

**PENGENDAPAN ALBUMIN IKAN GABUS
(*Ophiocephalus striatus*) DENGAN AMMONIUM SULFAT**

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**

Oleh :
DWI ARISANTI
0210830025

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN
MALANG
2007**

**PENGENDAPAN ALBUMIN IKAN GABUS
(*Ophiocephalus striatus*) DENGAN AMMONIUM SULFAT**

Penyusunan Skripsi sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan
Universitas Brawijaya

Oleh :

DWI ARISANTI
0210830025

DOSEN PENGUJI I

(Prof.DR.Ir.EDDY SUPRAYITNO, MS)

TANGGAL :

DOSEN PENGUJI II

(Ir. BAMBANG BUDI SASMITO, MS)

TANGGAL:

MENYETUJUI,

DOSEN PEMBIMBING I

(Ir, TITIK DWI SULISTYATI, MP)

TANGGAL :

DOSEN PEMBIMBING II

(Ir. SRI DAYUTI)

TANGGAL :

**MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN**

(Ir. MAHENO SRI WIDODO, MS)

TANGGAL:

KOMISI PENGUJI
No. 538 / J.I.27 / PP / 2007

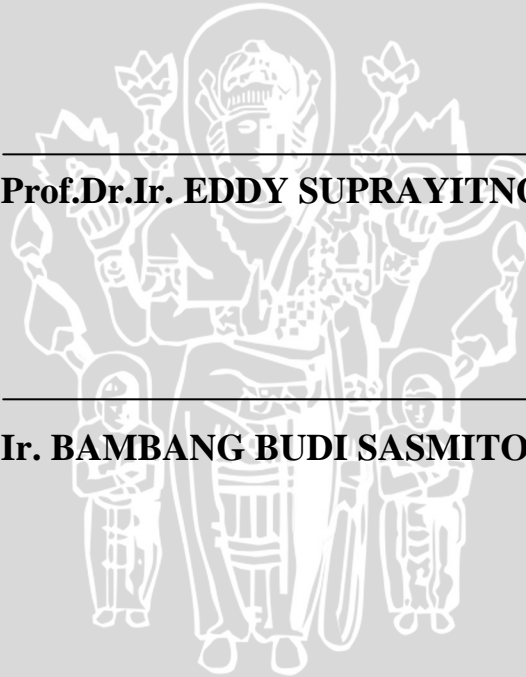
KETUA : Ir. TITIK DWI SULISTIYATI, MP

SEKRETARIS : Ir. SRI DAYUTI

ANGGOTA I : Prof.Dr.Ir. EDDY SUPRAYITNO, MS

ANGGOTA II : Ir. BAMBANG BUDI SASMITO, MS

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



RINGKASAN

DWI ARISANTI. Pengendapan Albumin Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*) Dengan Ammonium Sulfat, di bawah bimbingan Ir. TITIK DWI SULISTIYATI, MP dan Ir. SRI DAYUTI

Albumin berperan penting dalam proses penyembuhan luka. Dalam darah albumin berfungsi membawa banyak senyawa dalam darah seperti bilirubin, kalsium, dan obat-obatan. Selama ini albumin serum dihasilkan dari darah manusia, sehingga harganya cukup mahal. Alternatif pengganti serum albumin tersebut adalah albumin ikan gabus, namun albumin yang dihasilkan masih berupa albumin kasar. Salah satu cara untuk memperoleh albumin murni adalah menggunakan metode pengendapan dengan penambahan ammonium sulfat. Untuk itu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pH ammonium sulfat pada proses pengendapan terhadap rendemen dan kadar albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*).

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2007 sampai Mei 2007 di laboratorium Nutrisi Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomolekuler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Klinik Pattimura Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pH Ammonium sulfat yang berbeda terhadap rendemen dan kadar albumin. Serta mengetahui pH optimum dalam proses pengendapan albumin.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dan rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SX 35 dan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Perlakuan yang digunakan adalah pH ammonium sulfat pada proses pengendapan albumin ikan gabus. Ammonium sulfat yang digunakan meliputi pH 4; 4,5; 5; 5,5; dan 6. Parameter yang digunakan meliputi rendemen, kadar protein, kadar albumin, elektroforesis dan profil asam amino.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan ammonium sulfat pH 5 merupakan perlakuan terbaik yaitu dengan kadar protein sebesar 1,17 g/dl; kadar albumin sebesar 0,86 g/dl dan rendemen sebesar 46%. Perlakuan pH 5 ammonium sulfat merupakan pH optimal untuk pengendapan albumin. Penambahan ammonium sulfat berpengaruh nyata terhadap kadar albumin endapan. Penambahan ammonium sulfat tidak memberi pengaruh nyata terhadap rendemen dan kadar protein endapan dan supernatan.

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan metode pemurnian albumin yang lain untuk mendapatkan albumin dengan rendemen dan kadar terbaik serta mampu mengendapkan albumin secara maksimal.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul “PENGENDAPAN ALBUMIN ALBUMIN IKAN GABUS (*Ophiocephalus striatus*) DENGAN AMMONIUM SULFAT”. Penyusunan skripsi merupakan salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang.

Sebelumnya penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

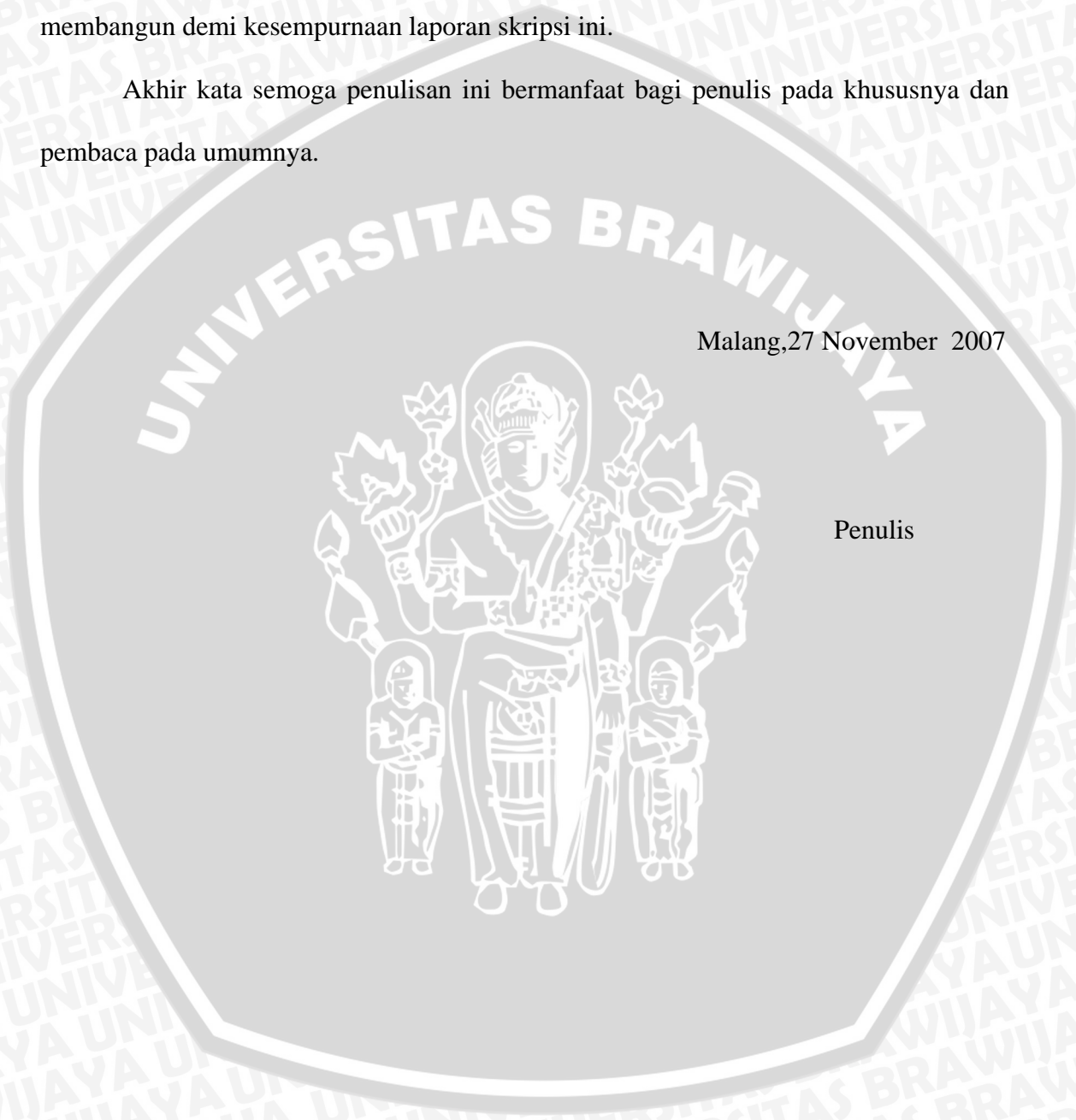
1. Ibu Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP : selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak memberikan masukan dan bimbingan dalam penyusunan laporan skripsi ini,
2. Ibu Ir. Sri Dayuti : : selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak memberikan masukan dan bimbingan dalam penyusunan laporan skripsi ini,
3. Team, atas bantuan dan kerjasamanya selama penelitian
4. Bapak Nurhadi : selaku penyedia ikan gabus yang digunakan dalam penelitian
5. Bapak Totok : selaku pemilik Bengkel Lintangtama pembuat alat ekstraktor vakum yang digunakan pada penelitian ini
6. Ibu DR.Sri Widyarti, MSi, selaku Ketua Laboratorium Biomolekuler Fakultas MIPA
7. Ika Yunita Kusumawardhani, S.Si, selaku laboran biomolekuler FMIPA atas bantuannya selama penelitian ini
8. Serta semua pihak yang telah membantu hingga terselesainya penyusunan laporan skripsi ini.

Seperti pepatah tak ada gading yang tak retak. Demikian pula dalam penyusunan laporan skripsi ini, penulis mengharapkan adanya masukan, saran, dan kritik yang membangun demi kesempurnaan laporan skripsi ini.

Akhir kata semoga penulisan ini bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan pembaca pada umumnya.

Malang, 27 November 2007

Penulis



LEMBAR PERSEMBAHAN

Puji syukur aku panjatkan pada Allah SWT atas semua rahmat dan hidayah-Nya. Makasi buat Ibu dan Bapak yang *ngga* pernah berhenti memberi dukungan dan doa buat aku. Makasi buat adekku Tia untuk sms-sms yang selalu bikin aku ketawa, untuk suara ceriamu dan untuk doanya, I luv u sist...☺

Makasi buat /Rif, yang sabar banget temenin aku, anterin kemana ja aku pergi, makasi dah ingetin aku disaat mulai belanja *ngga* penting, hehee..., makasi dah setia disampingku sampe sekarang, dan buat semua yang arip kasih ke aku, semangat serta dukungannya juga, thanks arip.. ☺

Makasiiii poool buat temen-temen yang dah bantuin aku.. Nopi, thanks prend dah ngajarin ngolah data dan temenin belanja, hehee.. Yunita, suwun Yun buat semuanya..”☺ Trus Cici, makasi lah dah ngawani aku k jogja ? kada da ikam, kada selese skripsiku ni.. Buat Dini, Fia, Inna, Siska, Elly, Keken, Vika, Botak “Ali”, Vita, Andre, Angga, Ima dan semua temen-temen THP’02 yang *ngga* bisa kusebut satu per satu, thanks guys....

Buat Bu Titik dan Bu Sri Dayuti, terimakasih atas bimbingannya. *Ngga* lupa juga, makasi buat anak-anak Kavila 27c.. m’Liest, hindi, umi, m’ Luluk, sari, Heni , aci, m’Nana, , pokeran lagi yukk...! buat m’ Nilda n m’Tanti yang dah pulang kampung juga makasi atas supportnya selama ini..

Dan semua pihak yang telah bantu aku selama ini, maaf bila belum disebutkan namanya...,tanpa bantunya skripsi ini *ngga* akan selese. Terimakasih banyak...



DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Persetujuan.....	i
Ringkasan.....	ii
Kata Pengantar.....	iii
Daftar Isi.....	vi
Daftar Tabel	viii
Daftar Gambar	ix
Daftar Lampiran	xi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.5. Hipotesis	4
1.6. Tempat dan Waktu	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Ikan Gabus.....	5
2.2. Protein.....	7
2.3. Albumin	11
2.4. Fungsi Albumin	15
2.5. Metode Pemisahan Protein.....	15
2.6. Pengendapan Albumin.....	19
2.7. Ammonium Sulfat	20
2.8. Alat Ekstraktor Vakum.....	22
BAB 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	23
3.1. Materi Penelitian	23
3.1.1. Bahan Penelitian.....	23
3.1.2. Peralatan Penelitian	23
3.2. Metode Penelitian.....	24
3.2.1. Metode.....	24
3.2.2. Variabel	27
3.3. Analisis Data	28

3.4. Prosedur Kerja.....	29
3.4.1. Prosedur Pembuatan <i>Crude</i> Albumin.....	29
3.4.2. Prosedur Pengendapan Albumin.....	32
3.5. Parameter Uji.....	34
3.5.1. Rendemen.....	34
3.5.2. Kadar Albumin.....	34
3.5.3. Kadar Protein.....	36
3.5.4. Penentuan Perlakuan Terbaik.....	38
3.5.5. Asam Amino.....	39
3.5.6. Spektrofotometer UV.....	41
3.5.7. Elektroforesis.....	44
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	48
4.1. Data Hasil Penelitian.....	48
4.2. Rendemen.....	48
4.2.1. Rendemen Endapan.....	48
4.2.2. Rendemen Supernatan.....	50
4.3. Kadar Albumin.....	52
4.3.1. Kadar Albumin Endapan.....	52
4.3.2. Kadar Albumin Supernatan.....	55
4.4. Kadar Protein.....	57
4.4.1. Kadar Protein Endapan.....	57
4.4.2. Kadar Protein Supernatan.....	59
4.5. Perlakuan Terbaik.....	61
4.6. Profil Asam Amino.....	62
4.7. Spektrofotometer.....	65
4.8. Elektroforesis.....	66
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	70
5.1. Kesimpulan.....	70
5.2. Saran.....	70
DAFTAR PUSTAKA.....	71
LAMPIRAN.....	75

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Asam Amino Albumin Ikan Gabus dan Serum Albumin	12
2. Komposisi Asam Amino Albumin Ikan Gabus.....	14
3. Rancangan Percobaan.....	28
4. Data Rerata Hasil Penelitian.....	48
5. Notasi Rerata Rendemen Endapan	50
6. Notasi Rerata Rendemen Supernatan	52
7. Notasi Rerata Albumin Endapan	54
8. Notasi Rerata Albumin Supernatan	57
9. Notasi Rerata Protein Endapan.....	59
10. Notasi Rerata Protein Supernatan.....	61
11. Kandungan Asam Amino Albumin Ikan Gabus Endapan.....	63
12. Pembacaan Kromatografi Albumin Endapan.....	64
13. Identifikasi Jenis Protein Endapan	68
14. Identifikasi Jenis Protein Supernatan	68



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Gabus.....	6
2. Struktur Albumin.....	11
3. Model Molekul Struktur Albumin Daging Mamalia (Sapi).....	12
4. Rangkaian Rumus Asam Amino Penyusun Albumin	13
5. Hasil Ekstraksi Albumin Ikan Gabus dengan Alat Ekstraktor Vakum	25
6. Sampel Hasil Sentrifuse	26
7. Endapan setelah diberi Buffer Phospat.....	27
8. Alat Ekstraksi Vakum.....	29
9. Diagram Alir Proses Ekstraksi Albumin dengan Ekstraktor Vakum	31
10. Diagram Alir Proses Pengendapan Albumin.....	33
11. Diagram Alir Analisa Kadar Albumin dengan Metode Brom Cresol Green	35
12. Diagram Alir Analisa Kadar Protein dengan Metode Biuret	37
13. Diagram Alir Analisa Asam Amino Metode HPLC.....	40
14. Kurva Standar Kadar Protein.....	42
15. Diagram Alir Analisa Kadar Protein dengan Spektrofotometri	43
16. Diagram Alir Persiapan Gel	45
17. Diagram Alir Injeksi Sampel.....	46
18. Diagram Alir Running Sampel.....	46
19. Diagram Alir Proses Pewarnaan Gel.....	47
20. Rerata Rendemen Endapan.....	49
21. Rerata Rendemen Supernatan.....	51
22. Rerata Albumin Endapan	53
23. Grafik Hubungan pH dan Kadar Albumin Pellet	55
24. Rerata Albumin Supernatan	56
25. Rerata Protein Endapan	58
26. Rerata Protein Supernatan	60

27. Kromatogram Asam Amino Albumin Endapan64

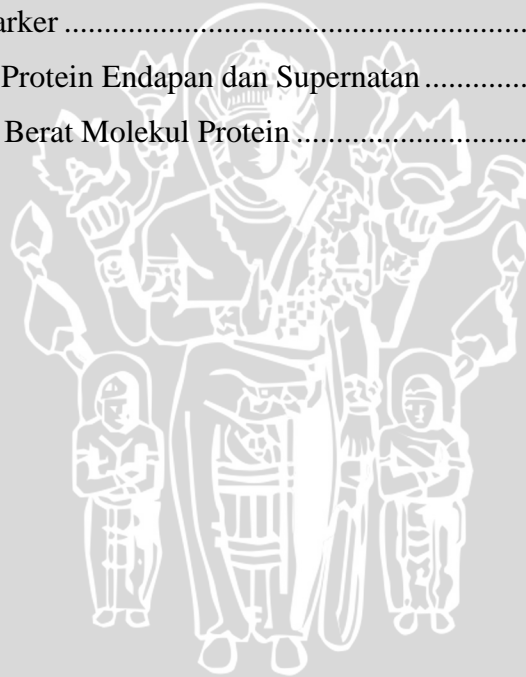
28. Alat Spektrofotometer Thermospektronik Genesis 10 UV65

29. Elektroforegram Protein Endapan dan Supernatan67



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Rendemen Endapan.....	75
2. Perhitungan Rendemen Supernatan.....	77
3. Perhitungan Kadar Albumin Endapan.....	79
4. Perhitungan Kadar Albumin Supernatan.....	81
5. Perhitungan Kadar Protein Endapan	83
6. Perhitungan Kadar Protein Supernatan	85
7. Data Perhitungan Perlakuan Terbaik.....	87
8. Data Jenis Protein Marker	89
9. Data Pergerakan Pita Protein Endapan dan Supernatan.....	91
10. Contoh Perhitungan Berat Molekul Protein.....	92



1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Albumin adalah protein plasma terbesar. Albumin berperan penting dalam proses penyembuhan luka. Dalam darah albumin berfungsi membawa banyak molekul dalam darah seperti bilirubin, kalsium, dan obat-obatan (Anonymous, 2005). Harga serum albumin yang relatif mahal mendorong manusia untuk mencari alternatif yang lebih murah. Pilihan awal jatuh pada albumin putih telur namun albumin ini mempunyai dampak kurang baik pada kesehatan berkaitan dengan kandungan kolesterol yang terdapat di dalamnya. Albumin ikan gabus kemudian dijadikan alternatif penggantinya. Ikan gabus mengandung semua asam amino esensial dan asam lemak yang mampu mempercepat penyembuhan luka (Anonymous, 2003).

