protein (mg/mL)		% Kadar protein		Rata-rata % Kadar protein
		1	2	1	2	1	2	
1.	Gelatin Sapi standar	0,198	0,193	0,814	0,796	81,412	79,608	80,51
2.	Gelatin sapi komersial	0,227	0,218	0,929	0,894	71,529	72,941	74,35
3.	Gelatin T1	0,178	0,179	0,737	0,741	73,725	74,118	73,92
4.	Gelatin T2	0,131	0,140	0,553	0,588	83,779	89,127	86,45

➤ **Kadar protein setelah presipitasi etanol**

No	Sampel	Konsentrasi presipitasi etanol (%)	Absorbansi		Konsentrasi protein (mg/mL)		% Kadar protein		Rata-rata % Kadar protein
			1	2	1	2	1	2	
1.	Gelatin Sapi standar	20	0,050	0,058	0,235	0,267	23,5	26,7	25,1
		40	0,172	0,174	0,712	0,722	71,2	72,2	71,7
		60	0,173	0,177	0,717	0,733	71,7	73,3	72,5
		80	0,181	0,188	0,747	0,776	74,7	77,6	76,15
2.	Gelatin Sapi Komersial	20	0,010	0,012	0,078	0,086	7,8	8,6	8,2
		40	0,123	0,137	0,522	0,576	52,2	57,6	54,9
		60	0,159	0,173	0,663	0,718	66,3	71,8	69,05
		80	0,162	0,177	0,675	0,733	67,5	73,3	70,4
3.	Gelatin T1	20	0,032	0,029	0,165	0,153	16,5	15,3	15,9
		40	0,148	0,146	0,620	0,612	62,0	61,2	61,6
		60	0,222	0,218	0,910	0,894	91,0	89,4	90,2
		80	0,224	0,223	0,918	0,914	91,8	91,4	91,6
4.	Gelatin T2	20	0,018	0,015	0,111	0,010	11,1	10,0	10,5
		40	0,061	0,054	0,280	0,251	28,0	25,1	26,55
		60	0,192	0,148	0,793	0,618	79,3	61,8	70,55
		80	0,290	0,205	1,176	0,843	94,1	84,3	89,2

➤ **Kadar protein setelah presipitasi aseton**

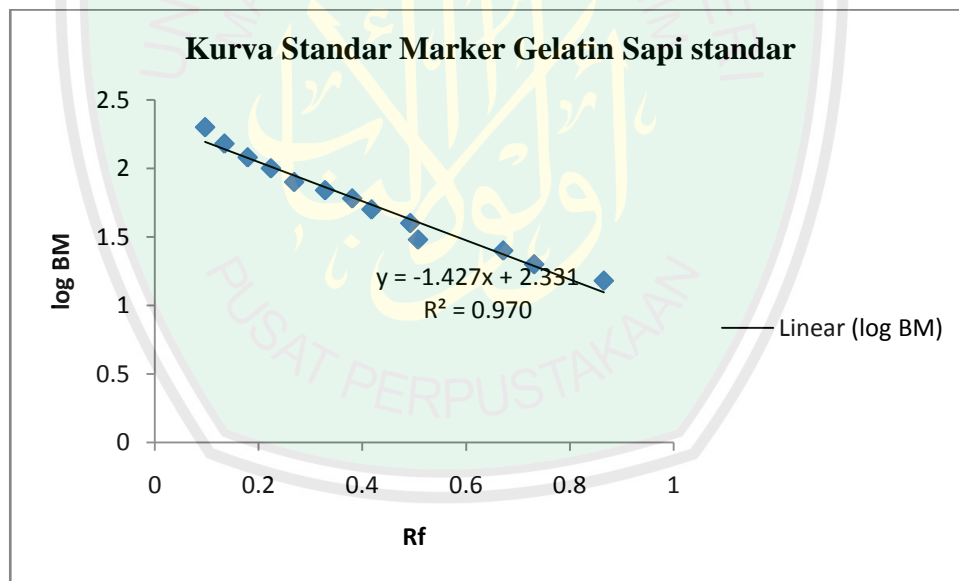
No	Sampel	Konsentrasi presipitasi Aseton (%)	Absorbansi		Konsentrasi protein (mg/mL)		% Kadar protein		Rata-rata % Kadar protein
			1	2	1	2	1	2	
1.	Gelatin Sapi standar	20	0,016	0,026	0,102	0,142	10,2	14,2	12,2
		40	0,041	0,049	0,201	0,231	20,1	23,1	21,6
		60	0,047	0,050	0,222	0,236	22,2	23,6	22,9
		80	0,214	0,205	0,881	0,845	88,1	84,5	86,30
2.	Gelatin Sapi Komersial	20	0,014	0,011	0,094	0,082	9,4	8,2	8,80
		40	0,053	0,043	0,247	0,208	24,7	20,8	22,75
		60	0,140	0,125	0,588	0,529	58,8	52,9	55,85
		80	0,185	0,174	0,765	0,722	76,5	72,2	74,35
3.	Gelatin T1	20	0,020	0,020	0,118	0,118	11,8	11,8	11,80
		40	0,068	0,058	0,306	0,267	30,6	26,7	28,65
		60	0,128	0,123	0,540	0,522	54,0	52,2	53,10
		80	0,195	0,192	0,804	0,792	80,4	79,2	79,80
4.	Gelatin T2	20	0,019	0,017	0,112	0,105	11,2	10,5	10,85
		40	0,023	0,016	0,131	0,102	13,1	10,2	11,65
		60	0,121	0,126	0,513	0,533	51,3	53,3	52,30
		80	0,250	0,178	1,023	0,738	81,8	79,0	80,4

Lampiran 7. Data Hasil SDS-PAGE

- Tabel 1 Marker protein gelatin sapi standar

No.	BM	Log BM	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf
1.	200	2,30	6,7	0,65	0,097
2.	150	2,18	6,7	0,90	0,134
3.	120	2,08	6,7	1,20	0,179
4.	100	2,00	6,7	1,50	0,224
5.	85	1,90	6,7	1,80	0,268
6.	70	1,84	6,7	2,20	0,328
7.	60	1,78	6,7	2,55	0,381
8.	50	1,70	6,7	2,80	0,418
9.	40	1,60	6,7	3,30	0,493
10.	30	1,48	6,7	3,40	0,507
11.	25	1,40	6,7	4,50	0,672
12.	20	1,30	6,7	4,90	0,731
13.	15	1,18	6,7	5,80	0,866

Setelah nilai Rf diketahui didapatkan rumus persamaan regresi linier berikut ini:



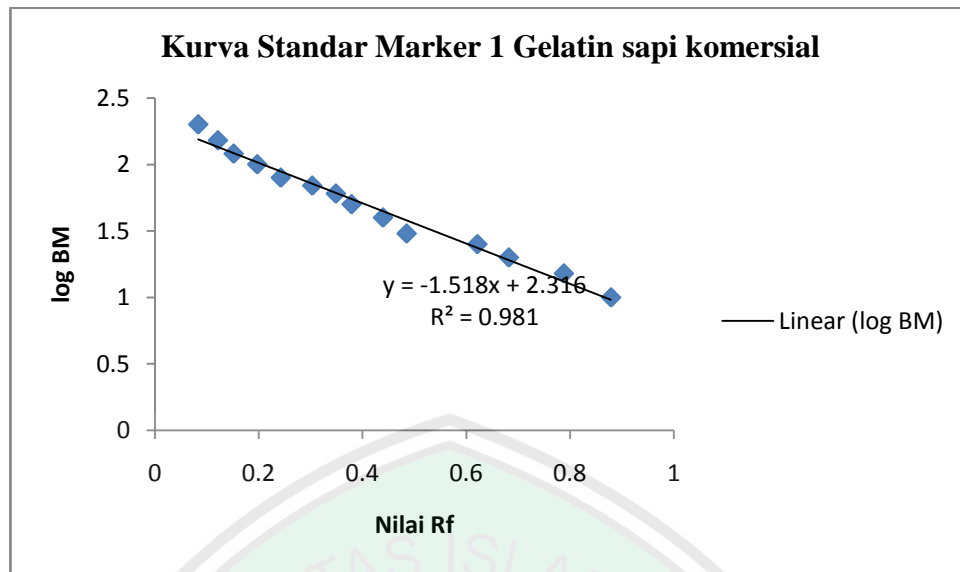
- Tabel 2. Sampel Gelatin Sapi standar

No.	Sampel Gelatin	Pita ke-	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf	Log BM	BM
1.	Ekstrak kasar	1	6,7	1,0	0,150	2,115	130
2.	Aseton 20 %	1	6,7	1,9	0,284	1,925	84
		2	6,7	1,0	0,150	2,115	130
3.	Aseton 40 %	1	6,7	2,5	0,373	1,798	63
		2	6,7	1,9	0,284	1,925	84
		3	6,7	1,0	0,150	2,115	130
4.	Aseton 60 %	1	6,7	1,0	0,150	2,115	130
5.	Aseton 80 %	1	6,7	2,1	0,313	1,883	76
		2	6,7	1,0	0,150	2,115	130
6.	Etanol 20 %	1	6,7	2,5	0,373	1,798	63
		2	6,7	1,0	0,150	2,115	130
7.	Etanol 40 %	0	6,7	-	-	-	-
8.	Etanol 60 %	0	6,7	-	-	-	-
9.	Etanol 80 %	1	6,7	1,0	0,150	2,115	130