Metode sederhana yang digunakan untuk menghasilkan albumin adalah dengan cara pengukusan. Kelemahannya, pengukusan memerlukan suhu tinggi ($>70^{\circ}\text{C}$) dan waktu yang lama dalam menghasilkan albumin. Penelitian menggunakan metode Brody (1965) membutuhkan lama pemanasan ± 1 jam. Perlakuan suhu dan lama pengukusan yang berbeda memberi pengaruh sangat nyata terhadap rendemen dan kadar albumin filtrat ikan Gabus dalam bentuk serbuk (Sugiono 2002). Albumin merupakan plasma protein yang memiliki sifat larut air, akan tetapi pemanasan pada suhu 50°C - 70°C mulai menunjukkan penurunan daya kelarutannya (Foegeding *et al*, 1986).

Agar dapat menghasilkan albumin yang baik diperlukan alat ekstraksi yang menggunakan suhu rendah ($< 70^{\circ}\text{C}$) dan pompa vakum tekanan dibawah 1 atmosfer.

Pompa vakum adalah peralatan yang bekerja dengan tekanan di dalam peralatan kurang dari 1 atmosfer absolut (Anonymous, 1979). Tekanan rendah dalam ekstraktor diharapkan dapat tercapai suhu pemanasan optimal dalam waktu lebih singkat, sehingga kerusakan albumin dapat dihindari. Menurut Apriantono (2002), protein pangan terdenaturasi jika dipanaskan pada suhu 60°-90°C selama satu jam atau kurang

Albumin yang dihasilkan melalui proses ekstraksi masih berupa albumin kasar. Untuk itu diperlukan adanya proses pemisahan protein yang dapat memisahkan protein berdasarkan kelarutannya. Yaitu dengan memakai zat pelarut, seperti ammonium sulfat, natrium sulfat, dan magnesiumsulfat (Kusnawijaya, 1983).

Ammonium sulfat dipakai untuk memisahkan albumin dari globulin dalam darah, albumin akan mengendap pada konsentrasi jenuh dan globulin akan terlarut sebagai cairan supernatan (Widyarti, 2000). Proses penambahan garam ammonium sulfat jenuh disebut salting out. Proses ini sangat dipengaruhi oleh konsentrasi dan pH larutan dimana albumin akan mengalami pengendapan pada titik isoelektriknya. Titik isoelektrik albumin bervariasi antara 4,6-4,9 tergantung spesies albumin tersebut (deMan, 1989). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan pH ammonium sulfat yang berbeda pada proses pengendapan albumin terhadap rendemen dan kadar albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*).

1.2 Perumusan Masalah

Albumin berperan penting dalam proses penyembuhan luka, namun harga jual albumin yang beredar di pasaran masih terlalu tinggi. Penemuan ekstrak albumin ikan gabus kemudian dijadikan alternatif untuk mendapatkan albumin yang lebih murah. Ekstrak albumin ikan gabus pada awalnya dihasilkan melalui proses pengukusan

dengan suhu tinggi dan waktu yang lama. Suhu yang tinggi dapat merusak albumin, untuk itu dilakukan ekstraksi albumin ikan gabus dengan menggunakan ekstraktor vakum. Karena suhu yang digunakan rendah penggunaan ekstraktor vakum diharapkan dapat mengurangi kerusakan albumin. Namun albumin ikan gabus yang dihasilkan masih berupa albumin kasar, untuk itu diperlukan adanya metode pengendapan albumin. Pengendapan albumin dengan penambahan ammonium sulfat dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah pH ammonium sulfat. Pengaturan pH didasarkan pada besar titik isoelektrik yang berbeda untuk tiap macam proteinnya (Wirahadikusumah, 1989). Titik isoelektrik albumin berkisar antara 4,6-4,9 tergantung jenis spesiesnya (deMan, 1989).

Albumin dan jenis protein lain yang masih terkandung dalam albumin kasar dipisahkan dengan metode pengendapan berdasarkan kelarutan jenis-jenis protein itu sendiri. Albumin bersifat larut air dan dapat diendapkan dengan pengaturan pH ammonium sulfat sampai mencapai titik isoelektriknya yaitu sebesar 4,8 untuk Human Serum Albumin (Kusnawijaya, 1981).

Berdasarkan uraian diatas, permasalahan yang dapat diambil pada penelitian ini adalah:

1. Apakah pH ammonium sulfat pada proses pengendapan berpengaruh terhadap rendemen dan kadar albumin ikan gabus?
2. Berapa pH optimum ammonium sulfat pada proses pengendapan albumin ikan gabus yang menghasilkan rendemen dan kadar albumin terbaik ?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui pengaruh pH Ammonium sulfat yang berbeda terhadap rendemen dan kadar albumin
2. Mengetahui pH optimum dalam proses pengendapan albumin.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan mengenai pengaruh pH ammonium sulfat pada proses pengendapan terhadap rendemen dan kadar albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*).

1.5 Hipotesis

Hipotesa dari penelitian ini adalah:

1. Diduga pH ammonium sulfat berpengaruh terhadap rendemen dan kadar albumin
2. Diduga pH 5 merupakan pH optimal pada pengendapan albumin untuk menghasilkan rendemen dan kadar albumin terbaik

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2007 sampai Mei 2007 di laboratorium Nutrisi Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomolekuler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Klinik Pattimura Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Gabus

Ikan gabus adalah sejenis ikan buas yang hidup di air tawar. Ikan ini dikenal dengan banyak nama di pelbagai daerah: *aruan*, *haruan* (Mly.), *kocolan* (Btw.), *bayong*, *bogo*, *licingan* (Bms.), *kutuk* (Jw.), dan lain-lain. Dalam bahasa Inggris juga disebut dengan berbagai nama seperti *common snakehead*, *snakehead murrel*, *chevron snakehead*, *striped snakehead* dan juga *aruan*. Nama ilmiahnya adalah *Ophiocephalus striatus* (Anonymous, 2006^b).

Ikan gabus merupakan ikan darat yang cukup besar ukurannya, dapat tumbuh hingga mencapai panjang 1 m. Berkepala besar agak gepeng mirip kepala ular (sehingga dinamai *snakehead*), dengan sisik-sisik besar di atas kepala. Tubuh bulat gilig memanjang, seperti peluru kendali. Sisi atas tubuh dari kepala hingga ke ekor berwarna gelap, hitam kecoklatan atau kehijauan. Sisi bawah tubuh putih, mulai dagu ke belakang. Sisi samping bercoret-coret tebal (*striata*, bercoret-coret) yang agak kabur. Warna ini seringkali menyerupai lingkungan sekitarnya. Mulut besar, dengan gigi-gigi besar dan tajam (Anonymous, 2006^a)

Sejak dahulu ikan gabus dipercaya dapat mempercepat proses penyembuhan luka sehingga dianjurkan untuk dikonsumsi pasien pasca operasi dan ibu-ibu sehabis melahirkan, hal ini dikarenakan ikan gabus mengandung protein yang tinggi, sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Bahkan di Malaysia, bahan dari ekstrak ikan gabus sekarang telah tersedia dalam bentuk krim dan tablet (Makmur, 2006).

Adapun klasifikasi ikan Gabus menurut Saanin (1968) sebagai berikut :

- Phylum : Chordata
Kelas : Pisces
Sub kelas : Teleostei
Ordo : Ophiocephaliformes
Famili : Ophiocephalidae
Genus : Ophiocephalus
Spesies : *Ophiocephalus striatus*

Gambar ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) disajikan pada Gambar 1, sebagai berikut:



Gambar 1. Ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*)

Komposisi kimia ikan gabus merupakan bahan yang secara kimia sebagian besar tersusun oleh unsur-unsur organik yaitu oksigen 75 %, hidrogen 10 %, karbon 9,5% dan nitrogen 2,5 %. Komposisi kimia ikan gabus segar dalam 100 g bahan adalah air 69 g, protein 25,2 g, lemak 1,2 g, kalsium 62 mg, fosfor 176 mg, besi 0,9 mg dan energi 74 kalori (Poedjiadi, 1994).

2.2 Protein

Protein merupakan suatu zat makanan yang amat penting bagi tubuh, karena zat ini disamping berfungsi sebagai bahan bakar tubuh juga berfungsi sebagai zat pembangun dan pengatur (Winarno, 2002).

Protein diklasifikasikan berdasarkan pada fungsi biologis menurut Wirahadikusumah (1989) sebagai berikut:

1. Enzim

Enzim merupakan golongan protein yang terbesar dan paling penting. Molekul enzim biasanya berbentuk bulat (globular), sebagian terdiri atas satu rantai polipeptida dan sebagian lain terdiri lebih dari satu polipeptida. Contoh enzim : sitokrom, berperan dalam proses pemindahan elektron; tripsin, katalisator pemutus ikatan peptida tertentu dalam polipeptida.

2. Protein pembangun

Protein pembangun berfungsi sebagai unsur pembentuk struktur. Beberapa contoh misalnya: protein pembungkus virus; glikoprotein, merupakan penunjang struktur dinding sel; struktur membran, merupakan protein komponen membran sel; elastin, terdapat pada jaringan penyambung yang elastis; kolagen, merupakan serabut dalam jaringan penyambung.

3. Protein kontraktile

Protein kontraktile merupakan golongan protein yang berperan dalam proses gerak. Sebagai contoh misalnya: myosin, merupakan unsur gerak filamen tak bergerak dalam

myofibril; aktin, merupakan unsur filamen yang bergerak dalam myofibril; dinen, terdapat dalam rambut getar dan flagel (bulu cambuk).

4. Protein pengangkut

Protein pengangkut mempunyai kemampuan mengikat molekul tertentu dan melakukan pengangkutan berbagai macam zat melalui darah. Sebagai contoh misalnya: hemoglobin, terdiri atas gugus senyawa heme yang mengandung besi terikat pada protein globin, berfungsi sebagai alat pengangkut oksigen dalam darah vertebrata; hemosianin, berfungsi sebagai alat pengangkut oksigen dalam darah beberapa invertebrate; mioglobin, sebagai alat pengangkut oksigen dalam jaringan otot; serum albumin, sebagai alat pengangkut asam lemak dalam darah.

5. Protein hormon

Seperti enzim, hormon juga termasuk protein yang aktif. Sebagai contoh misalnya, insulin, berfungsi mengatur metabolisme glukosa; hormon pertumbuhan, berperan menstimulasi pertumbuhan tulang.

6. Protein bersifat racun

Beberapa protein yang bersifat racun terhadap hewan kelas tinggi yaitu misalnya: racun dari *Clostridium botulinum*, menyebabkan keracunan bahan makanan.

7. Protein pelindung

Golongan protein pelindung umumnya terdapat dalam darah vertebrata. Sebagai contoh misalnya: antibodi merupakan protein yang hanya dibentuk jala ada antigen dan dengan antigen yang merupakan protein asing, dapat membentuk senyawa kompleks;

fibrinogen, merupakan sumber pembentuk fibrin dalam proses pembekuan darah; trombin, merupakan komponen dalam mekanisme pembekuan darah.

8. Protein cadangan

Protein cadangan disimpan untuk berbagai proses metabolisme dalam tubuh. Sebagai contoh misalnya: ovalbumin, merupakan protein yang terdapat pada putih telur; kasein, merupakan protein susu; feritin, merupakan tempat cadangan besi dalam limpa.

Protein terhidrolisis yang menghasilkan asam amino, menurut deMan (1989) termasuk golongan berikut:

1. Albumin

Albumin larut dalam air dan mengendap dalam garam berkonsentrasi tinggi melalui proses yang disebut penggaraman atau salting out. Contoh albumin telur dan albumin serum.

2. Globulin

Globulin tidak larut dalam air, tidak larut dalam garam encer, juga tidak larut dalam garam pekat dengan kejenuhan 30-50%. Pada temperatur rendah, pengendapan globulin dan albumin dapat dilakukan dengan sangat hati-hati (mengaduk sesedikit mungkin) memakai metode salting out. Dengan cara ini protein murni bahkan dapat dikristalkan.

Contoh : globulin serum dan globulin telur.

3. Glutein

Protein ini tidak larut dalam larutan netral, tetapi larut dalam asam dan basa encer.

Contoh: protein gandum (glutenin) dan protein padi (orizenin)

4. Gliadin (prolamin)

Gliadin larut dalam 70-80 % etanol, tidak larut dalam air dan etanol 100%. Contoh: protein gandum (gliadin) dan protein jagung (zein)

5. Histon

Protein ini sangat basa dibandingkan dengan protein lain dan cenderung berikatan dengan nukleat di dalam sel. Contoh : protein globin, bersenyawa dengan heme (senyawa asam) membentuk hemoglobin.

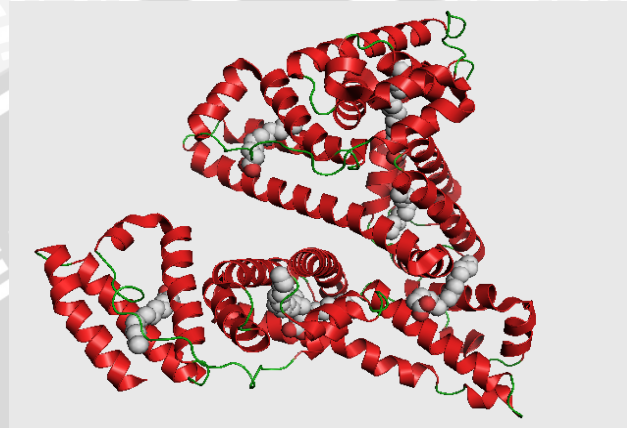
6. Protamin

Dibandingkan dengan protein lain, protamin relatif mempunyai bobot molekul rendah. Protamin larut dalam air dan bersifat basa. Biasanya didapatkan bergandengan dengan asam nukleat. Di dalam sperma ikan, disebut nukleoprotamin.

Sebagian besar protein merupakan molekul yang mudah rusak bila tidak berada pada kondisi fisiologis. Karena itu untuk mempertahankan struktur dan kondisi protein, pengendapan dilakukan pada suhu rendah (0-4°C) dalam buffer dan pH tertentu (tergantung dari jenis protein yang dianalisa). Hasil homogenisasi biasanya masih berupa larutan keruh yang terdiri dari debris sel (bagian sel yang tidak hancur), organel-organel sel dan makromolekul penyusun sel diantaranya yaitu protein. Dengan sentrifuse, debris dan organel sel akan mengendap di dasar tabung sentrifuse (dinamakan pellet), sedangkan makromolekul yang ukurannya jauh lebih kecil daripada debris dan organel sel tidak akan mengendap tetapi telarut dalam buffer (dinamakan supernatan yang bening) (Widyarti, 2000).

2.3 Albumin

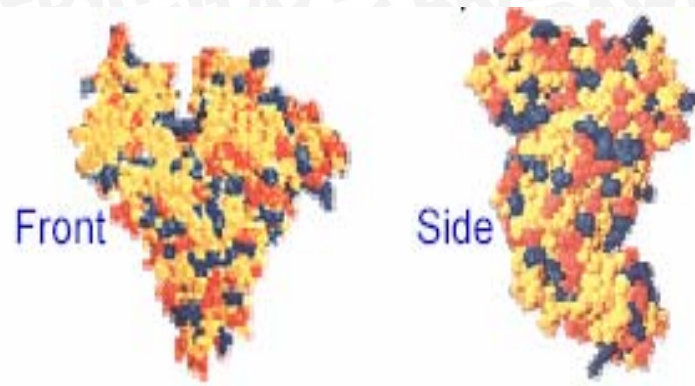
Albumin adalah protein yang larut dalam air, dan mengendap dengan penambahan asam. Albumin dibuat oleh hati dan merupakan salah satu konstituen utama tubuh (Handoko, 2006). Gambar struktur albumin disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Albumin

Sumber: Anonymous, 2006^d

Albumin merupakan protein utama dalam plasma manusia (kurang lebih 4,5 g/dl), berbentuk ellips dengan panjang 150 Å, mempunyai berat molekul bervariasi tergantung jenis spesies. Berat molekul albumin plasma manusia 69.000 dalton, albumin telur 44.000 dalton dan di dalam daging mamalia 63.000 dalton (Montgomery *et al*, 1983). Gambar molekul albumin daging mamalia (sapi) disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Model Molekul Serum Albumin Daging Mamalia (Sapi)
Sumber : Raghavachari (2005)

Ikan gabus memiliki kandungan protein yang tinggi yaitu 51,01% sampai 51,36%, sehingga didapatkan kadar albumin kasar berkisar 56 mg/100g – 60 mg/100g (Moedjiharto *et al*, 2002).

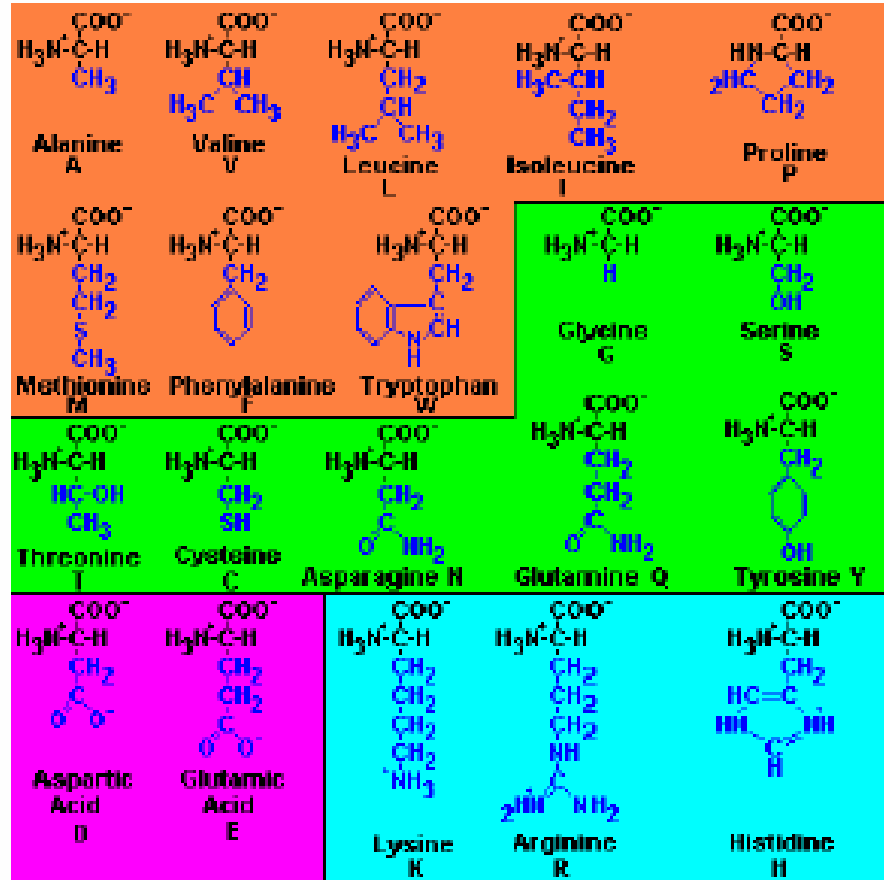
Albumin mencakup semua protein yang larut dalam air bebas ion dan ammonium sulfat 2,03 mol/L. Albumin merupakan protein sederhana, berstruktur globular yang tersusun dari ikatan polipeptida tunggal dengan komposisi asam amino sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 1

Tabel 1 . Komposisi Asam Amino Albumin Ikan Gabus dan Serum Albumin

Asam amino	Ikan Gabus (ng/g)	Serum (g asam amino/ g protein)
Glisin	$6,99 \times 10^2$	1,8
Alanin	$10,07 \times 10^2$	6,3
Valin	$8,66 \times 10^2$	5,9
Leusin	$14,99 \times 10^2$	12,3
Isoleusin	$8,34 \times 10^2$	2,6
Serin	$6,75 \times 10^2$	4,2
Treonin	$8,34 \times 10^2$	5,8
Sistein	$0,16 \times 10^2$	6,0
metionin	$8,34 \times 10^2$	0,8

Sumber: Pesce dan Lawrence (1987)

Albumin terdiri dari berbagai macam asam amino, masing asam amino terdiri dari amina (NH_2) dan asam karboksilat (COOH) . Disajikan dalam bentuk ionik sebagai H_3N^+ dan COO^- . Adapun rangkaian rumus asam amino penyusun albumin disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Rangkaian Rumus Asam Amino Penyusun Albumin.