- Tabel 3 Marker protein 1 gelatin sapi komersial

No.	BM	Log BM	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf
1.	200	2,30	6,6	0,55	0,083
2.	150	2,18	6,6	0,80	0,121
3.	120	2,08	6,6	1,00	0,152
4.	100	2,00	6,6	1,30	0,197
5.	85	1,90	6,6	1,60	0,242
6.	70	1,84	6,6	2,00	0,303
7.	60	1,78	6,6	2,30	0,348
8.	50	1,70	6,6	2,50	0,379
9.	40	1,60	6,6	2,90	0,439
10.	30	1,48	6,6	3,20	0,485
11.	25	1,40	6,6	4,10	0,621
12.	20	1,30	6,6	4,50	0,682
13.	15	1,18	6,6	5,20	0,788

Setelah nilai Rf diketahui didapatkan rumus persamaan regresi linier berikut ini:



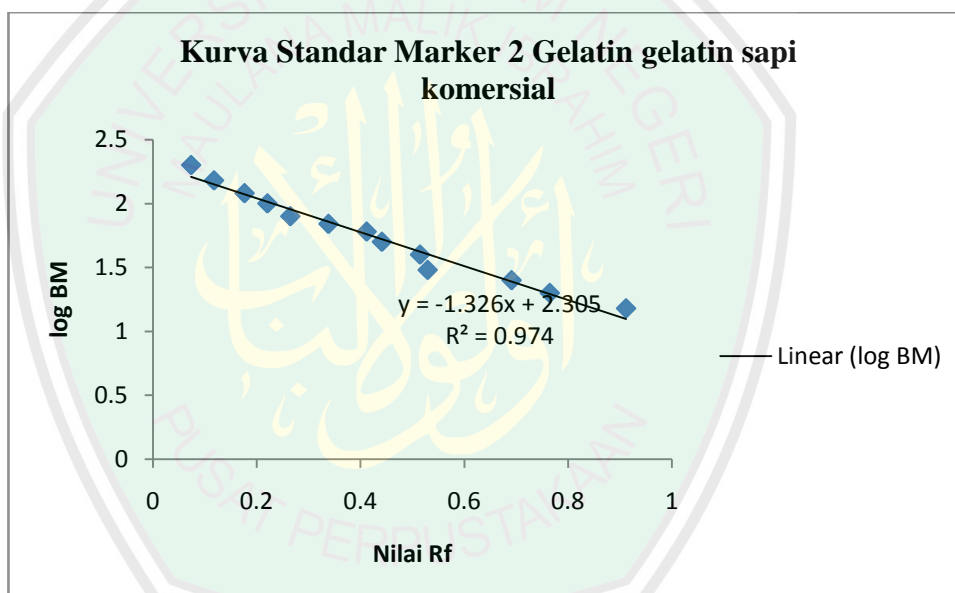
• Tabel 3. Sampel Gelatin Sapi Komersial

No.	Sampel Gelatin	Pita ke-	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf	Log BM	BM
1.	Ekstrak kasar	1	6,6	0,9	0,134	2,113	130
		2	6,6	1,4	0,212	1,994	99
2.	Etanol 20 %	1	6,6	0,9	0,134	2,113	130
3.	Etanol 40 %	1	6,6	0,9	0,134	2,113	130
		2	6,6	1,4	0,212	1,994	99
4.	Etanol 60 %	1	6,6	0,9	0,134	2,113	130
6.	Etanol 80 %	1	6,6	1,8	0,273	1,902	80
		2	6,6	1,4	0,212	1,994	99
		3	6,6	0,9	0,134	2,113	130
7.	Aseton 20 %	1	6,6	1,4	0,212	1,994	99
		2	6,6	1,0	0,149	2,089	123
		3	6,6	0,9	0,134	2,113	130

- Tabel 4 Marker protein 2 gelatin sapi komersial

No.	BM	Log BM	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf
1.	200	2,30	6,8	0,5	0,074
2.	150	2,18	6,8	0,8	0,118
3.	120	2,08	6,8	1,2	0,176
4.	100	2,00	6,8	1,5	0,221
5.	85	1,90	6,8	1,8	0,265
6.	70	1,84	6,8	2,3	0,338
7.	60	1,78	6,8	2,8	0,412
8.	50	1,70	6,8	3,0	0,441
9.	40	1,60	6,8	3,5	0,515
10.	30	1,48	6,8	3,6	0,529
11.	20	1,30	6,8	5,2	0,765

Setelah nilai Rf diketahui didapatkan rumus persamaan regresi linier berikut ini:



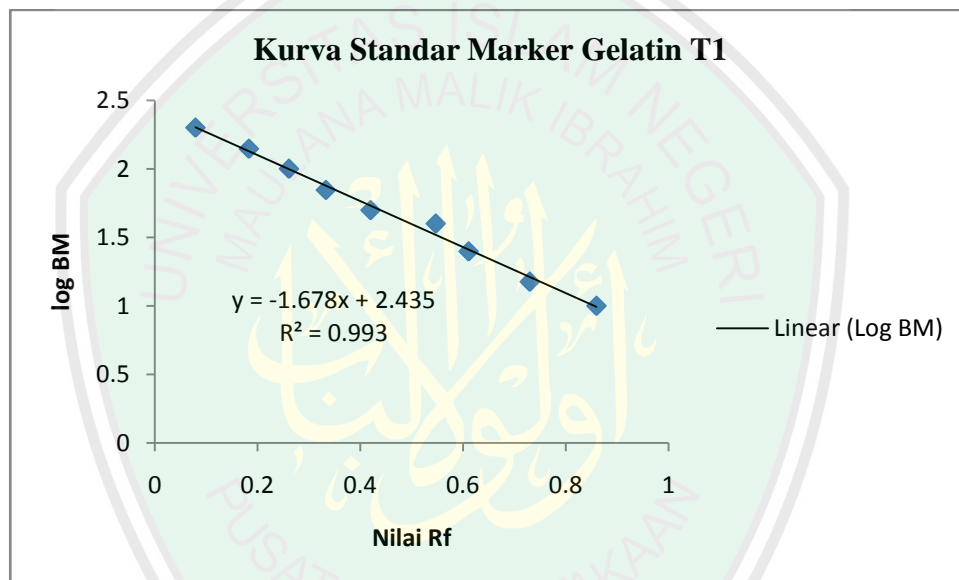
- Tabel 5. Sampel Gelatin sapi komersial

No.	Sampel Gelatin	Pita ke-	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf	Log BM	BM
1.	Aseton 40 %	1	6,8	1,2	0,175	2,074	119
2.	Aseton 60 %	1	6,8	3,5	0,515	1,623	42
3.	Aseton 80 %	1	6,8	4,5	0,662	1,428	27
		2	6,8	3,5	0,515	1,623	42

• Tabel 6 Marker protein gelatin T1

No.	BM	Log BM	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf
1.	200	2,30	6,3	0,50	0.079
2.	150	2,15	6,3	1,15	0.183
3.	100	2,00	6,3	1,65	0.262
4.	70	1,85	6,3	2,10	0.333
5.	50	1,69	6,3	2,65	0.421
6.	40	1,60	6,3	3,45	0.548
7.	25	1,39	6,3	3,85	0.611
8.	15	1,18	6,3	4,60	0.730
9.	10	1,00	6,3	5,40	0.857

Setelah nilai Rf diketahui didapatkan rumus persamaan regresi linier berikut ini:



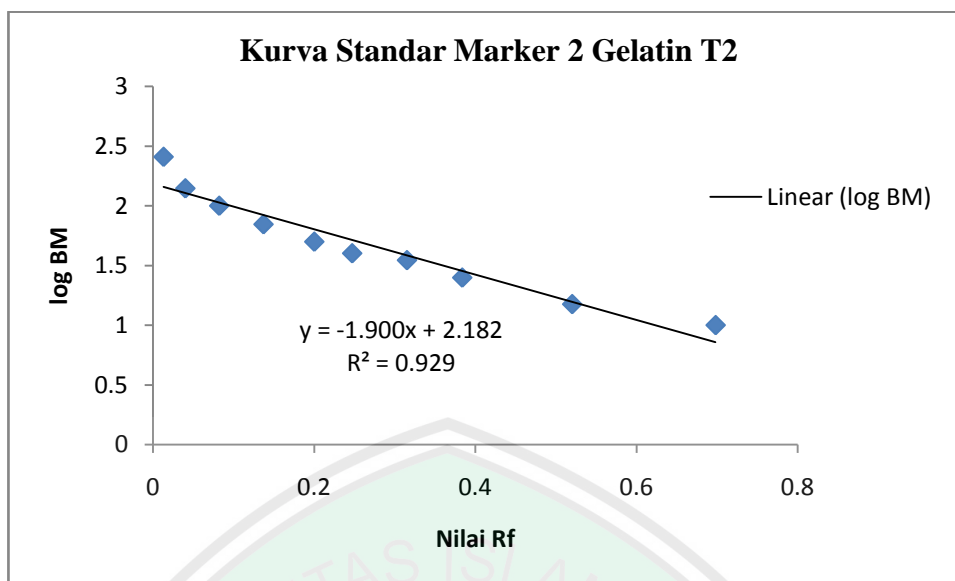
• **Tabel 7. Sampel Gelatin T1**

No.	Sampel Gelatin	Pita ke-	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf	Log BM	BM
1.	Ekstrak kasar	1	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		2	6,3	1,20	0,190	2,115	130
2.	Aseton 20 %	1	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		2	6,3	1,20	0,190	2,115	130
		3	6,3	0,55	0,087	2,289	194
3.	Aseton 40 %	1	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		2	6,3	1,20	0,190	2,115	130
		3	6,3	0,55	0,087	2,289	194
4.	Aseton 60 %	1	6,3	1,50	0,238	2,035	109
		2	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		3	6,3	1,20	0,190	2,115	130
		4	6,3	0,55	0,087	2,289	194
5.	Aseton 80 %	1	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		2	6,3	1,20	0,190	2,115	130
		3	6,3	0,55	0,087	2,289	194
6.	Etanol 20 %	1	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		2	6,3	1,20	0,190	2,115	130
		3	6,3	0,55	0,087	2,289	194
7.	Etanol 40 %	1	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		2	6,3	1,20	0,190	2,115	130
8.	Etanol 60 %	1	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		2	6,3	1,20	0,190	2,115	130
		3	6,3	0,55	0,087	2,289	194
9.	Etanol 80 %	1	6,3	1,50	0,238	2,035	109
		2	6,3	1,30	0,206	2,089	123
		3	6,3	1,20	0,190	2,115	130
		4	6,3	0,55	0,087	2,289	194

• **Tabel 8 Marker protein 1 gelatin T2**

No.	BM	Log BM	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf
1.	260	2,41	7,3	0,15	0,01
2.	140	2,15	7,3	0,3	0,04
3.	100	2,00	7,3	0,6	0,08
4.	70	1,85	7,3	0,9	0,14
5.	50	1,70	7,3	1,45	0,20
6.	40	1,60	7,3	1,8	0,25
7.	35	1,54	7,3	2,3	0,32
8.	25	1,40	7,3	2,8	0,38
9.	15	1,18	7,3	3,8	0,52
10.	10	1,00	7,3	5,2	0,70

Setelah nilai Rf diketahui didapatkan rumus persamaan regresi linier berikut ini:



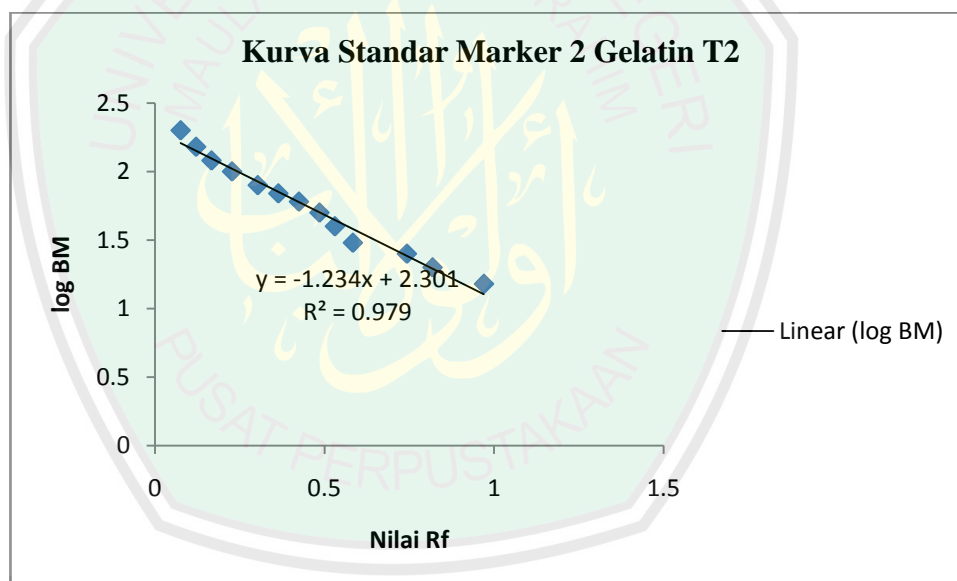
• **Tabel 9. Sampel Gelatin T2**

No.	Sampel Gelatin	Pita ke-	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf	Log BM	BM
1.	Ekstrak kasar	1	7	0,20	0,029	2,061	115
		2	7	0,55	0,079	1,972	94
2.	Aseton 20 %	1	7	0,60	0,086	1,959	91
		2	7	0,35	0,050	2,023	105
		3	7	0,20	0,029	2,061	115
3.	Aseton 40 %	1	7	0,60	0,086	1,959	91
		2	7	0,35	0,050	2,023	105
		3	7	0,20	0,029	2,061	115
4.	Aseton 60 %	1	7	0,20	0,029	2,061	115
5.	Aseton 80 %	1	7	0,35	0,050	2,023	105
		2	7	0,20	0,029	2,061	115
6.	Etanol 20 %	1	7	0,60	0,086	1,959	91
		2	7	0,50	0,071	1,985	97
		3	7	0,35	0,050	2,023	105
		4	7	0,20	0,029	2,061	115
7.	Etanol 40 %	0	7	-	-	-	-