Sumber : Raghavachari (2005)

Keterangan :

- Delapan asam amino bersifat nonpolar dan hidrofobik berada pada area berwarna jingga
- Asam amino bersifat polar dan hidrofilik berada pada area hijau
- Dua asam amino pada area ungu merupakan golongan asam
- Tiga asam amino pada area biru merupakan golongan basa

Albumin dibentuk dari asam amino essensial dan asam amino non essensial. Termasuk asam amino essensial adalah fenilalanin, triptofan, isoleusin, leusin, lisin, threonin, valin, metionin, arginin, histidin. Sedangkan asam amino non essensial terdiri dari sistein, glisin, tirosin, alanin, glutamat, prolin, aspartat, dan serin. Asam amino tertentu seperti triptofan, arginin, lisin, fenilalanin, alanin, treonin, dan prolin dapat merangsang proses sistesa albumin (Tandra, 1988). Komposisi Asam amino yang terdapat pada albumin ikan gabus disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Asam Amino Albumin Ikan Gabus

No	Asam Amino	A	B	C
1	Aspartat	0.072	0.283	0.608
2	Threonin*	0.084	0.102	0.023
3	Serin	0.081	0.098	0.134
4	Glutamat	0.286	0.368	0.504
5	Glisin	0.14	0.146	0.254
6	Alanin	0.15	0.16	0.254
7	Sistein	0.017	0.03	0.009
8	Valin*	0.127	0.122	0.192
9	Metionin*		0.037	
10	Isoleusin*	0.098	0.095	0.159
11	Leusin*	0.169	0.178	0.29
12	Tirosin	0.025	0.063	0.057
13	Fenil alanin*	0.132	0.135	0.222
14	Hidroksilisin			
15	Lisin*	0.197	0.205	0.351
16	Amonia	0.026	0.022	0.033
17	Histidin*	0.062	0.067	0.351
18	Arginin*	0.109	0.139	0.121
19	Hidroksiprolin		0.298	
20	Prolin	0.082	0.117	0.147
	Jumlah	2.057	2.663	3.565

Sumber: A. Puspitasari, Y.E (2007)

B. Ratih, K. P (2007)

C. Puspita, V.S (2007)

Ket :

* : Asam Amino Essensial

2.4 Fungsi Albumin

Klasifikasi berdasarkan fungsi biologisnya, albumin merupakan pengangkut asam lemak dalam darah. Di dalam plasma manusia albumin merupakan fraksi protein dengan berat molekul 66.300-69.000, terdiri dari 54 asam amino yang terutama adalah asam aspartat dan glutamat dan sangat sedikit triptofan. Albumin merupakan hampir 50% dari protein plasma dan bertanggung jawab atas 75 -80% dari tekanan osmotik pada plasma manusia (Murray *et al*, 1990).

Albumin mempunyai 2 fungsi utama, yaitu mengangkut molekul-molekul kecil melewati plasma dan cairan sel serta memberi tekanan osmotik di dalam kapiler. Fungsi pertama albumin sebagai pembawa molekul-molekul kecil erat kaitannya dengan bahan metabolisme dan berbagai macam obat yang kurang larut. Bahan metabolisme tersebut adalah asam-asam lemak bebas dan bilirubin. Dua senyawa kimia tersebut kurang dapat larut dalam air tetapi harus diangkut melalui darah satu organ ke organ lain agar dapat di metabolisme atau di ekskresi. Albumin berperan membawa senyawa kimia tersebut, peran ini disebut protein pengangkut non spesifik (Montgomery *et al*, 1983).

2.5 Metode Pemisahan Protein

Pemisahan protein dari campuran yang terdiri atas beberapa macam sifat asam basa, ukuran dan bentuk protein, dapat dilakukan dengan cara elektroforesis, kromatografi, pengendapan, dan perbedaan kelarutan (Wirahadikusumah, 1989).

1. Elektroforesis

Cara ini didasarkan pada kecepatan bergerak yang berbeda-beda dari protein dalam medan listrik pada pH tertentu. Apabila molekul protein berada pada suatu medan

listrik, molekul protein yang bermuatan positif akan bermigrasi ke elektroda negatif dan sebaliknya (Widyarti, 2000).

Ada dua cara pemisahan campuran protein dengan cara elektroforesis. Cara pertama disebut elektroforesis bebas bergerak (*moving boundary electrophoresis*). Disini campuran protein dalam larutan diletakkan dalam tabung U yang kedua ujungnya masing-masing dihubungkan dengan anoda dan katoda. Jika listrik dijalankan, molekul protein yang bermuatan negatif akan bergerak ke anoda dan yang positif akan bergerak ke katoda. Perbedaan kecepatan pergerakan protein positif ke katoda dan protein negatif ke anoda akan menghasilkan batas atau lapisan dalam tabung U yang dapat dilihat dengan menggunakan cara penentuan indeks refraksinya. Cara ini mempunyai berbagai kekurangan, yaitu lambatnya pekerjaan, dibutuhkannya jumlah campuran protein yang banyak, penentuan indeks refraksinya sukar, dan lapisan yang terjadi mudah dipengaruhi oleh getaran. Cara yang kedua disebut elektroforesis lajur (*zone electrophoresis*). Pada cara ini sedikit dari campuran protein dalam larutan dapat ditempatkan pada suatu matriks padat, misalnya kertas saring, gel poliakrilamid. Pergerakan protein pada matriks padat tersebut akan jelas terlihat setelah dilakukan penentuan kuantitatif dengan uji warna. Protein yang telah terpisahkan pada matriks padat dapat diambil dan ditentukan secara kuantitatif dengan cara biasa. Beberapa keuntungan cara ini adalah, bahwa getaran tidak mempengaruhi lajur-lajur protein yang terjadi, dan panjang matriks padat yang dipakai dapat diatur sedemikian rupa sehingga proses elektroforesis dapat berlangsung terus sampai masing-masing protein dapat dipisahkan dalam lajur-lajur tersendiri (Wirahadikusumah, 1989).

2. Kromatografi

Penentuan dan pemisahan protein dengan cara kromatografi dilakukan berdasarkan prinsip pertukaran ion-ion, sebab gugus yang terdapat dalam selulosa tersebut masing-masing bermuatan (Kusnawijaya, 1983).

3. Pengendapan protein dengan penambahan asam

Sebagian besar protein dapat diendapkan dari larutan air dengan penambahan asam tertentu, seperti misalnya, asam triklorasetat dan asam perklorat. Penambahan asam ini menyebabkan terbentuknya garam protein yang tidak larut. Protein juga dapat diendapkan dengan kation tertentu seperti Zn^{2+} dan Pb^{2+} (Wirahadikusumah, 1989).

4. Pengendapan dengan cara perbedaan kelarutan

Berbagai protein globuler mempunyai daya kelarutan yang berbeda di dalam air. Variabel yang mempengaruhi adalah pH, kekuatan ion, sifat dielektrik pelarut dan temperatur.

1. Pengendapan protein dengan pengaturan pH

Protein sensitif terhadap asam dan basa, sehingga harus dijaga agar pH larutan tidak merusak protein. Proses pengendapan protein dapat dilakukan dengan menyesuaikan pH titik isoelektrik protein yang diinginkan. Pada titik isoelektrik kelarutan protein berkurang hingga minimum dan protein yang diinginkan akan mengendap, sedangkan protein lain yang tidak diinginkan tetap dalam larutan (Poedjiadi, 1994).

2. Pengendapan protein dengan cara penambahan garam

Pengendapan protein dengan cara penambahan garam didasarkan pada pengaruh yang berbeda-beda daripada penambahan pada kelarutan protein. Proses ini disebut salting in, dan tidak dipengaruhi oleh sifat garam netral, tetapi dipengaruhi oleh

konsentrasi dan jumlah muatan pada tiap ion dalam larutan. Pada *salting in* garam yang ditambahkan tidak jenuh atau pada konsentrasi rendah sehingga protein menjadi bermuatan dan larut dalam larutan garam. Kelarutan protein akan meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam. Bila konsentrasi garam ditingkatkan terus, maka justru kelarutan protein menjadi turun. Bahkan pada konsentrasi garam tinggi atau jenuh, protein akan mengendap. Proses penambahan garam jenuh ini dinamakan *salting out* (Widyarti, 2000). Larutan yang biasa digunakan pada metode ini adalah ammonium sulfat, natrium sulfat dan magnesium sulfat (Kusnawijaya, 1983).

3. Pengendapan dengan penambahan pelarut organik tertentu

Pelarut seperti etanol dan aseton apabila ditambahkan ke dalam larutan protein dalam air akan menyebabkan berkurangnya kelarutan protein, sehingga memungkinkan pengendapannya. Kejadian ini disebabkan oleh kelarutan protein yang pada pH dan kekuatan ion tertentu merupakan fungsi konstanta dielektrik daripada medium, dan adanya kecenderungan menurunnya hidratisasi gugus ion dengan masuknya pelarut organik tersebut (Wirahadikusumah, 1989).

4. Pemisahan dengan penambahan panas

Apabila protein dipanaskan, maka protein akan mengendap. Pemanasan protein dapat menyebabkan terjadinya reaksi-reaksi baik yang diinginkan maupun yang tidak diharapkan. Reaksi-reaksi tersebut diantaranya adalah perubahan kelarutan, pemutusan ikatan peptida dan denaturasi (Apriyantono, 2002).

2.6 Pengendapan Albumin

Albumin dapat di ekstrak dari jaringan bersama fraksi protein plasma lainnya. Pemisahan albumin dengan fraksi protein lainnya dapat menggunakan berbagai metode, salah satu diantaranya adalah pengendapan dengan mengatur pH sampai mencapai pH isoelektrik albumin. Isoelektrik albumin bervariasi antara 4,6-4,9 tergantung spesies albumin tersebut (deMan, 1989).

Titik isoelektrik terjadi pada pH dimana molekul tidak mampu bergerak karena jumlah muatan positif dan negatif sama. Pada keadaan ini daya larut protein minimum sehingga mengakibatkan terjadinya pengendapan (Wirahadikusumah, 1989).

. Protein globular adalah protein yang berbentuk bulat padat yang larut dalam sistem larutan. Albumin termasuk dalam protein globular yang dapat terkoagulasi oleh panas dan larut air. Pada umumnya dengan menambah kekuatan ion, kelarutan ion semakin besar. Tetapi setelah mencapai suatu titik tertentu, kekuatannya justru menurun. Pada kekuatan ion rendah gugus protein yang terionisasi dikelilingi oleh ion lawan sehingga terjadi interaksi antar protein dan akibatnya kelarutan protein akan menurun. Jenis garam netral yang biasa digunakan untuk mengendapkan protein adalah Magnesium klorida, Magnesium sulfat, Natrium sulfat dan Ammonium sulfat (Thenawijaya, 1987).

Pengendapan ini dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain jumlah dan posisi gugus polar, berat molekul, pH dan temperatur larutan (Widyarti, 2000).

1. Jumlah dan posisi gugus polar

Albumin merupakan protein globular, protein globular berbentuk bulat atau ellips dan terdiri dari atas rantai polipeptida yang berlipat. Pada umumnya gugus R polar

terletak di sebelah luar rantai polipeptida, sedangkan gugus R yang hidrofob terletak di sebelah dalam molekul protein. Protein globular lebih kompak dibandingkan dengan protein fiber, karena adanya lipatan-lipatan rantai peptidanya yang mudah larut dalam air dan mengendap dengan penambahan garam pada konsentrasi jenuh (albumin) dan setengah jenuh (globulin) (Poedjiadi, 1994).

2. Berat molekul

Protein merupakan polipeptida dengan berat molekul berkisar antara 5.000 hingga 1×10^6 . Protein dapat diendapkan berdasarkan ukuran molekulnya, molekul protein akan mengendap dengan laju alat sentrifugasi yang sebanding dengan berat molekulnya (Montgomery *et al*, 1993). Albumin mempunyai berat molekul ± 66.300 , disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm (Fatchiyah, *et al*, 2006)

3. pH

Konsentrasi ovalbumin (%) menurun secara intensif pada pH ekstrim (pH3 dan 11). Pada kondisi media terlalu asam dan terlalu basa tersebut terjadi denaturasi ovalbumin yang lebih cepat sebagai akibat tertutupnya titik isoelektrik ovalbumin (pH= 4,6) (Sadjok *et al*, 1989).

4. Temperatur

Albumin mudah rusak bila tidak berada pada kondisi dingin. Karena itu untuk mempertahankan struktur dan kondisi protein, pengendapan dilakukan pada suhu rendah (0-4°C) (Widyarti, 2000)

2.7 Ammonium Sulfat

Pemisahan protein dari campuran kompleks sering dilakukan dengan cara memakai berbagai zat pelarut atau elektrolit untuk menyingkirkan fraksi protein yang

berbeda menurut kelarutannya. Biasanya memakai berbagai konsentrasi natrium sulfat atau ammonium sulfat (Harper *et al*, 1979).

Ammonium sulfat merupakan senyawa kimia yang berbentuk kristal warna putih, abu-abu kebiru-biruan atau kuning, tetapi paling banyak berwarna putih seperti gula pasir. Senyawa ini mengandung nitrogen antara 20,4%-21%, bersifat tidak higroskopis dan baru akan menyerap air bila kelembaban nisbi sudah 80% pada suhu 30°C (Setyawidjaya).

Menurut Jones (1982), ammonium sulfat dapat dihasilkan melalui 2 proses yaitu:

1. Mereaksikan ammonia dengan asam sulfat dengan reaksi sebagai berikut:



2. Mereaksikan ammonium karbonat dengan gypsum yang bereaksi sebagai berikut:



Ammonium sulfat bila bereaksi dengan air akan membentuk ammonium hidroksida dan asam sulfat dengan reaksi:



Metode yang menggunakan ammonium sulfat biasanya dilakukan dengan pengendapan. Metode ini dapat dipakai untuk memisahkan albumin dari globulin. Kelarutan protein dalam garam ammonium sulfat sangat bervariasi tergantung pada kekuatan ionik dan konsentrasi ammonium yang ditambahkan. Proses ini dapat dikelompokkan ke dalam dua bagian yaitu salting in dan salting out. Pada salting in

garam yang ditambahkan tidak jenuh atau pada konsentrasi rendah sehingga protein (albumin) menjadi bermuatan dan menjadi larut dalam larutan garam. Pada konsentrasi garam tinggi atau jenuh, albumin akan mengendap. Proses penambahan garam ammonium sulfat jenuh pada isolasi protein ini dinamakan salting out (Widyarti, 2000).

2.8 Alat Ekstraktor Vakum

Ekstraksi merupakan cara untuk mendapatkan zat tertentu dari bahan yang diduga mengandung zat tersebut (Ketaren, 1986). Untuk mendapatkan albumin ikan gabus, perlu dilakukan ekstraksi dengan menggunakan pelarut.

Ekstraktor vakum merupakan alat ekstraksi yang dilengkapi dengan pompa vakum. Pompa vakum adalah peralatan yang bekerja dengan tekanan di dalam peralatan kurang dari 1 atmosfer absolut (Anonymous, 1979). Pompa tidak menggunakan elemen bergerak, penghisapan menggunakan fluida pendorong yang dapat berupa air. (Hasbullah, 2000).

Tekanan vakum terjadi apabila tekanan gas disuatu ruangan lebih rendah daripada tekanan dilingkungannya. Vakum akhir yaitu keadaan dimana tekanan paling rendah yang dapat dicapai oleh suatu pompa vakum. Apabila cairan atau bahan padat yang dapat menguap berada dalam suatu sistem, vakum akhir akan dibatasi oleh tekanan uap bahan tersebut (Bernasconi *et al*, 1995).

3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian pengaruh pH Ammonium sulfat terhadap rendemen dan kadar albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) meliputi bahan penelitian dan peralatan penelitian.

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan baku untuk albumin ikan gabus dan bahan untuk analisis. Bahan baku yang digunakan adalah ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) hidup yang diperoleh dari sungai di Pasuruan dan es batu. Bahan kimia yang digunakan dalam proses adalah aquadest, ammonium sulfat konsentrasi 80-90% pH 4-6 dan buffer fosfat pH 8. Bahan yang digunakan untuk analisa kadar albumin dengan metode Brom Cresol Green adalah buffer succinate 87 mmol/L dengan pH 4,20; brom cresol green 0,2 mmol/L; brij 35 7,35 ml/L; larutan standart / Bovine Serum Albumin (BSA). Bahan untuk analisa kadar protein total dengan metode biuret adalah larutan standart (BSA), pereaksi biuret (larutan 3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 9 g Na-K-Tartrat dalam 500 ml NaOH 0,2 N) dan aquadest.

3.1.2 Peralatan Penelitian

1. Peralatan ekstraksi albumin

Alat yang digunakan dalam ekstraksi albumin kasar adalah pisau, baskom, talenan, timbangan, cool box, ekstraktor vakum, kunci Inggris, kunci no. 17, stopwatch, kain saring, termos es, sprayer, gelas ukur 100 ml, spatula, corong, beaker glass 500 ml.

2. Peralatan Analisa Protein dan Albumin

Alat yang digunakan untuk analisa protein total dan albumin antara lain tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, kertas saring, mikropipet, spektrofotometer.

3. Peralatan Pengendapan dengan Ammonium Sulfat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pipet tetes, sentrifuge dingin, vortex, pHmeter, tabung eppendorf.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen bertujuan untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara membandingkan suatu kelompok atau kesatuan eksperimen dengan kelompok atau kesatuan kontrol (Nazir, 1985). Penelitian dilakukan 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian inti. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mendapatkan perlakuan yang akan digunakan pada penelitian utama. Tahapan penelitian Pendahuluan adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan ekstrak albumin kasar dengan alat ekstraktor vakum

Pertama-tama disiapkan 2 kg ikan gabus hidup lalu dimatikan dan disiangi. Setelah itu diambil dagingnya kemudian dicuci sampai bersih. Daging yang telah bersih, dicincang halus dan ditimbang masing-masing 200 g. Daging yang tidak langsung diproses harus disimpan dalam keadaan dingin.

Langkah kedua, persiapan ekstraktor vakum. Tabung pelarut diisi aquadest sampai batas tengah selang indikator. Kemudian thermokopel dinyalakan hingga suhu 35°C.

Daging ikan halus sebanyak 200g dimasukkan dalam tabung ikan yang telah diberi kain saring. Setelah itu tabung ditutup rapat dan pompa vakum dinyalakan sampai tekanan -69-(-70) cmhg selama 12,5 menit. Dari 200g daging yang diekstrak, dihasilkan cairan ekstrak sebanyak 30-49ml. Hasil dari ekstraksi ini berupa cairan ekstrak daging ikan gabus yang berwarna putih kekuning-kuningan dan sedikit keruh. Gambar hasil ekstraksi disajikan pada Gambar 5. Kemudian hasil ekstrak ini dilanjutkan pada tahap pengendapan.



Gambar 5. Hasil Ekstraksi Albumin Ikan Gabus dengan Alat Ekstraktor Vakum

2. Tahap pengendapan

Pengendapan diawali dengan melakukan sentrifugasi ekstrak albumin yang pertama dengan alat sentrifus berkecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Pada sentrifuse pertama ini dihasilkan endapan (pellet) dan larutan (supernatan). Pellet pada sentrifugasi pertama dibuang sedangkan supernatannya digunakan untuk proses selanjutnya.