- Tabel 10 Marker protein 2 gelatin T2

No.	BM	Log BM	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf
1.	200	2,30	6,6	0,50	0,076
2.	150	2,18	6,6	0,80	0,121
3.	120	2,08	6,6	1,10	0,167
4.	100	2,00	6,6	1,50	0,227
5.	85	1,90	6,6	2,00	0,303
6.	70	1,84	6,6	2,40	0,364
7.	60	1,78	6,6	2,80	0,424
8.	50	1,70	6,6	3,20	0,485
9.	40	1,60	6,6	3,50	0,530
10.	30	1,48	6,6	3,85	0,583
11.	25	1,40	6,6	4,90	0,742
12.	20	1,30	6,6	5,40	0,818
13.	15	1,18	6,6	6,40	0,969

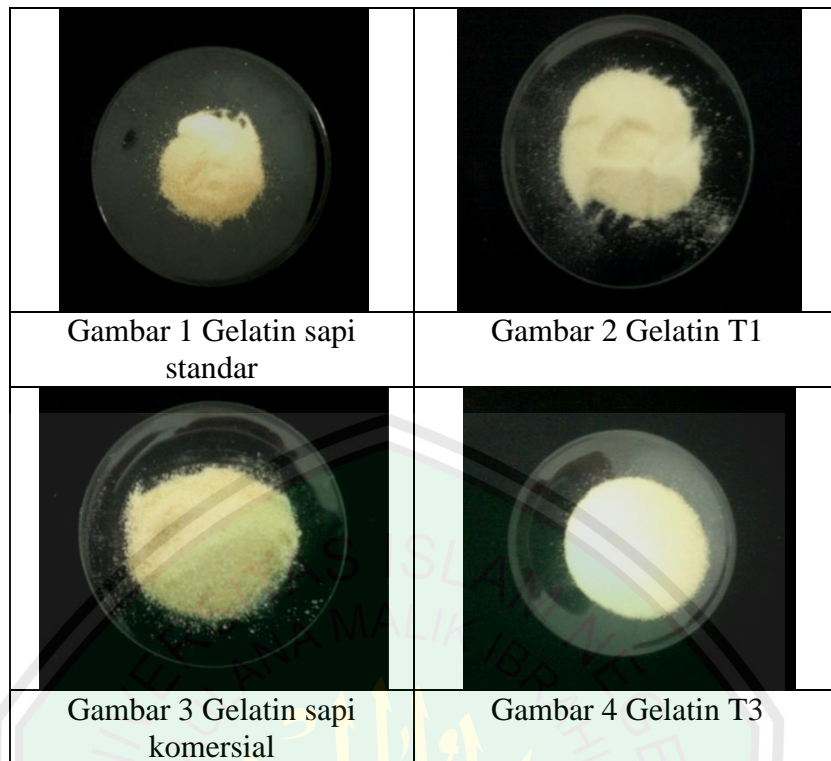
Setelah nilai Rf diketahui didapatkan rumus persamaan regresi linier berikut ini:



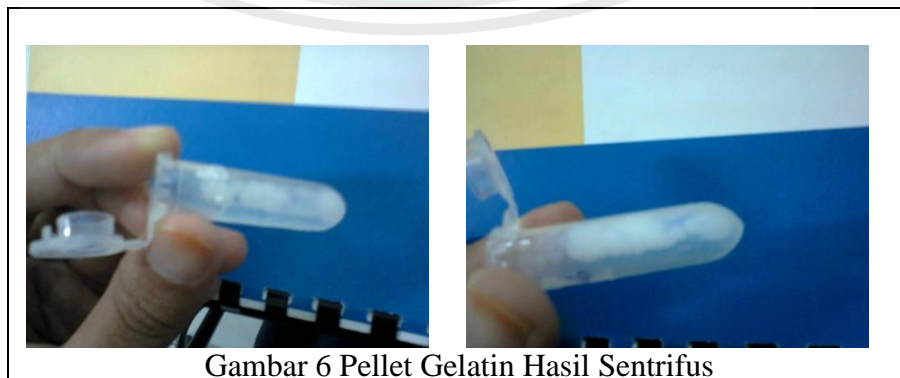
- Tabel 11. Sampel Gelatin T2

No.	Sampel Gelatin	Pita ke-	Panjang gel (cm)	Jarak pita (cm)	Rf	Log BM	BM
1.	Etanol 60 %	1	6,6	1,2	0,182	2,077	119
		2	6,6	1,0	0,152	2,113	130
2.	Etanol 80 %	1	6,6	1,0	0,152	2,113	130

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian



Gambar 5 Larutan gelatin





Gambar 7 Ultra Sentrifus



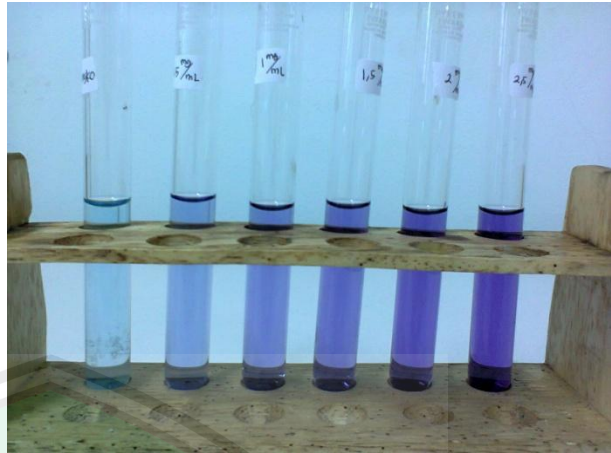
Gambar 8 Mikropipet



Gambar 9 Perangkat Alat Elektrofosis



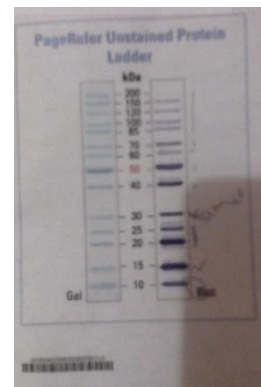
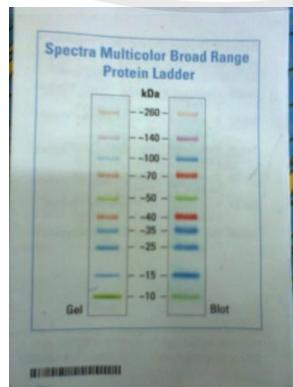
Gambar 10 Reagen Biuret



Gambar 11 Kurva Standar BSA



Gambar 12 Larutan Campuran Sampel dan Reagen Biuret



Gambar 13 Protein marker SDS-PAGE

Lampiran 9. Analisis Data

1. Kadar Protein Gelatin Sapi standar

Tabel data hasil penelitian

Pelarut	Konsentrasi	Ulangan		Total
		U1	U2	
	20	23.5	26.7	50.2
	40	71.5	72.2	143.7
Etanol	60	71.7	73.3	145
	80	74.7	77.6	152.3
	20	10.2	14.2	24.4
Aseton	40	20.1	23.1	43.2
	60	22.2	23.6	45.8
	80	88.1	84.5	172.6
Total		382	395.2	777.2

Tabel dua arah antara pelarut dengan konsentrasi

Pelarut	Konsentrasi				Total
	20	40	60	80	
Etanol	50.2	143.7	145	152.3	491.2
Aseton	24.2	43.2	45.8	172.6	285.8
Total	74.4	186.9	190.8	324.9	777

SPSS Gelatin Sapi standar

Univariate Analysis of Variance Sampel: standar

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Protein

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13117.520 ^a	7	1873.931	486.577	.000
Intercept	37752.490	1	37752.490	9.803E3	.000
Pelarut	2631.690	1	2631.690	683.334	.000
K	7862.865	3	2620.955	680.547	.000
Pelarut * K	2622.965	3	874.322	227.023	.000
Error	30.810	8	3.851		
Total	50900.820	16			
Corrected Total	13148.330	15			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .996)

Sig <0,05, Ho ditolak, terdapat interaksi. Jadi, uji lanjut Duncan

Data

Perlakuan	N	Subset			
		1	2	3	4
Duncan ^a 5	2	12.2000			
6	2		21.6000		
7	2		22.9000		
1	2		25.1000		
2	2			71.8500	
3	2			72.5000	
4	2			76.1500	
8	2				86.3000
Sig.		1.000	.125	.069	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.851.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

2. Kadar Protein Gelatin T1

Tabel data hasil penelitian

Pelarut	Konsentrasi	Ulangan		Total
		U1	U2	
	20	16.5	15.3	31.8
	40	62	61.2	123.2
Etanol	60	91	89.4	180.4
	80	91.8	91.4	183.2
	20	11.8	11.8	23.6
Aseton	40	30.6	26.7	57.3
	60	54	52.2	106.2
	80	80.4	79.2	159.6
Total		438.1	427.2	865.3