Langkah selanjutnya dilakukan penambahan ammonium sulfat pada sampel dengan perbandingan 1:2. pH yang digunakan terbagi menjadi tiga perlakuan, hal ini

bertujuan untuk mendapatkan kisaran pH yang akan digunakan pada penelitian inti. Kisaran pH yang digunakan pada penelitian pendahuluan 4,5-6,2. Titik isoelektrik albumin bervariasi antara pH 4,6-4,9 tergantung spesies albumin tersebut (deMan, 1989). Titik isoelektrik terjadi pada pH dimana molekul tidak mampu bergerak karena jumlah muatan positif dan negatif sama. Pada keadaan ini daya larut protein minimum sehingga mengakibatkan terjadinya pengendapan (Wirahadikusumah, 1989). Tujuan perlakuan pH 4,5-6,2 adalah untuk mengetahui kadar albumin pada kondisi pH diatas titik isoelektrik.

Perlakuan pertama menggunakan pH 4,6 ; 5 ; 5,4 ; 5,8 ; dan 6,2. Perlakuan kedua pH 4,5 ; 4,9 ; 5,3 ; 5,7 ; dan 6,1. perlakuan ketiga pH 4,6 ; 4,7 ; 4,8 ; 4,9 ; dan 5. Kemudian sampel diinkubasi selama 20-30 menit dan divortex setiap 10 menit. Setelah itu disentrifuse dengan berkecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatant yang terbentuk dianalisa kadar albumin, kadar protein dan rendemen. Gambar hasil sentrifuse disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Sampel Hasil Sentrifugasi

Sedangkan pellet di beri buffer phosphate pH 8, kemudian di vortex dan dianalisa.

Gambar pellet yang sudah diberi phosphate disajikan pada gambar 7.



Gambar 7. Pellet setelah diberi buffer phospat

Perlakuan terbaik I diperoleh pH 5, 8 dengan kadar albumin 0,79 g/dl; perlakuan terbaik II pH 6,1 dengan kadar albumin 0,8 g/dl dan perlakuan III pH 5 dengan kadar albumin 0,88 g/dl. Berdasarkan hasil tersebut, maka diperoleh pH 4: 4,5: 5 : 5,5 : 6 sebagai pH pada penelitian utama. Sedangkan penelitian inti dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH ammonium sulfat terhadap rendemen dan kadar albumin ikan gabus.

3.2.2 Variabel

Variabel atau peubah adalah segala faktor yang berperan atau berpengaruh terhadap percobaan. Menurut fungsinya dalam penelitian, variabel dibedakan menjadi 2 yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dan sesuai dengan tujuan penelitian dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel tergantung diartikan sebagai akibat yang keadaannya tergantung kepada variabel-variabel yang lain (Sugito, 1995). Dalam penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah pH yang digunakan yaitu 4; 4,5; 5; 5,5 dan 6. Sedangkan variabel tergantungnya adalah rendemen, kadar albumin, dan kadar protein.

3.3 Analisis Data

Dalam penelitian ini data yang diperoleh dianalisis dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan. Tabel rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 3 berikut:

Tabel 3. Rancangan Percobaan

Perlakuan (pH)	Ulangan			Total
	I	II	III	
4	I ₄	II ₄	III ₄	
4,5	I _{4,5}	II _{4,5}	III _{4,5}	
5	I ₅	II ₅	III ₅	
5,5	I _{5,5}	II _{5,5}	III _{5,5}	
6	I ₆	II ₆	III ₆	

Menurut Yitnosumarto (1993), model matematik rancangan acak lengkap adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \Sigma_{ij}$$

$$I = 1,2,3,\dots,t$$

$$J = 1,2,3,\dots,r$$

Keterangan:

Y_{ij} = nilai pengamatan pada perlakuan ke-I ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

Σ_{ij} = kesalahan (galat) percobaan pada perlakuan ke-I ulangan ke-j

t = perlakuan

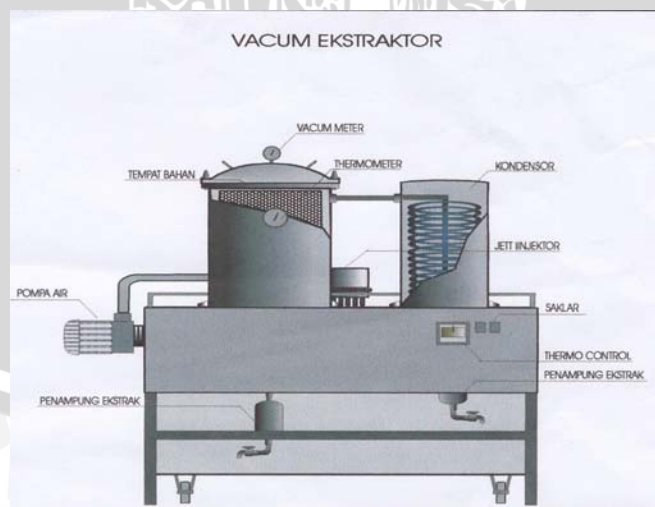
r = ulangan

Apabila dari hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang sangat nyata ($F_{hit} > F_{1\%}$) maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

3.4 Prosedur Kerja

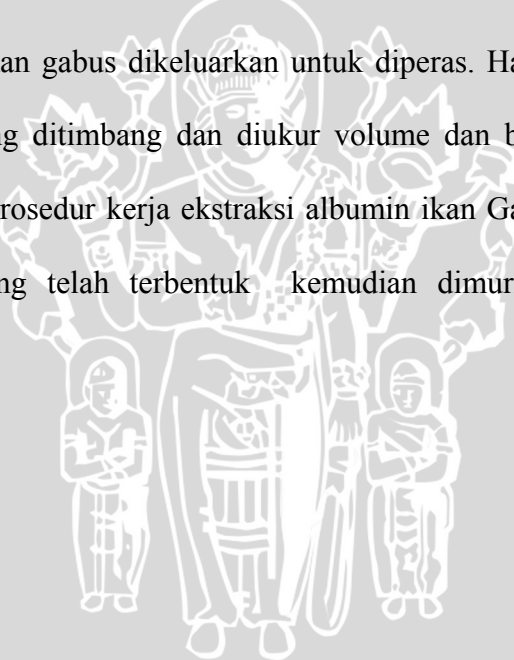
3.4.1 Prosedur Pembuatan *Crude Albumin*

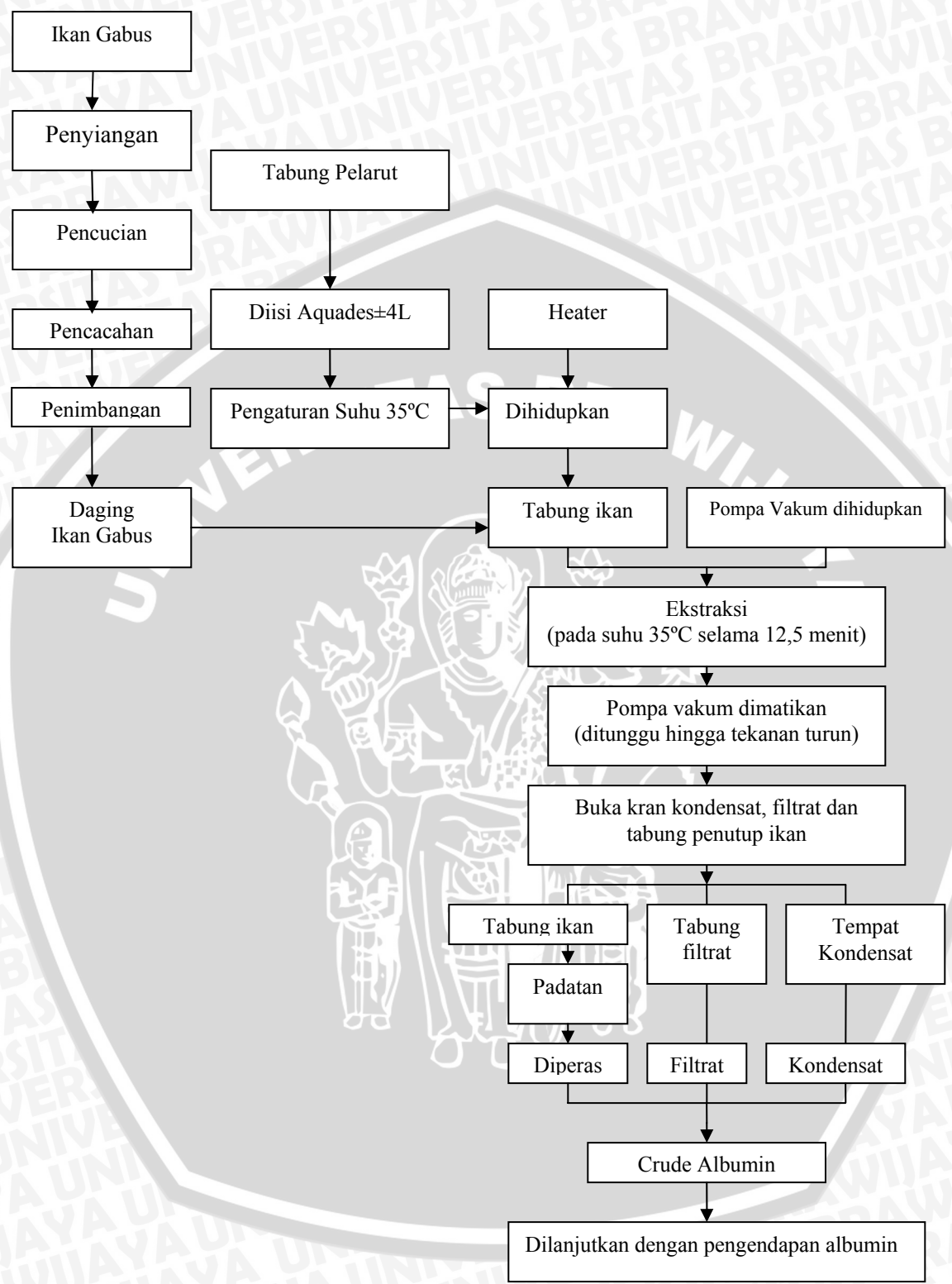
Hal pertama yang dilakukan adalah persiapan alat dan bahan. Bahan baku yang berupa ikan gabus hidup dimatikan dan disiangi (dibuang bagian kepala, isi perut, sirip dan kulit). Lalu mencincang daging ikan gabus, dicuci dengan air bersih dan ditimbang masing-masing tiap perlakuan 200 g dengan timbangan duduk, kemudian dikemas dalam plastik. Ikan gabus yang telah dikemas disimpan pada kondisi dingin untuk menjaga kesegaran ikan dan mencegah terjadinya perubahan fisik maupun kimiawi. Selanjutnya menyiapkan alat ekstraksi yaitu ekstraktor vakum. Gambar alat ekstraktor vakum disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Alat Ekstraktor Vakum

Tabung pelarut diisi aquadest melalui kran tempat masuknya pelarut sampai batas setengah selang indikator. Masukkan kain saring ke dalam tabung ikan ekstraktor vakum dimana terdapat saringan lalu tabung reaksi ditutup. Kemudian suhu diatur pada 35°C dengan cara menyalakan thermokopel hingga mencapai suhu tersebut. Setelah itu ikan gabus dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah berisi kain saring, menutup tabung reaksi dengan rapat. Menghidupkan pompa vakum hingga tekanan mencapai -69 hingga -70 cmHg dengan variable waktu 12,5 menit. Pompa vakum dimatikan, kran pengatur tekanan dibuka sehingga tekanan naik kembali hingga 0 cmHg dan heater dimatikan. Kran filtrat dan kran kondensat dibuka kemudian tutup tabung ekstraktor vakum dibuka daging ikan gabus dikeluarkan untuk diperas. Hasil perasan, filtrat dan kondensat masing-masing ditimbang dan diukur volume dan beratnya lalu dicampur jadi satu. Diagram alir prosedur kerja ekstraksi albumin ikan Gabus dapat dilihat pada Gambar 9. Ekstrak yang telah terbentuk kemudian dimurnikan dengan metode pengendapan.





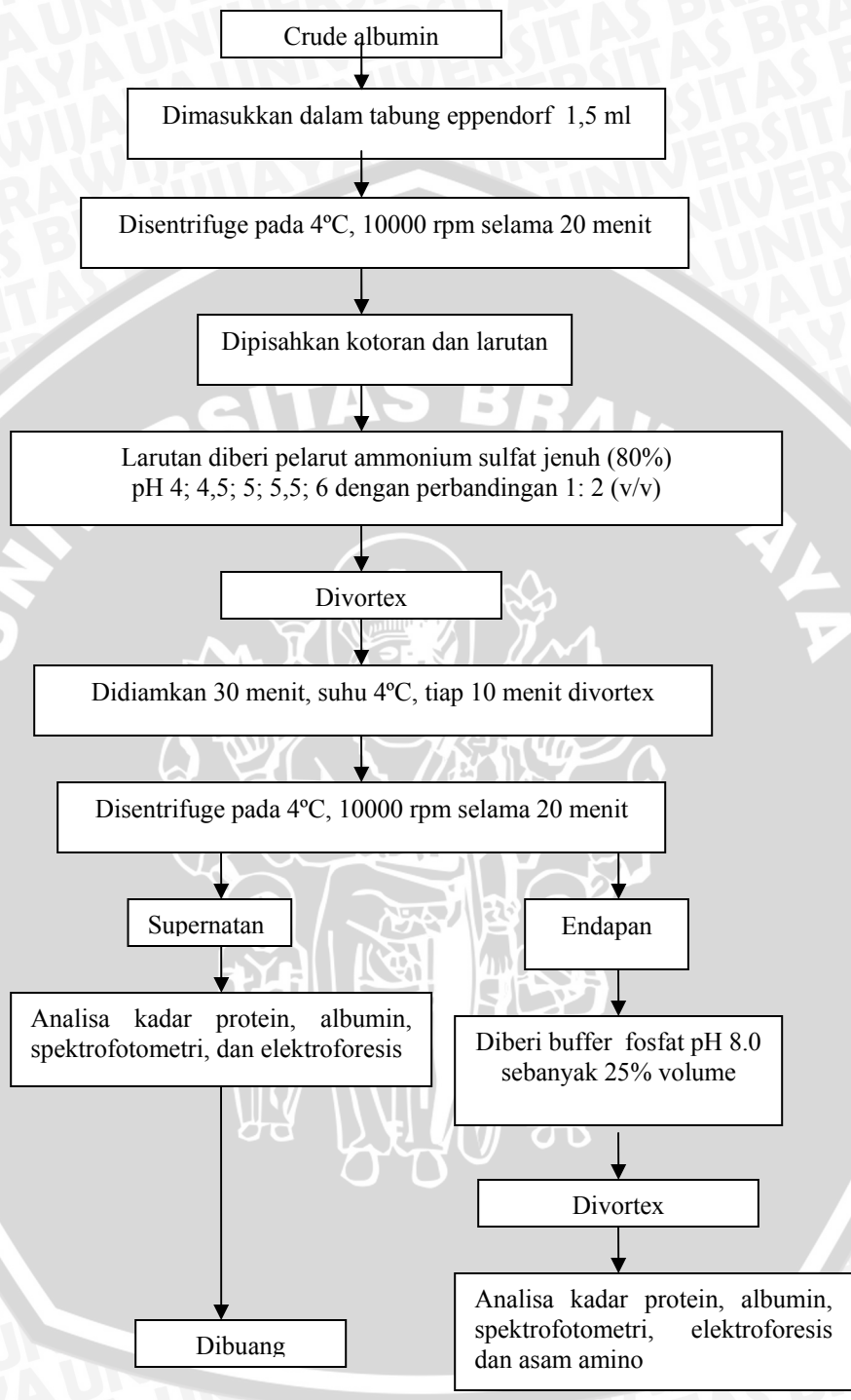
Gambar 9. Diagram Alir Proses Ekstraksi Albumin dengan Ekstraktor Vakum

(Modifikasi Ciptarini, 2006)

3.4.2 Prosedur Pengendapan Albumin

Pertama-tama ekstrak sample di sentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm, pada suhu 4°C selama 20 menit. Setelah itu dipisahkan antara sampel bersih dengan kotoran. Kemudian sample tersebut diberi larutan ammonium sulfat sesuai dengan pH yang digunakan yaitu 4; 4,5; 5; 5,5 dan 6 lalu divortex supaya homogen. Setelah itu sample tersebut disentrifuge kembali dengan kecepatan, suhu dan waktu yang sama. Hasil sentifuge itu kemudian diambil endapannya dan diberi buffer lalu divortex hingga homogen. Setelah itu dilakukan analisa rendemen, protein total dan albumin. Diagram alir pengendapan albumin disajikan dalam Gambar 10.





Gambar 10. Diagram alir pengendapan albumin (Modifikasi Fatchiyah *et al*, 2006)

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Rendemen

Rendemen yang dihasilkan dari ekstraksi dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

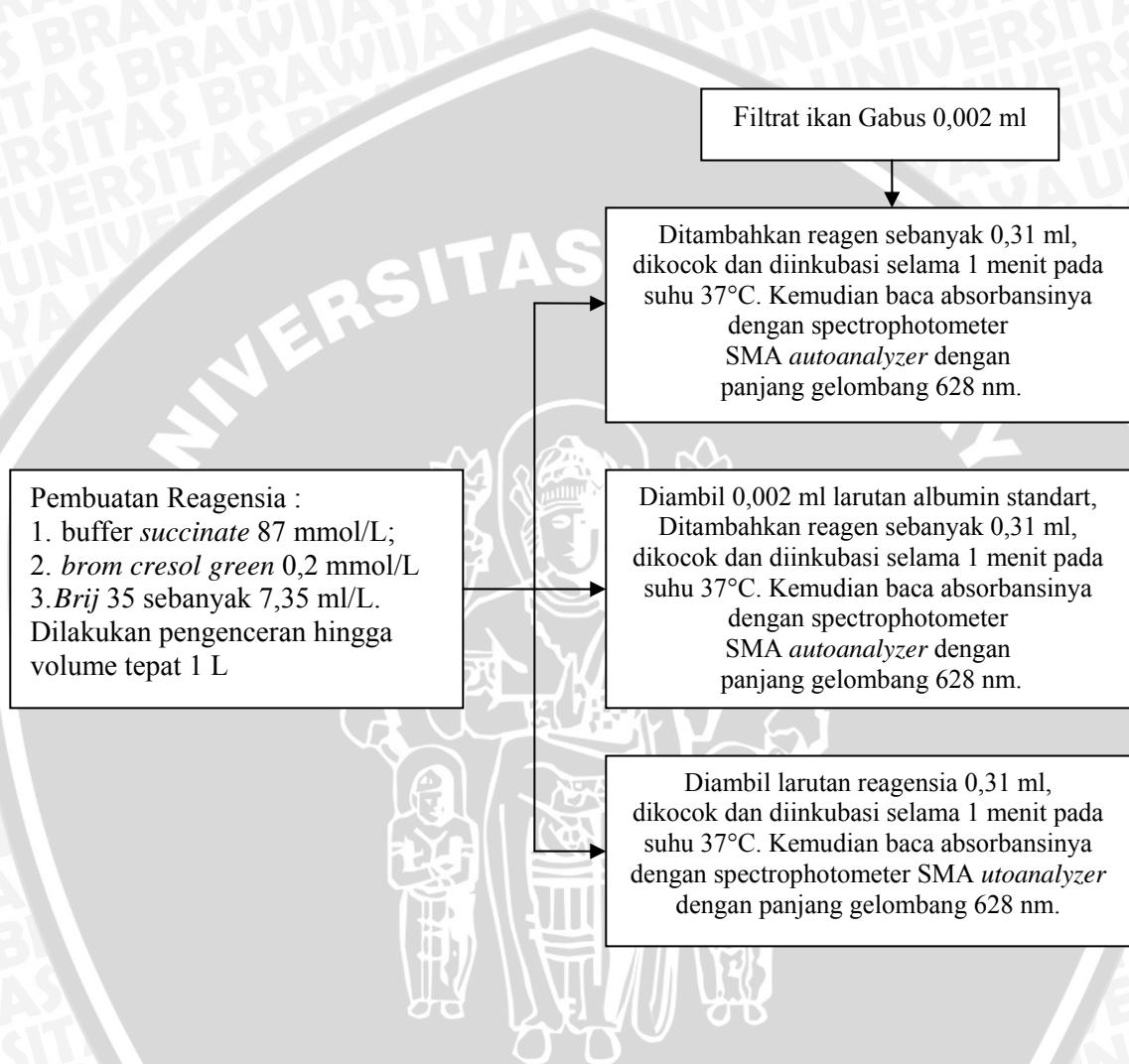
$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat pellet yang dihasilkan}}{\text{Berat sampel awal}} \times 100\%$$

3.5.2 Kadar Albumin (Anonymous, 2006^c)

Pada pengujian kadar albumin menggunakan metode Brom Cresol Green yaitu albumin dengan *brom cresol green* membentuk suatu kompleks pada pH 4,20 dan ditentukan secara kolorimetri. Reagensia berisi buffer *succinate* dengan konsentrasi 87 mmol/L; pH 4,20, *brom cresol green* 0,2 mmol/L, *Brij* 35 sebanyak 7,35 ml/L. larutan standar / Bovine Serum Albumin (BSA) dan aquades.

Penentuan kadar albumin meliputi 3 tahap yaitu analisa sampel, larutan standart. Ditambahkan reagen sebanyak 0,31 ml, dikocok dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu 37°C. Kemudian baca absorbansinya dengan spectrophotometer SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 628 nm. dan larutan blanko. Pada analisa sampel, sampel diambil 0,002 ml. Pembuatan larutan standart dengan mengambil 0,002 ml larutan albumin standart. Ditambahkan reagen sebanyak 0,31 ml, dikocok dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu 37°C. Kemudian baca absorbansinya dengan spectrophotometer SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 628 nm. Sedangkan pembuatan larutan blanko standart sampel diambil 0,002 ml. Ditambahkan reagen sebanyak 0,31 ml, dikocok dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu 37°C. Kemudian

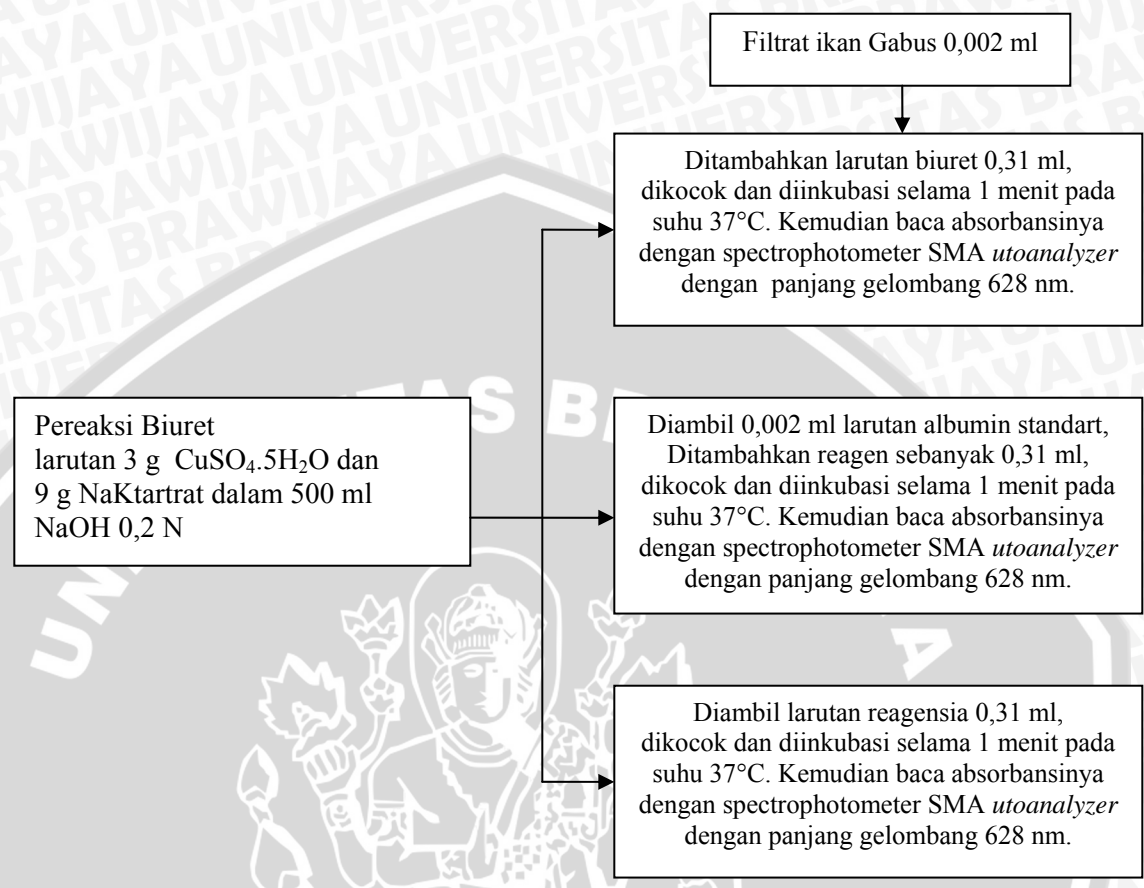
baca absorbansinya dengan spectrophotometer SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 628 nm. Diagram alir analisa kadar albumin ikan Gabus dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Diagram Alir Analisa Kadar Albumin dengan Metode Brom Cresol Green

3.5.3 Kadar Protein (Anonymous, 2006^c)

Penentuan kadar protein dengan metode *Biuret* meliputi 3 tahap yaitu analisa sampel, larutan standart dan larutan blanko. Pada analisa sampel, sampel diambil 0,002 ml. Ditambahkan reagen sebanyak 0,31 ml, dikocok dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu 37°C. Kemudian baca absorbansinya dengan spectrophotometer SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 546 nm. Pembuatan larutan standart dengan mengambil 0,002 ml larutan albumin standart. Ditambahkan reagen sebanyak 0,31 ml, dikocok dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu 37°C. Kemudian baca absorbansinya dengan spectrophotometer SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 546 nm. Sedangkan pembuatan larutan blanko standart sampel diambil 0,002 ml. Ditambahkan reagen sebanyak 0,31 ml, dikocok dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu 37°C. Kemudian baca absorbansinya dengan spectrophotometer SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 546 nm. Diagram alir analisa kadar protein ikan Gabus dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Diagram Alir Analisa Kadar Protein dengan Metode Biuret

3.5.4 Penentuan Perlakuan Terbaik (deGarmo *et al*, 1979)

Penentuan perlakuan terbaik menggunakan metode indeks efektifitas dengan bobot nilai sebagai berikut:

- a. Parameter-parameter uji fisika dikelompokkan secara terpisah dari parameter uji organoleptik
- b. Masing-masing parameter uji diberi 0-1 pada masing- masing kelompok bobot yang diberi sesuai dengan tingkat kepentingan dalam mempengaruhi konsumen yang diwakili oleh panelis. Adapun cara perhitungan bobot adalah sebagai berikut:

$$\text{bobot} = \frac{\text{nilai total setiap parameter uji}}{\text{nilai total parameter uji}}$$

- c. Nilai efektifitas (NE) dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$NE = \frac{Np - Ntj}{Ntb - Ntj}$$

Keterangan :

NE : nilai efektifitas

Np : nilai perlakuan

Ntj : nilai terjelek

Ntb : nilai terbaik

- d. Perhitungan Nilai Produk (NP)

Nilai produk diperoleh dari perkalian nilai efektifitas dengan bobot nilai, yaitu:

$$NP = NE \times \text{bobot nilai}$$

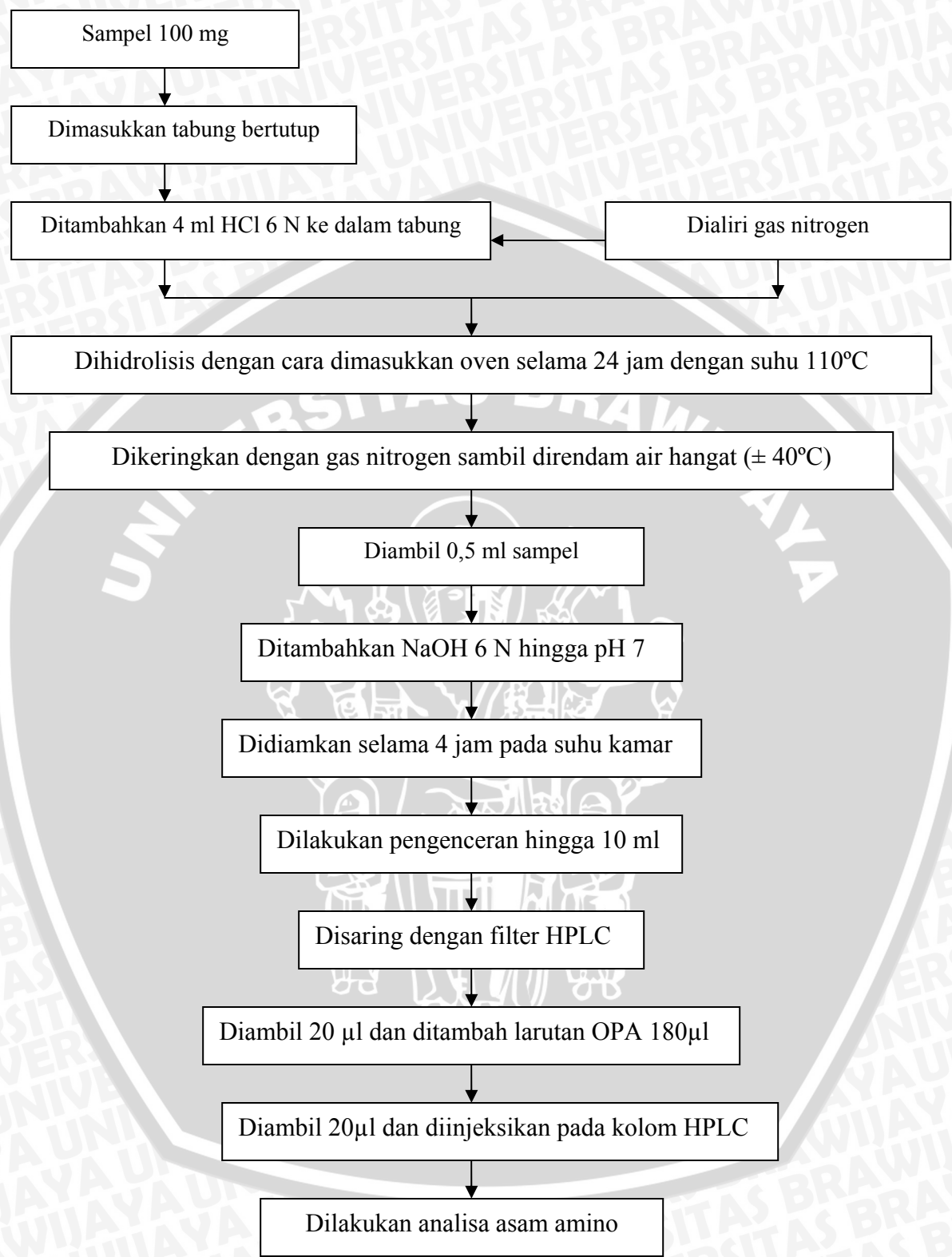
- e. Nilai produk dari semua parameter pada masing-masing kelompok dijumlahkan, perlakuan yang dimiliki nilai produk tertinggi adalah perlakuan terbaik pada kelompok parameter

- f. Penentuan perlakuan terbaik dipilih dari perlakuan yang memiliki,I nilai produk tertinggi untuk parameter organoleptik

3.5.5 Analisis Asam Amino (Khak, 2007)

Analisis kandungan asam amino albumin ikan gabus dari hasil perlakuan terbaik menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatografi* (HPLC), khusus deteksi dengan larutan OPA (Ophthaldialdehyde).

Prosedur kerja analisa asam amino tersebut menggunakan sample sebanyak 100 mg yang dimasukkan tabung tertutup. Kemudian ditambahkan 4 ml HCl 6 N ke dalam tabung dan dialiri dengan gas nitrogen, dan dihidrolisis dengan cara dimasukkan oven selama 24 jam dengan suhu 110°C. Setelah itu sample dikeringkan dengan gas nitrogen sambil direndam air hangat ($\pm 40^{\circ}\text{C}$). Kemudian ditambahkan pada sample 0,5 ml NaOH 6 N hingga pH 7 dan didiamkan selama 4 jam pada suhu kamar. Kemudian dilakukan pengenceran hingga 10 ml dan disaring dengan filter HPLC. Diambil 20 μl dan ditambah larutan OPA 180 μl . Kemudian diambil 20 μl dan diinjeksikan pada kolom HPLC. Lalu dilakukan analisa asam amino. Diagram alir analisis asam amino disajikan pada Gambar 13.



Gambar 13. Diagram Alir Analisa Asam Amino Metode HPLC (Khak, 2007)

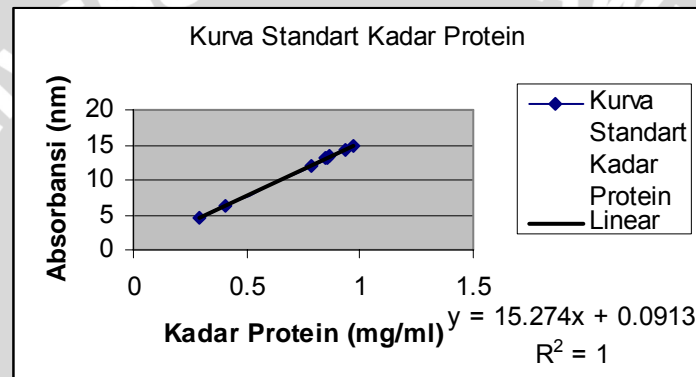
3.5.6 Spektrofotometer UV (Fatchiyah *et al*, 2006)

Penentuan kadar protein endapan dengan spektrofotometer thermospectromic genesis 10 UV. Alat ini memberi hasil yang akurat dan mudah dioperasikan. Spektrofotometer thermospektronik genesis 10 UV ini dilengkapi dengan software yang mampu membaca berbagai uji untuk bahan-bahan kimia. Hasil uji yang ditampilkan pada layar alat ini berupa keterangan waktu, tanggal, nama uji, data dan hasil akhir.

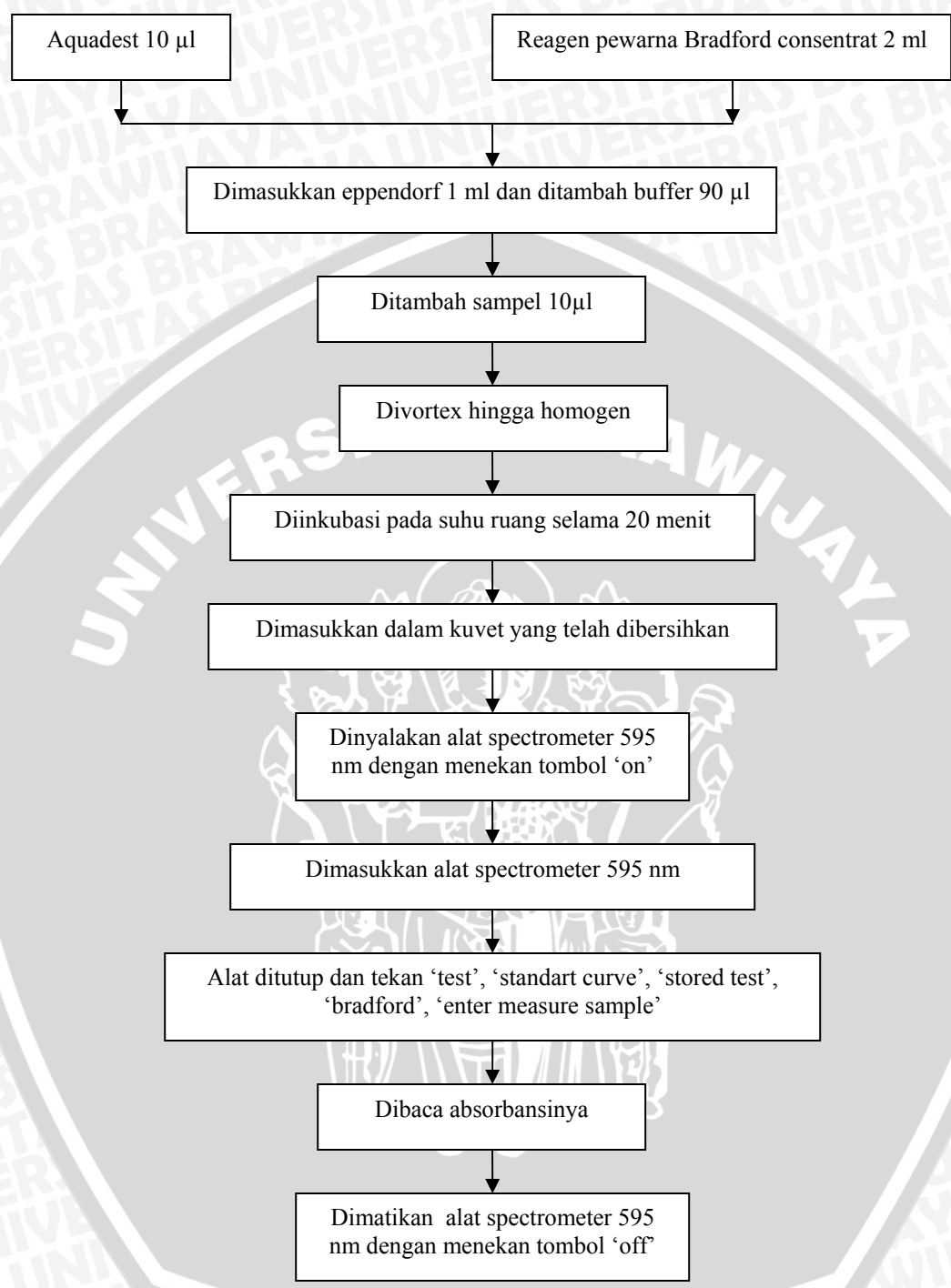
Prosedur kerja alat ini dilakukan dengan mencampur 10 ml aquadest dengan 2ml Bradford konsentrasi (reagen pewarna). Larutan yang terbentuk disebut buffer dilute. Kemudian buffer dilute dimasukkan dalam tabung eppendorf sebanyak 1 ml dan ditambah buffer 90 μ l serta ditambah sampel 10 μ l. Setelah itu divortex selama 10 menit. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit untuk mengoptimalkan kerja pewarna.

Sebelum dilakukan pengukuran kadar protein sampel, dilakukan persiapan alat spektrofotometer thermospektronik genesis 10 UV. Pertama-tama, alat dinyalakan dengan cara menekan saklar 'on' di bagian belakang alat. Kemudian sampel yang telah diinkubasi dimasukkan pada kuvet yang telah dibersihkan dengan aquadest. Lalu kuvet dimasukkan pada alat dengan bagian yang bening menghadap ke arah depan. Setelah itu alat ditutup dan tekan 'Test' pada layar, diikuti dengan 'standart curve', 'stored test', 'bradford', lalu 'enter measure sample'. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Setelah selesai, kuvet dicuci dengan aquadest. Alat dimatikan dengan cara menekan 'esc' lalu menekan saklar 'off' di bagian belakang alat. Diagram alir analisa kadar protein dengan spektrofotometer disajikan pada Gambar 14.