Tabel dua arah antara pelarut dengan konsentrasi

Pelarut	Konsentrasi				Total
	20	40	60	80	
Etanol	31.8	123.2	180.4	183.2	518.6
Aseton	23.6	57.3	106.2	159.6	346.7
Total	55.4	180.5	286.6	342.8	865.3

SPSS Gelatin T1

Univariate Analysis of Variance Gelatin T1

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Kadar Protein (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14646.859 ^a	7	2092.408	1.356E3	.000
Intercept	46796.506	1	46796.506	3.033E4	.000
Pelarut	1846.851	1	1846.851	1.197E3	.000
K	12028.697	3	4009.566	2.598E3	.000
Pelarut * K	771.312	3	257.104	166.613	.000
Error	12.345	8	1.543		
Total	61455.710	16			
Corrected Total	14659.204	15			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

Sig <0,05, Ho ditolak, terdapat interaksi. Jadi, uji lanjut Duncan

Data

Perlakuan	N	Subset								
		1	2	3	4	5	6	7		
Duncan ^a	5	2	11.800							
	1	2		15.900						
	6	2			28.650					
	7	2				53.100				
	2	2					61.600			
	8	2						79.800		
	3	2							90.200	
	4	2								91.600
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.292

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.543.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

3. Kadar Protein Gelatin T2

Tabel data hasil penelitian

Pelarut	Konsentrasi	Ulangan		Total
		U1	U2	
	20	7.8	8.6	16.4
	40	52.2	57.6	109.8
Etanol	60	66.3	71.8	138.1
	80	67.5	73.3	140.8
	20	9.4	8.2	17.6
Aseton	40	24.7	20.8	45.5
	60	58.8	52.9	111.7
	80	76.5	72.2	148.7
		363.2	365.4	728.6

Tabel dua arah antara pelarut dengan konsentrasi

Pelarut	Konsentrasi				Total
	20	40	60	80	
Etanol	16.4	109.8	138.1	140.8	405.1
Aseton	17.6	45.5	111.7	148.7	323.5
Total	34	155.3	249.8	289.5	

SPSS Gelatin Sapi Komersial

Univariate Analysis of Variance Gelatin Sapi Komersial

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Kadar Protein (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10916.298 ^a	7	1559.471	152.478	.000
Intercept	33178.622	1	33178.622	3.244E3	.000
Pelrut	416.160	1	416.160	40.690	.000
K	9692.472	3	3230.824	315.896	.000
Pelrut * K	807.665	3	269.222	26.323	.000
Error	81.820	8	10.227		
Total	44176.740	16			
Corrected Total	10998.118	15			

a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .986)

Sig <0,05, Ho ditolak, terdapat interaksi. Jadi, uji lanjut Duncan

Data

Duncan

Perlakuan	N	Subset			
		1	2	3	4
1	2	8.200			
5	2	8.800			
6	2		22.750		
2	2			54.900	
7	2			55.850	
3	2				69.050
4	2				70.400
8	2				74.350
Sig.		.856	1.000	.774	.151

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 10.228.

4. Gelatin T2

Tabel data hasil penelitian

Pelarut	Konsentrasi	Ulangan		Total
		U1	U2	
	20	11.1	10	21.1
	40	28	25.1	53.1
Etanol	60	79.3	61.8	141.1
	80	94.1	84.3	178.4
	20	11.2	10.5	21.7
Aseton	40	13.1	10.2	23.3
	60	51.3	53.3	104.6
	80	81.8	79	160.8
		369.9	334.2	704.1

Tabel dua arah antara pelarut dengan konsentrasi

Pelarut	Konsentrasi (%)				Total
	20	40	60	80	
Etanol	21.1	53.1	141.1	178.4	393.7
Aseton	21.7	23.3	104.6	160.8	310.4
Total	42.8	76.4	245.7	339.2	

SPSS Gelatin T2

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	10916.298 ^a	7	1559.471	152.478	.000
Intercept	33178.622	1	33178.622	3.244E3	.000
Pelarut	416.160	1	416.160	40.690	.000
K	9692.472	3	3230.824	315.896	.000
Pelarut * K	807.665	3	269.222	26.323	.000
Error	81.820	8	10.227		
Total	44176.740	16			
Corrected Total	10998.118	15			

a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .986)

Sig <0,05, Ho ditolak, terdapat interaksi. Jadi, uji lanjut Duncan

Data

Duncan

Perlakuan	N	Subset				
		1	2	3	4	5
1	2	10.550				
5	2	10.850				
6	2	11.650				
2	2		26.550			
7	2			52.300		
3	2				70.550	
8	2				80.400	80.400
4	2					89.200
Sig.		.844	1.000	1.000	.095	.129

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 27.041.