Untuk menentukan kadar protein suatu sampel diperlukan kurva standar protein. Sumbu Y pada kurva standar merupakan nilai absorbansi dan sumbu x merupakan kadar protein. Kurva standar kadar protein disajikan pada Gambar 14. Persamaan garis linear $y = 15,274x + 0,0913$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) = 1 dan koefisien korelasi (r) = 1. jadi, hubungan linear sempurna terdapat pada nilai x dan y. bila $r = +1$, hubungan kedua peubah tersebut kuat dan terdapat kerelasi yang tinggi diantara keduanya (Walpole, 1982).



Gambar 14. Kurva Standar Kadar Protein



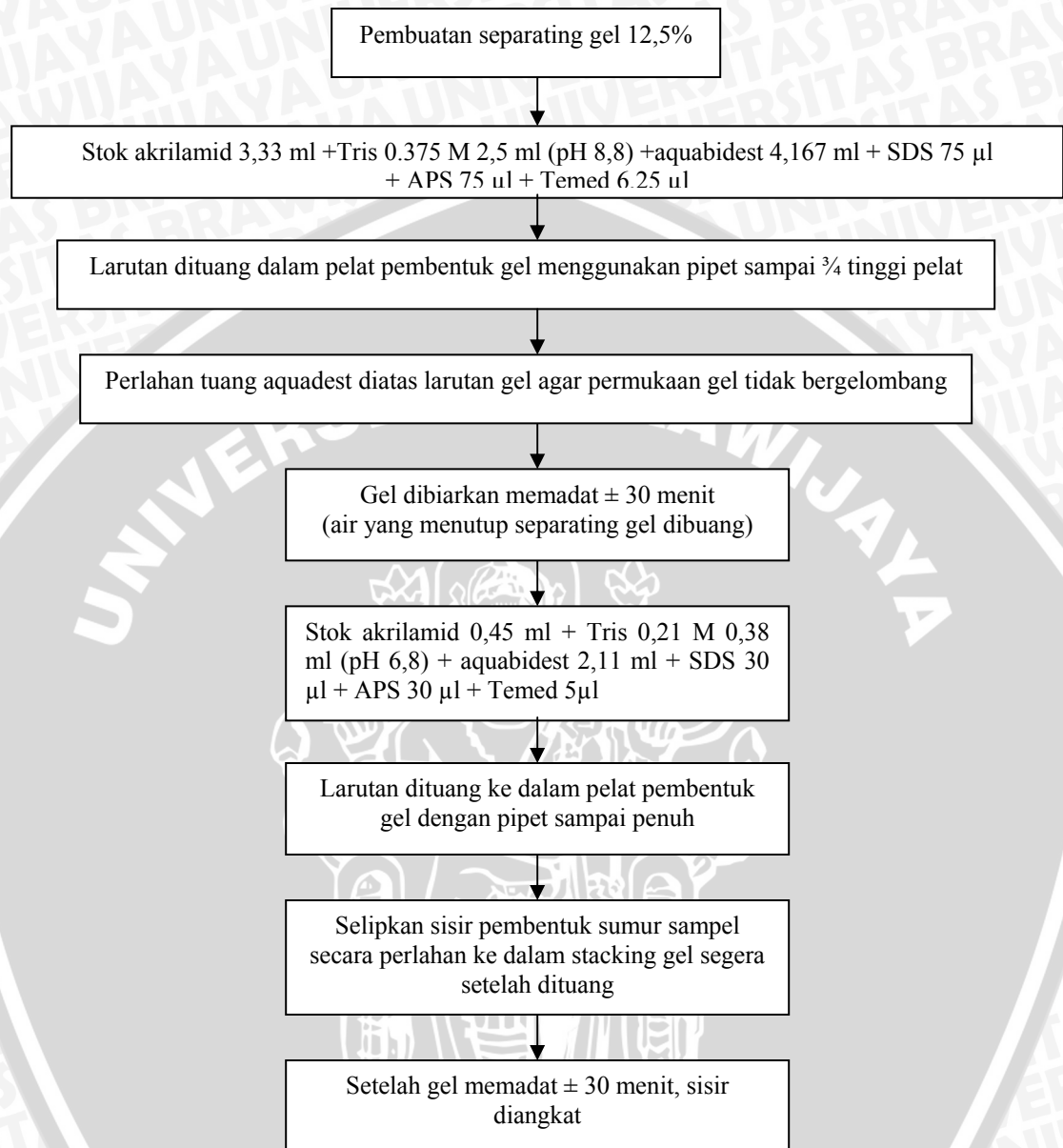
Gambar 15. Diagram Alir Analisa Kadar Protein dengan Spektrofotometer Metode Bradford (Fatchiyah *et al*, 2006)

3.5.7 Elektroforesis Metode SDS-PAGE (Fatchiyah *et al*, 2006)

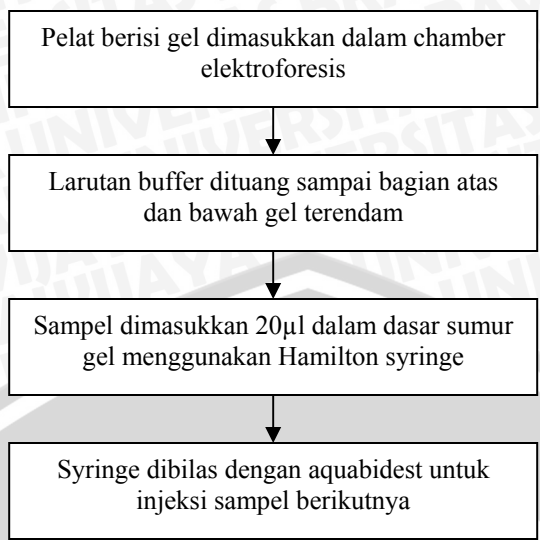
Elektroforesis memerlukan media penyangga sebagai tempat bermigrasinya molekul biologi. Media penyangga yang sering dipakai antara lain kertas, selulosa asetat dan gel. Gel yang dipakai dapat berupa pati, agarose ataupun poliakrilamid. Pada penelitian ini menggunakan gel poliakrilamid. Sebelum menyiapkan separating dan stacking gel, dilakukan persiapan sampel. Sampel dilarutkan dalam larutan Tris pH 6,8 kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit.

Gel dibentuk antara 2 lempeng kaca yang dipisahkan oleh sekat plastik. Sumur sampel dibentuk pada bagian atas gel oleh plastik berbentuk seperti sisir yang disisipkan diantara sisi atas lempeng kaca selama proses polimerisasi. Setelah itu sekat bawah dan plastik pembentuk sumur diangkat. Sampel yang telah dipanaskan kemudian dimasukkan dalam sumur, lalu alat elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik sampai sampel dalam sumur berjalan ke bagian bawah lempeng kaca dan berada pada jarak 0,5 cm dari dasar gel.

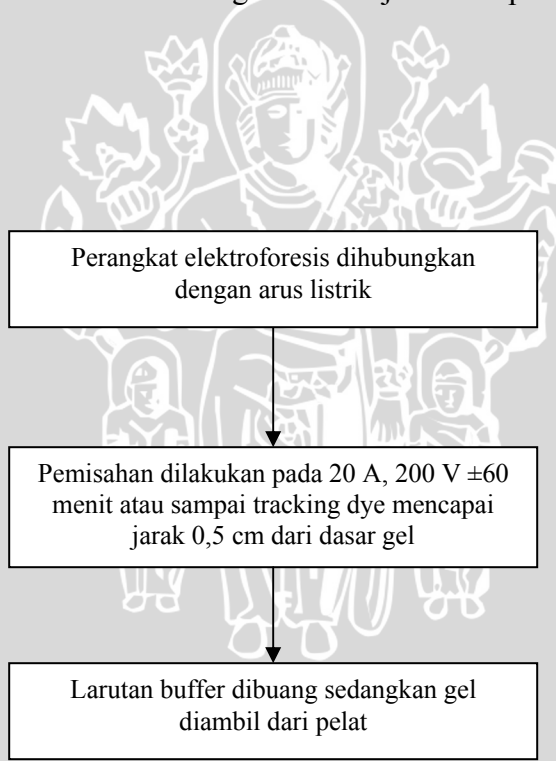
Protein di deteksi dengan pewarnaan. Setelah sampel sudah berjalan ke bagian bawah kaca, gel diambil untuk diberi pewarna. Zat pewarna yang umum digunakan dalam gel poliakrilamid adalah Coomassie blue R-250 0,1 % yang dilarutkan dalam methanol asam asetat dan air dengan perbandingan tertentu. Gel direndam dalam pewarna, kemudian dibilas dengan asam asetat jenuh. Prosedur elektroforesis disajikan pada Gambar 16,17,18 dan 19.



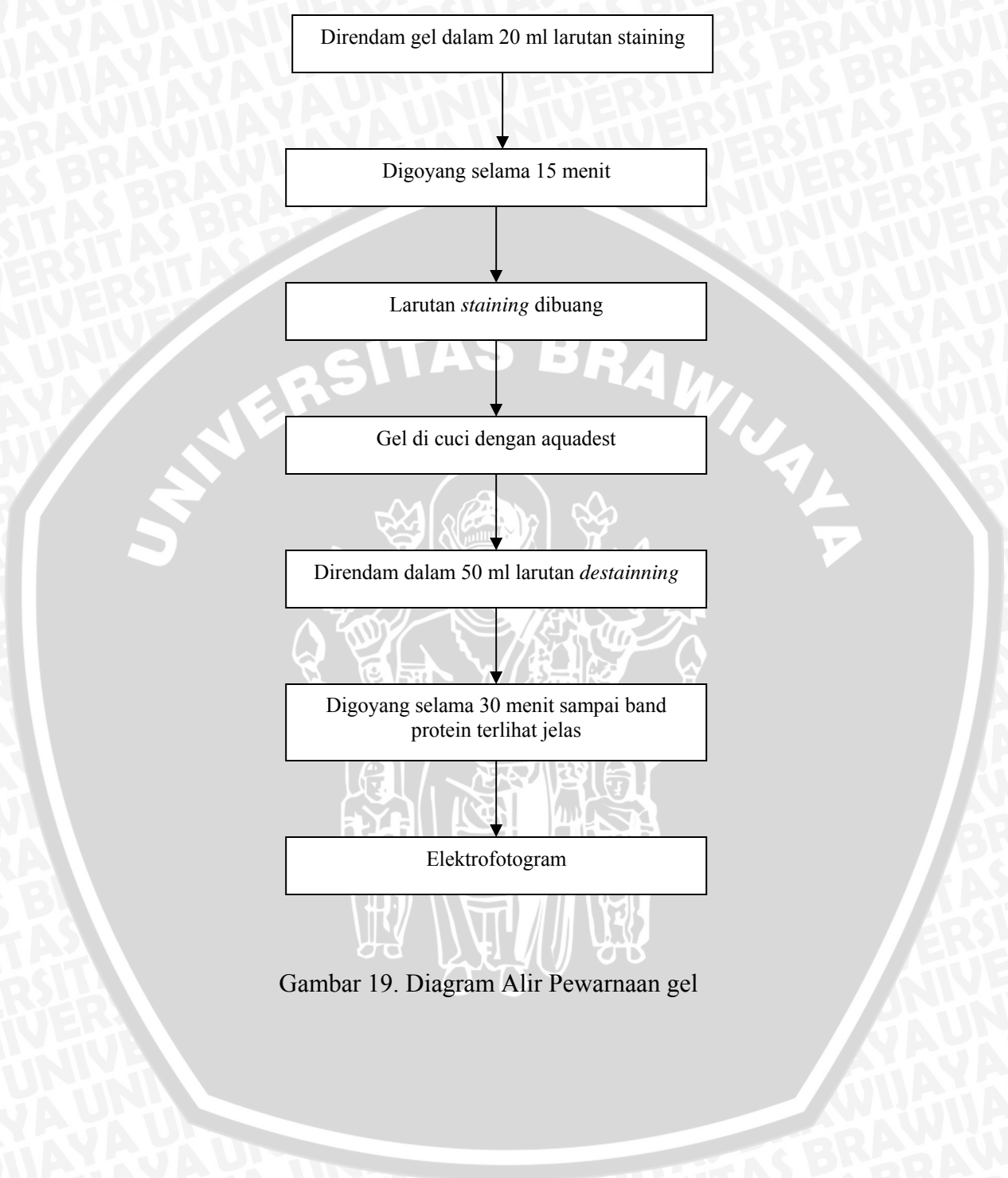
Gambar 16. Diagram Alir Persiapan gel



Gambar 17. Diagram alir Injeksi Sampel



Gambar 18. Diagram Alir Running Sampel



Gambar 19. Diagram Alir Pewarnaan gel



4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian

Data yang diperoleh berdasarkan penelitian mengenai pengaruh pH Ammonium sulfat terhadap rendemen dan kadar albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) meliputi data rendemen, kadar albumin, kadar protein dan profil asam amino. Tabel rerata hasil penelitian disajikan pada Tabel 4

Tabel 4. Data Rerata Hasil Penelitian

perlakuan	protein (g/dl)		albumin (g/dl)		rendemen (%)	
	E	S	E	S	E	S
4	1.15	0.57	0.64	0.03	54	82
4.5	1.19	0.50	0.79	0.03	30.67	89.78
5	1.17	0.36	0.86	0.05	46.00	84.67
5.5	1.13	0.62	0.59	0.03	48	84.00
6	1.11	0.60	0.50	0.04	30	90.00

Keterangan:

E = Endapan

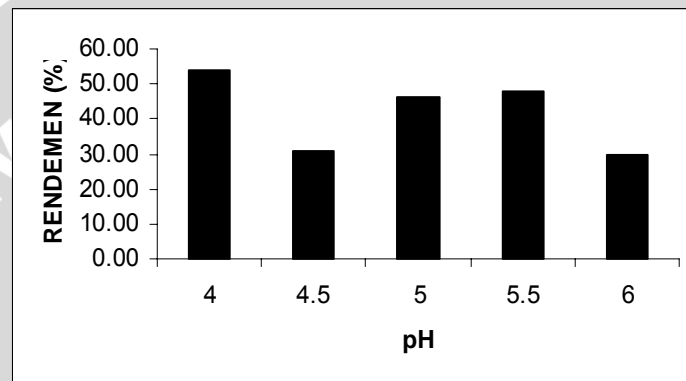
S = Supernatan

4.2 Rendemen

4.2.1 Rendemen Endapan

Rendemen endapan diperoleh dari pembagian berat akhir dengan berat awal dikali 100%. Berat awal sampel adalah 0,5ml kemudian ditambah ammonium sulfat 1ml. sehingga total seberat 1,5ml. Setelah itu dilakukan proses sentrifuse yang menghasilkan endapan dan supernatan. Kemudian ditimbang berat supernatan dan endapan. Endapan inilah yang digunakan sebagai berat akhir pada perhitungan rendemen endapan.

Rendemen endapan ekstrak ika gabus dari hasil penelitian berkisar antara 30% sampai dengan 54%. Rendemen tertinggi diperoleh dengan penambahan ammonium sulfat pH 4 sebesar 54%, sedangkan rendemen yang terendah diperoleh dengan penambahan ammonium sulfat pH 6 sebesar 30%. Rata-rata rendemen endapan ikan gabus dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Rerata Rendemen Endapan

Dari Gambar 20 menunjukkan bahwa terjadi penurunan rendemen dari 54% (pada pH 4) ke 30, 67% (pada pH 4,5), kenaikan terjadi dari 30,67% (pada pH 4,5) ke 46% (pada pH 5), namun terjadi penurunan lagi dari 48% (pada pH 5,5) ke 30% (pada pH 6). Meningkatnya rendemen endapan dipengaruhi oleh banyaknya endapan yang terbentuk. Semakin banyak endapan yang terbentuk, semakin besar pula rendemen yang dihasilkan. Bila cairan terpisah dari protein yang terkoagulasi karena ada pemekaran atau pengembangan molekul protein, maka protein akan mengendap (Winarno, 1992).

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH tidak memberi pengaruh nyata terhadap perubahan rendemen endapan ikan gabus $F_{hitung} (1,36) < F_{tabel} 5\% (3,48)$. Hasil analisa lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rendemen Endapan

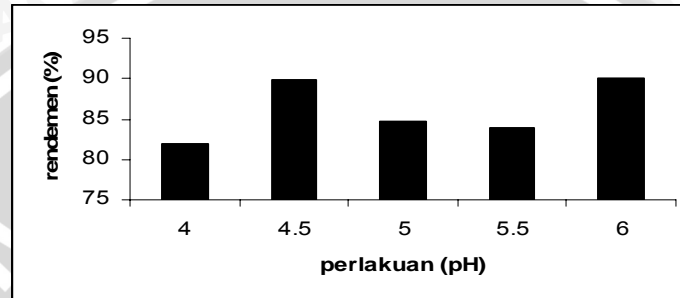
Perlakuan (pH)	Rerata (%)	Notasi
4	54	b
5,5	48	b
5	46	b
4,5	30,67	b
6	30	b

Pada Tabel 5 dapat diketahui bahwa rendemen endapan tertinggi terdapat pada perlakuan pH 4 yaitu sebesar 54 %. Perlakuan pH 4 sampai 6 nilainya tidak berbeda nyata. pH ammonium sulfat tidak memberi pengaruh yang nyata terhadap rendemen endapan, karena terjadinya endapan pada larutan sangat dipengaruhi oleh konsentrasi dan kekuatan ionik garam pelarutnya (Widyarti, 2000). Data statistik rendemen endapan disajikan pada Lampiran 1.

4.2.2 Rendemen Supernatan

Perhitungan rendemen supernatan menggunakan cara yang sedikit berbeda dengan perhitungan rendemen endapan, berat akhir yang digunakan adalah berat supernatan. Yaitu dengan pembagian berat akhir dengan berat awal dikali 100%. Berat sampel 0,5ml kemudian ditambah ammonium sulfat 1ml sehingga total seberat 1,5ml. 1,5ml ini digunakan sebagai berat awal pada perhitungan rendemen supernatan. Setelah itu dilakukan proses sentrifuse yang menghasilkan endapan dan supernatan. Kemudian ditimbang berat supernatan dan endapan. Supernatan inilah yang digunakan sebagai berat akhir pada perhitungan rendemen supernatan.

Rendemen supernatan ekstrak ikan gabus dari hasil penelitian berkisar antara 82% sampai dengan 90%. Rendemen tertinggi diperoleh dengan penambahan ammonium sulfat pH 6 sebesar 90%, sedangkan rendemen yang terendah diperoleh dengan penambahan ammonium sulfat pH 4 sebesar 82%. Rata-rata rendemen supernatan ikan gabus dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Rerata Rendemen Supernatan

Dari Gambar 21 menunjukkan bahwa terjadi kenaikan dari 82% (pada pH 4) ke 89,78% (pada pH 4,5), penurunan terjadi dari 84,67% (pada pH 5) ke 84% (pada pH 5,5), namun terjadi kenaikan lagi dari 84% (pada pH 5,5) ke 90% (pada pH 6). Meningkatnya rendemen supernatan dipengaruhi oleh endapan yang terbentuk. Bila cairan terpisah dari protein yang terkoagulasi karena ada pemekaran atau pengembangan molekul protein, maka protein akan mengendap (Winarno, 1992). Semakin sedikit endapan yang terbentuk, semakin besar supernatan yang dihasilkan sehingga rendemen supernatan meningkat.

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH tidak memberi pengaruh nyata terhadap perubahan rendemen supernatan ikan gabus F hitung (1,75) < F tabel 5% (3,48). Hasil analisa lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Rendemen Supernatan

Perlakuan (pH)	Rerata (%)	Notasi
6	90	b
4,5	89,78	b
5	84,67	b
5,5	84	b
4	82	b

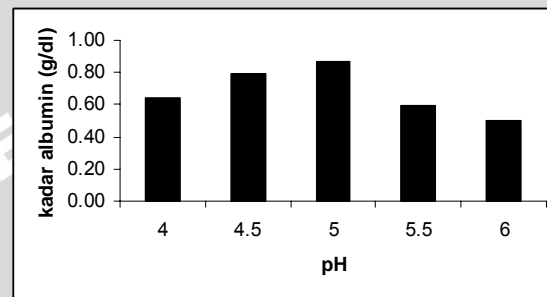
Pada Tabel 6 dapat diketahui bahwa rendemen supernatan tertinggi terdapat pada perlakuan pH 6 yaitu sebesar 90 %. Perlakuan pH 4 sampai pH 6 nilainya tidak berbeda nyata. Perlakuan pH mengakibatkan terbentuknya endapan yang menentukan nilai rendemen. Namun rendemen dari pengendapan protein sangat dipengaruhi oleh kekuatan ionik garam yang mengikat molekul air. Apabila gaya tarik menarik antara molekul protein lebih menonjol dibanding dengan tarik menarik air dan protein, maka protein akan mengendap (Widyarti, 2000). Data statistik rendemen supernatan disajikan pada Lampiran 2.

4.3 Kadar Albumin

4.3.1 Kadar Albumin Endapan

Albumin adalah protein yang paling banyak dalam plasma, kira-kira 60% dari total plasma 3,5-5,5 g/dl. Albumin merupakan polipeptida tunggal, memiliki berat molekul 63.000-69.000 dalton, terdiri dari 585 asam amino (Murray *et al*, 1993). Albumin bersifat larut air dan dapat diendapkan dengan pengaturan pH ammonium sulfat sampai mencapai titik isoelektriknya yaitu sebesar 4,8 untuk Human Serum Albumin (Kusnawijaya, 1981).

Kadar albumin endapan ikan gabus dari hasil penelitian berkisar antara 0,50 g/dl (pada pH 6) sampai 0,86 g/dl (pada pH 5). Penambahan ammonium sulfat pH 5 menghasilkan albumin tertinggi sebesar 0,86 g/dl. Sedangkan albumin terendah dihasilkan dengan penambahan ammonium sulfat pH 6 yaitu sebesar 0,50 g/dl. Rerata albumin endapan dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22. Rerata Kadar Albumin Endapan

Dari Gambar 22 menunjukkan bahwa terjadi kenaikan kadar albumin dari 0,64 g/dl (pada pH 4) ke 0,86 g/dl (pada pH 5), penurunan terjadi dari 0,59 g/dl (pada pH 5,5) ke 0,50 g/dl (pada pH 6). Kadar albumin pada pH 5 merupakan nilai tertinggi, hal ini dikarenakan pH 5 mendekati titik isoelektrik albumin yaitu 4,8 (Montgomery *et al*, 1993). Penambahan ammonium sulfat sebagai garam pada suatu larutan akan mengakibatkan tertariknya molekul-molekul air yang ada di permukaan albumin. Molekul air akan membentuk ikatan hidrogen dengan molekul albumin sehingga terbentuk air hidrat. Adanya gugus-gugus amino dan karboksil yang bebas pada ujung-ujung rantai molekul albumin menyebabkan albumin mempunyai banyak muatan dan bersifat amfoter (Winarno, 2002). Pada pH mendekati titik isoelektrik (4,8), jumlah molekul bermuatan positif dan negatif sama sehingga kelarutannya berkurang yang mengakibatkan terjadinya pengendapan (Wirahadikusumah, 1989).

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH memberi pengaruh sangat nyata terhadap perubahan kadar albumin endapan ikan gabus $F_{hitung} (56,26) > F_{tabel} 1\% (5,90)$. Hasil analisa lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 7.

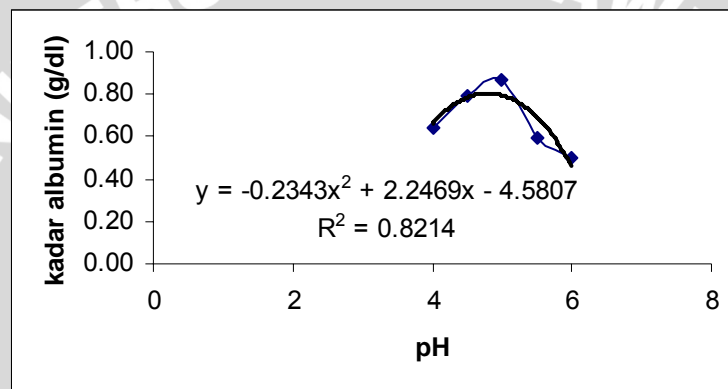
Tabel 7. Kadar Albumin Endapan

Perlakuan (pH)	Rerata (g/dl)	Notasi
5	0,86	c
4,5	0,79	c
4	0,64	b
5,5	0,59	b
6	0,50	a

Pada Tabel 7 dapat diketahui bahwa kadar albumin endapan tertinggi terdapat pada perlakuan pH 5 yaitu sebesar 0,86 g/dl. Perlakuan pH 5 nilainya tidak berbeda nyata dengan perlakuan pH 4,5, namun berbeda nyata dengan perlakuan pH 4 dan pH 5,5. Perlakuan pH 6 berbeda nyata dengan perlakuan lainnya.

Penambahan pH ammonium sulfat berpengaruh terhadap kadar albumin endapan, sehingga dilanjutkan analisa hubungan antara perlakuan dan parameter tersebut. Hasil analisa hubungan antara pH ammonium sulfat dan kadar albumin endapan menunjukkan bahwa koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,8214 dan koefisien korelasi (r) sebesar 0.9063. Artinya, penambahan pH berpengaruh nyata terhadap kadar albumin endapan. Nilai korelasi berkisar pada nilai -1 sampai +1. Nilai 0 atau mendekati 0 berarti mempunyai hubungan lemah atau tidak berhubungan. Nilai +1 atau mendekati +1 mempunyai nilai positif dan kuat. Nilai -1 atau mendekati -1 mempunyai hubungan kuat tetapi negatif (Dajan, 1996).

Hasil analisa hubungan pH ammonium sulfat dengan kadar albumin endapan menunjukkan hubungan tidak searah, artinya peningkatan pH tidak diikuti peningkatan kadar albumin endapan dengan persamaan $y = -0,2343x^2 + 2,2469x - 4,5807$. Pada pH diatas 5 kadar albumin semakin menurun. Hal ini dikarenakan pada pH di atas titik isoelektriknya, albumin banyak terlarut sebagai globulin (Widyarti, 2000). Grafik hubungan kadar albumin dengan pH disajikan pada Gambar 23. Data statistik rendemen pellet disajikan pada Lampiran 3.



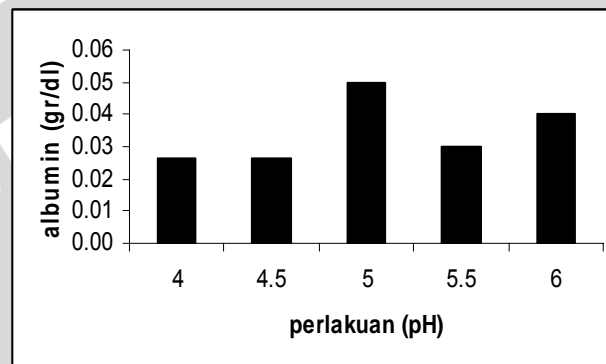
Gambar 23. Grafik Hubungan Kadar Albumin Endapan dengan pH

4.3.2 Kadar Albumin Supernatan

Pengujian kadar albumin pada supernatan bertujuan untuk mengetahui kadar albumin yang belum dapat terendapkan oleh ammonium sulfat. Karakteristik protein yang berbeda-beda menyebabkan banyak variasi prosedur pemisahan antara lain dipengaruhi oleh kelarutan, pH, kekuatan ion, ukuran molekul dan kekuatan tarik-menarik dengan molekul lain. Oleh karena sulitnya mengontrol faktor-faktor tersebut maka proses pemisahan dengan penambahan ammonium sulfat tidak dapat mengendapkan albumin secara keseluruhan (Voet *et al*, 1990).

Kadar albumin supernatan ikan gabus dari hasil penelitian berkisar antara 0,03 g/dl (pada pH 4 ; 4,5; 5,5) sampai 0,05 g/dl (pada pH 5). Penambahan ammonium sulfat pH 5 menghasilkan albumin tertinggi sebesar 0, 05 g/dl. Sedangkan albumin terendah dihasilkan dengan penambahan ammonium sulfat pH 4 ; 4.5 ;5,5 yaitu sebesar 0,03 g/dl.

Rerata albumin supernatan dapat dilihat pada Gambar 24.



Gambar 24. Rerata Kadar Albumin Supernatan

Dari Gambar 24 menunjukkan bahwa terjadi kenaikan kadar albumin dari 0,03 g/dl (pada pH 4 dan 4,5) ke 0,05 g/dl (pada pH 5), penurunan terjadi dari 0,05g/dl (pada pH 5) ke 0,03 g/dl (pada pH 5,5) dan kenaikan kembali terjadi dari 0,03 g/dl ke 0,04 g/dl (pada pH 6). Rendahnya kadar albumin pada supernatan dapat disebabkan oleh banyaknya albumin yang mengendap sebagai pellet. Pada penambahan garam tinggi, kekuatan ionik garam semakin kuat sehingga garam lebih dapat mengikat molekul air. Dengan demikian tidak cukup air yang terikat pada protein sehingga gaya tarik menarik antar molekul protein lebih menonjol dibandingkan dengan tarik menarik antar air dan protein. Dalam kondisi seperti itu terjadi pengendapan (Widyarti, 2000).

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH tidak memberi pengaruh nyata terhadap perubahan kadar albumin supernatan ikan gabus F hitung $(1,45) < F$ tabel 5% (3,48). Hasil analisa lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Kadar Albumin Supernatan

Perlakuan (pH)	Rerata (g/dl)	Notasi
5	0,05	b
6	0,04	b
5,5	0,03	b
4	0,03	b
4,5	0,03	b

Pada Tabel 8 dapat diketahui bahwa kadar albumin supernatan tertinggi terdapat pada perlakuan pH 5 yaitu sebesar 0,05 g/dl. Perlakuan pH 4 sampai pH 6 tidak berbeda nyata. Hal ini dapat disebabkan pada pH isoelektrik albumin mengendap sebagai pellet dan globulin larut sebagai supernatan. Titik isoelektrik albumin berkisar antara 4,6-4,9, tergantung jenis spesiesnya (deMan, 1989). Disamping itu, metode pengendapan untuk pemisahan suatu jenis protein hanya dapat terjadi sekitar 40% dari total protein yang ada (Janson *et al*, 1998). Data statistik rendemen pellet disajikan pada Lampiran 4.

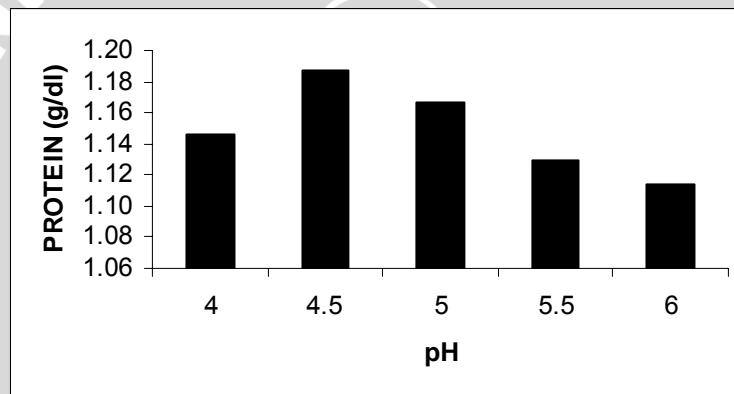
4.4 Kadar Protein

4.4.1 Kadar Protein Endapan

Protein bersifat labil dan dapat dilakukan modifikasi dalam suatu larutan dengan adanya perubahan terhadap pH, penambahan garam dan solven (White *et al*, 1959). Kadar protein total dalam serum pada orang dewasa berkisar antara 6-8,2 g/dl. Protein

total dalam serum darah merupakan campuran berbagai protein yang masing-masing mempunyai fungsi yang berlainan. Protein merupakan mikromolekul dan tidak dapat menembus membran pembuluh darah, sehingga berperan untuk mempertahankan osmotik darah (Soewoto *et al*, 2001).

Kadar protein dari hasil penelitian berkisar antara 1,11 g/dl (pada pH6) sampai 1,19 g/dl (pada pH 4,5). Penambahan ammonium sulfat pH 6 merupakan nilai terendah yaitu 1,11 g/dl, sedangkan nilai tertinggi pada penambahan ammonium sulfat pH 4,5 yaitu sebesar 1,19 g/dl. Rerata Protein disajikan pada Gambar 25.



Gambar 25. Rerata Kadar Protein Endapan

Dari Gambar 25 menunjukkan bahwa terjadi kenaikan kadar protein dari 1,15 g/dl (pada pH 4) ke 1,19 g/dl (pada pH 4,5), penurunan terjadi dari 1,17g/dl (pada pH 5) ke 1,11 g/dl (pada pH 6). Kadar protein endapan mencapai nilai tertinggi pada pH 4,5 – 5 hal ini dikarenakan titik isoelektrik albumin berada pada pH 4,6-4,9 (deMan, 1989). Sehingga banyak albumin terendapkan yang menyumbang nilai total protein pada pH tersebut.

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH tidak memberi pengaruh nyata terhadap perubahan kadar protein endapan ikan F hitung ($0,06 < F$ tabel 5% (3,48). Hasil analisa lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Kadar Protein Endapan

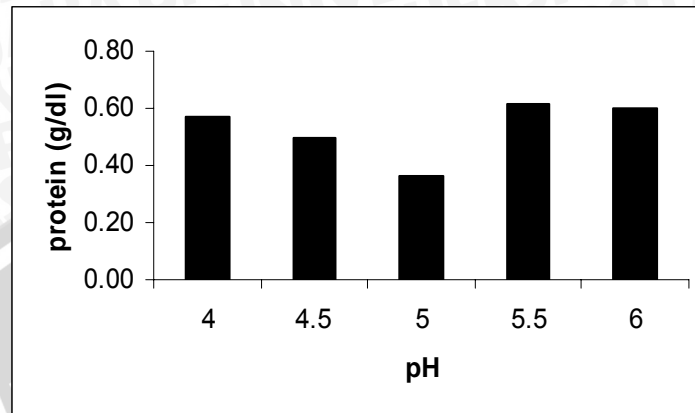
Perlakuan (pH)	Rerata (g/dl)	Notasi
4,5	1,19	ab
5	1,17	ab
4	1,15	ab
5,5	1,13	ab
6	1,11	ab

Pada Tabel 9 dapat diketahui bahwa kadar protein endapan tertinggi terdapat pada perlakuan pH 4,5 yaitu sebesar 1,19 g/dl. Perlakuan pH 4 sampai pH 5,5 tidak berbeda nyata dengan perlakuan pH 6. Hal ini dikarenakan adanya faktor lain yang lebih berpengaruh, yaitu berat molekul, konsentrasi dan temperatur (Widyarti, 2000). Kelarutan protein dipengaruhi oleh kondisi lingkungannya, yang merupakan penerapan dari keseimbangan termodinamika dari interaksi antara pelarut protein dan protein-protein yang berhubungan dengan perubahan energi bebas yang timbul dari interaksi hidrofил dan hidrofobik antar protein dengan molekul air yang mengelilinginya, pada kemampuan hidrofobik rendah, kelarutan protein meningkat sehingga protein yang terendap berkurang (Modler *et al*, 2006). Data statistik protein endapan disajikan pada Lampiran 5.

4.4.2 Kadar Protein Supernatan

Kadar protein supernatan dari hasil penelitian berkisar antara 0,36 g/dl (pada pH 5) sampai 0,62 g/dl (pada pH 5,5). Penambahan ammonium sulfat pH 5 merupakan nilai

terendah yaitu 0,36 g/dl, sedangkan nilai tertinggi pada penambahan ammonium sulfat pH 5,5 yaitu sebesar 0,62 g/dl. Rerata Protein disajikan pada Gambar 26.



Gambar 26. Rerata Kadar Protein Supernatan

Dari Gambar 26 menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar protein supernatant dari 0,57 g/dl (pada pH 4) ke 0,36 g/dl (pada pH 5), kenaikan terjadi dari 0,36g/dl (pada pH 5) ke 0,62 g/dl (pada pH 5,5), penurunan kembali terjadi dari 0,62 g/dl (pada pH 5,5) ke 0,60 g/dl (pada pH 6). Kadar protein supernatan dipengaruhi oleh fraksi globulin yang terdapat dalam larutan. Kadar globulin didapatkan dari pengurangan kadar protein total dengan kadar albumin. Analisis total protein dalam serum, selain menggunakan non protein nitrogen, menggunakan estimasi total albumin dengan globulin (Harper *et al*, 1979). Denaturasi protein dapat terjadi karena ada pelipatan atau pembalikan molekul protein yang terjadi bila larutan protein telah mendekati titik isoelektrik (Winarno, 1992).

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH tidak memberi pengaruh nyata terhadap perubahan kadar protein supernatan ikan gabus F hitung ($1,4 < F$ tabel 5% (3,48). Hasil analisa lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Kadar Protein Supernatan

Perlakuan (pH)	Rerata (g/dl)	Notasi
5,5	0,62	b
6	0,60	b
4	0,57	b
4,5	0,50	b
5	0,36	b

Pada Tabel 10 dapat diketahui bahwa kadar protein supernatan tertinggi terdapat pada perlakuan pH 5,5 yaitu sebesar 0,62 g/dl. Perlakuan pH 4 sampai 5,5 tidak berbeda nyata dengan perlakuan pH 6. Berdasarkan hasil tersebut, penggunaan ammonium sulfat pada pH 4 sampai 6 tidak memberi pengaruh nyata pada kestabilan protein. Stabilitas protein yang dihasilkan dari hasil pemurnian tergantung dari jenis dan konsentrasi garam yang digunakan dalam pemurnian (Arnfield *et al*, 1986). Data statistik protein supernatan disajikan pada Lampiran 6.

4.5 Perlakuan Terbaik

Penentuan perlakuan terbaik dilakukan menggunakan metode indeks efektivitas (DeGarmo *et al*, 1984). Perlakuan penambahan ammonium sulfat pH 5 menunjukkan nilai efektivitas paling tinggi pada endapan, yaitu 0,67 dengan karakteristik sebagai berikut: kadar protein sebesar 1,17 g/dl; kadar albumin sebesar 0,86 g/dl dan rendemen sebesar 46%. Sedangkan perlakuan terbaik pada supernatan adalah 0,82 pada perlakuan ammonium sulfat pH 6, dengan karakteristik sebagai berikut: kadar protein sebesar 0,60 g/dl; kadar albumin sebesar 0,04 g/dl; dan rendemen sebesar 90%. Tabel Data Perlakuan Terbaik disajikan pada Lampiran 7.

4.6 Profil Asam Amino

Protein mengandung asam amino. Asam amino dapat digolongkan dalam 2 kelompok yaitu asam amino essensial dan non essensial (Poedjiadi, 1994). Kandungan total asam amino albumin ikan gabus dengan metode pengendapan ammonium sulfat sebesar 82,586 %. Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa pada hasil pengendapan albumin ikan gabus dihasilkan 10 asam amino essensial, yaitu histidin, arginin, treonin, metionin, valin, phenil alanin, triptofan, isoleusin, leusin, lisin. Selain itu terdapat 6 asam amino non essensial, yaitu asam aspartat, asam glutamat, serin, glisin, alanin, dan tyrosin. Total asam amino yang terdapat pada penelitian ini adalah 16 jenis asam amino. Asam amino albumin hasil pengendapan tidak selengkap asam amino pada ekstrak albumin kasar. Karena pada ekstrak albumin kasar, terdapat 20 jenis asam amino. Hal ini dikarenakan ada beberapa asam amino yang tidak muncul pada saat pembacaan. Asam amino tersebut adalah ammonia, hidroksiprolin, prolin, dan sistein. Kandungan asam amino albumin ikan gabus dengan metode pengendapan ammonium sulfat disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Kandungan Asam Amino Albumin Ikan Gabus Endapan

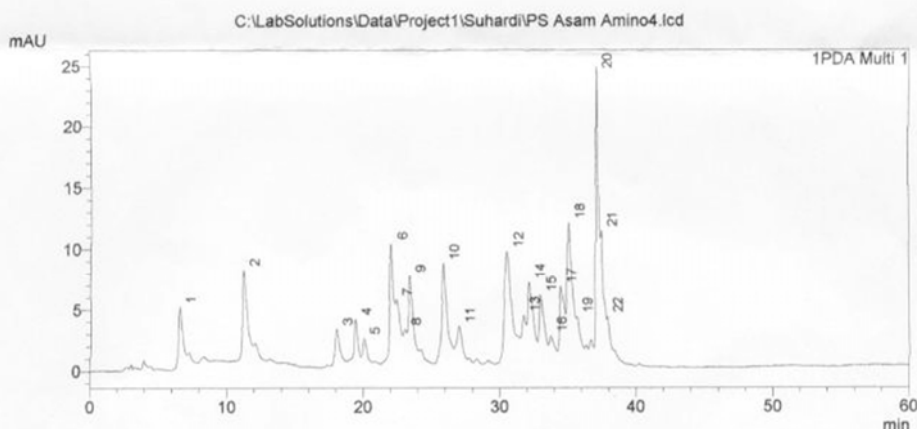
Asam Amino	Hasil Analisa (%)
As. Aspartat	5,391
As. Glutamat	2,509
Serin	2,231
Histidin *	1,475
Arginin *	5,972
Glisin	3,647
Threonin *	5,302
Alanin	6,865
Tyrosin	2,776
Triptopan *	9,793
Metionin *	2,413
Valin *	5,834
Phenil Alanin *	4,604
Iso leusin *	4,653
Leusin *	9,596
Lisin *	9,525
Total	82,586

Keterangan:

* = asam amino essensial

Berdasarkan hasil analisa HPLC, kadar asam amino tertinggi adalah Triptopan yaitu sebesar 9, 793 %. Triptofan merupakan asam amino yang mempunyai rantai cabang aromatik. Rantai cabang tersebut merupakan gugus yang tidak bermuatan dalam pH fisiologik (Winarno, 1992). Triptopan berfungsi sebagai prekursor nikotinamid (vitamin B) (Linder, 1992). Kromatogram asam amino albumin endapan disajikan pada Gambar 25 dan Tabel 12.

<Chromatogram>



Gambar 26. Kromatogram Asam Amino Albumin Endapan

Tabel 12. Tabel Pembacaan Kromatogram Albumin Endapan

No	Asam Amino	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1		6.595	109409	4957	3.175	3.373
2	As. Aspartat	11.291	185807	7422	5.391	5.051
3	As. Glutamat	18.039	86462	3110	2.509	2.116
4	Serin	19.409	76893	3855	2.231	2.623
5	Histidin	20.045	50838	2268	1.475	1.544
6	Arginin	22.043	205825	9955	5.972	6.775
7	Glisin	22.431	125698	5313	3.647	3.616
8		23.042	52325	2853	1.518	1.941
9	Threonin	23.413	182722	7239	5.302	4.927
10	Alanin	25.885	236602	8221	6.865	5.595
11	Tyrosin	26.998	95671	3050	2.776	2.076
12	Triptofan	30.528	337495	9222	9.793	6.276
13	Metionin	31.720	83156	3956	2.413	2.692
14	Valin	32.147	201064	6667	5.834	4.537
15	Phenil Alanin	32.964	158675	5618	4.604	3.823
16		33.711	65170	2289	1.891	1.558
17	Isoleusin	34.467	160354	6332	4.653	4.309
18	Leusin	35.011	330718	11593	9.596	7.889
19		35.628	90734	3847	2.633	2.618
20	Lisin	37.069	328287	24374	9.525	16.588
21		37.392	212350	10938	6.16	7.444
22		37.843	70193	3866	2.037	2.631
Total			3446448	146945	100.000	100.000

4.7 Spektrofotometer

Spektrofotometri merupakan suatu teknik analisa menggunakan alat spektrofotometer yang mekanisme kerjanya berdasarkan pada banyaknya cahaya yang diserap oleh suatu substansi larutan (Widyarti, 2000). Penyerapan cahaya oleh protein terutama disebabkan ikatan peptida, sisa tirosin, triptofan dan fenilalanin, disumbangkan oleh gugus nonprotein yang berkaitan. Dimana penyerapan maksimal untuk serum albumin manusia terlihat pada spektrum 230 nm (Montgomery *et al*, 1993).

Penelitian ini menggunakan alat spektrofotometer thermospektronik genesis 10 UV dengan panjang gelombang 595 nm dan menggunakan reagen Bradford 2ml. Pada penelitian ini dihitung kadar protein untuk mengetahui kadar protein yang terdapat pada endapan albumin ikan gabus. Berdasarkan perhitungan diperoleh hasil terbaik pada perlakuan pH 5. Sehingga analisa kadar protein dengan alat spektrofotometer dilakukan untuk perlakuan pH 5. Dari hasil analisa ini diperoleh kadar protein endapan sebesar 14,89 mg/ml. Gambar alat spektrofotometer thermospektronik genesis 10 UV disajikan pada Gambar 26.



Gambar 27. Spektrofotometer thermospektronik genesis 10 UV

4.8 Elektroforesis

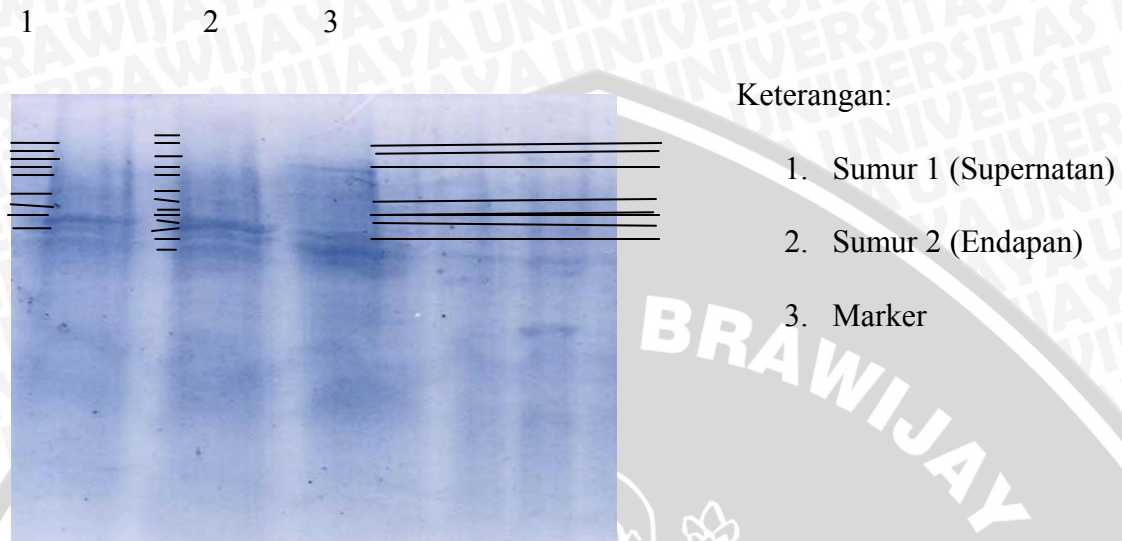
Elektroforesis adalah migrasi partikel-partikel bermuatan dalam larutan elektrolit yang terjadi bila arus listrik dilewatkan melalui larutan. Berbagai komponen protein seperti plasma, pada nilai pH diatas dan dibawah titik isoelektriknya akan bermigrasi dengan berbagai kecepatan dalam larutan tersebut karena mempunyai muatan yang berbeda (Harper *et al*, 1979).

Penggunaan elektroforesis pada penelitian ini menggunakan prinsip bahwa banyak molekul biologi bermuatan listrik yang besarnya tergantung pada pH dan komposisi medium dimana molekul biologi tersebut terlarut. Bila molekul biologi berada dalam suatu medan listrik, molekul biologi yang bermuatan positif akan akan bermigrasi ke elektroda negatif dan sebaliknya (Widyarti, 2000).

Elektroforesis biasanya memerlukan media penyangga sebagai tempat bermigrasinya molekul biologi. Media penyangga bermacam-macam tergantung pada tujuan dan bahan yang akan dianalisa. Media penyangga yang sering dipakai dalam elektroforesis antara lain kertas dan gel. Gel yang dipakai dapat berupa pati, agarosa ataupun poliakrilamid. Gel poliakrilamid dapat dibentuk sebagai silinder dalam tabung atau sebagai lembaran dalam lempengan kaca. Dalam perangkat elektroforesis, gel diletakkan diantara dua buffer chamber sebagai sarana yang menghubungkan kutub negatif dan kutub positif (Fatchiyah *et al*, 2006).

Gel setelah proses elektroforesis diwarnai dengan Commasie Brilliant Blue R-250 untuk mengetahui pita protein yang terbentuk. Pita-pita yang terbentuk dibandingkan dengan pita pada standart (marker). Nilai Rf (redaction faktor), diperoleh dari protein standart yang telah diketahui berat molekulnya. Rf standart dihubungkan dengan berat

molekul standart yang menghasilkan titik-titik dan setelah dihubungkan didapatkan suatu hubungan linier. (Ilminingtyas *et al*, 2003).



Gambar 28. Elektroforegram Protein Endapan dan Supernatan

Dari hasil analisis elektroforesis pada albumin endapan dan supernatant diperoleh elektroforegram yang menunjukkan pita-pita protein protein standart (marker) dijadikan standar untuk menentukan berat molekul dari setiap pita protein yang terbentuk dalam gel poliakrilamid. Gambar elektroforesis disajikan pada Gambar 27. Adapun jenis protein pada marker disajikan pada Lampiran 8. Dari kurva standart berat molekul protein standart dapat diperoleh persamaan regresi linear ($y = -1,7443x + 2,7838$) dimana $y = \log$ berat molekul dan $x = R_f$. Persamaan ini digunakan untuk menentukan berat molekul dari pita-pita protein yang terbentuk pada endapan dan supernatant. Contoh perhitungan berat molekul protein disajikan pada Lampiran 8.

Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh hasil bahwa pada endapan albumin ikan gabus dengan pengendapan ammonium sulfat terdapat 13 pita protein yang mengandung protein dengan kisaran berat molekul 11,7279-102,5623 kDa. Untuk

supernatan terdapat 9 pita protein yang mengandung protein dengan kisaran berat molekul 21,8227-61,9070 kDa. Jenis-jenis protein yang dapat diidentifikasi pada endapan dan supernatan disajikan pada Tabel 13 dan 14.

Tabel 13. Identifikasi Jenis Protein Endapan

Endapan		
No Pita	Berat Molekul (kDa)	Jenis Protein
1	102,5623	C ₂ Component
2	85,0420	α ₁ Glycoprotein
3	66,5672	Albumin
4	55,7961	Transcortin
5	49,9014	3.1S Leucine-rich α ₂ -glycoprotein
6	35,6961	β ₂ Glycoprotein III
7	26,6623	α ₁ Microglobulin
8	24,1918	Factor D
9	23,3357	γ Bence Jones Protein
10	20,7200	Retinol Binding Protein
11	14,3489	Lysozyme
12	13,3998	Post γ globulin
13	11,7279	B ₂ Microglobulin

Tabel 14. Identifikasi Jenis Protein Supernatan

Supernatan		
No Pita	Berat Molekul (kDa)	Jenis Protein
1	61,9070	Prealbumin
2	58,0016	Antithrombin III
3	54,3413	α Amtitrypsin
4	48,8607	β ₂ Glycoprotein I
5	40,5994	α ₁ Acid Glycoprotein
6	35,1528	β ₂ Glycoprotein III
7	26,4436	α ₁ Microglobulin
8	24,3539	Factor D
9	21,8227	Retinol Binding Protein

Dari Tabel diatas diketahui bahwa tidak semua albumin terendapkan, masih ada jenis prealbumin yang terdapat pada supernatan. Pada endapan juga masih terdapat globulin yaitu α_1 Microglobulin, Post γ globulin dan B_2 Microglobulin. Hal ini menunjukkan bahwa masih terdapat jenis protein lain pada endapan albumin ikan gabus. Karakteristik protein yang berbeda-beda menyebabkan banyak variasi prosedur pemisahan antara lain dipengaruhi oleh kelarutan, pH, kekuatan ion, ukuran molekul dan kekuatan tarik-menarik dengan molekul lain. Oleh karena sulitnya mengontrol faktor-faktor tersebut maka proses pemisahan dengan penambahan ammonium sulfat tidak dapat mengendapkan albumin secara keseluruhan (Voet *et al*, 1990).



5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Perlakuan pH ammonium sulfat berpengaruh nyata terhadap kadar albumin pellet.
Perlakuan pH ammonium sulfat tidak memberi pengaruh nyata terhadap rendemen dan kadar protein pellet dan supernatan
2. Perlakuan dengan menggunakan ammonium sulfat pH 5 merupakan perlakuan terbaik yaitu dengan kadar protein sebesar 1, 17 g/ dl: kadar albumin sebesar 0,86 g/dl dan rendemen sebesar 46% Perlakuan dengan menggunakan ammonium sulfat pH 5 merupakan pH optimal pada pengendapan albumin pellet

5.2. Saran

Dari hasil penelitian disarankan agar:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang metode pengendapan albumin untuk mendapatkan albumin dengan rendemen dan kadar terbaik
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan zat pelarut lain untuk mengendapkan albumin secara maksimal

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 1979. Peraturan Pemerintah no.11 Tahun 1979 Tentang : Keselamatan Kerja Pada Pemurnian dan Pengolahan Minyak dan Gas Bumi. LN 1979/18; TLN No. 3135
- _____, 2003. Ikan haruan, Obat mujarab untuk Luka. <http://www.kompas>
- _____, 2006^a. *Channa striata* (Snakehead Murrel). <http://fishbase.org>
- _____, 2006^b. Ikan Gabus. http://id.wikipedia.org/wiki/Ikan_gabus
- _____, 2006^c. Albumin. Li-Tech Zone Industrielle. France.
- _____, 2006^d. Albumin. http://www.medinnovation.de/background/alb_struc.htm
- Apriyantono, A., 2002. Pengolahan Terhadap Nilai Gizi dan Keamanan Pangan. Seminar Online Kharisma ke-2.
- Arnfield, S. D; Murray, E. D. and M.A. H. Ismond., 1986. Effect of Salt on the Thermal Stability of Storage Protein from Fababean (*Vice faba*). J. Food Sci., 51 : 15-20
- Bernasconi, G., H. Gerster, H. Hauser, H. Stauble and E. Scheiner., 1995. Teknologi Kimia Bagian 1. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Brody, J., 1965., Fishery By-Products Technology. Westport, Connecticut The Avi Publishing Company Inc.
- Ciptarini, D.A dan Nina D., 2006. Ekstraksi Crude Albumin Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*) Dengan Menggunakan Ekstraktor Vakum. Laporan Akhir. Politeknik Negeri Malang. Malang
- Dajan, A. 1996. Pengantar Metode Statistik II. PT Pustaka LP3ES. Jakarta.
- de Garmo, E. P., W. G. Sullivan, J. R. Canada., 1984. Engineering Economy. Mac Millan Publishing Company. New York
- de Man, John M., 1989. Kimia Makanan. Institut Teknolohi Bandung. Bandung.
- Fatchiyah., Arumingtyas, E, L., Widyarti, S., dan Rahayu, S., 2006. Analisa Biologi Molekuler. Isolasi DNA, PCR dan RFLP, SDS-PAGE, Immunoblotting dan Isoenzym. Jurusan Biologi. Universitas Brawijaya. Malang.

- Foegeding, E.A., C.E. Allen and W.R. Dayton., 1986. Effect of Heating Rate on Thermally Formed Myosin, Fibrinogen and Albumin Gels. *Journal Food Science*. Vol. 51. No.1.
- Girindra, Aisjah., 1990. *Biokimia 1*. PT. Gramedia . Jakarta.
- Handoko, Iwan., 2006. Protein Plasma. [Http://www.klinikku.com](http://www.klinikku.com)
- Harper, H.A; W.W. Rodwell and P.A. Mayes., 1979. *Biokimia Review of physiological Chemistry – diterjemahkan oleh Martin Muliawan*. San Fransisco.
- Hasbullah., 2000. *Teknologi Tepat Guna Untuk Agroindustri Kecil Sumatra Barat*. Dewan Ilmu Pengetahuan Sumatra Barat. Padang.
- Ilminingtyas, D.; Suwedo H dan Djagal W.M., 2003. Fraksinasi Protein Ikan Selama Fermentasi Awal Pada Pemedaan. Seminar Nasional dan Pertemuan Tahunan Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI) – Peranan Industri dalam Pengembangan Produk Pangan indonesia. Yogyakarta.
- Janson, J., C., dan Ryden, L., 1998. *Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications*. John Willey and Son, inc. Canada.
- Jones, U. S., 1982. *Fertilizer and Soil Fertility*. Reston Publishing Company. A Prentice Hall Company. Reston Virginia.
- Khak, Muhammad., 2007. *Panduan Praktikum Biokimia*. Universitas Gajahmada. Yogyakarta.
- Ketaren, S., 1985. *Minyak dan Lemak Pangan* . UI-Press. Jakarta.
- Kusnawijaya., 1981. *Biokimia*. Alumni Press. Jakarta.
- Levieux, D, Levieux A. and Venien A., 1995. Immunochemical Quantication of Heat Denaturation of Bovine Meat Soluble Protein. *Journal Food Science*. Vol. 60 No. 4.
- Linder., Maria, C., 1992. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian secara Klinis*. Alih Bahasa: Aminuddin Parakkasi. Universitas Indonesia Presas. Jakarta.
- Makmur, S., 2006. *Pemanfaatan dan pelestarian Ikan Gabus*. Adan Riset Kelautan dan Perikanan. Palembang.
- Modler, H. W and Nakai, S., 1996. *Food Proteins. Properties and Characterization*. VCH Publisher, Inc. New York.

- Moedjiharto, T.J; E. Suprayitno, dan B.D. Kurniawati., 2002. Pengaruh Suhu Pemanasan terhadap Kadar Albumin Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*). Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Montgomery, R., R. Dryer, T. w. Conway dan A.A. Spector., 1993. Biokimia : Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Jilid 1. Alih bahasa : M. Ismadi. Gadjahmada University Press. Yogyakarta.
- Murray, R. K., Daryl K. G., Peter A. M. dan V. M Rodwell., 2003. Harper's Biochemistry. Appleton and Large Norwolk. CT. Canada.
- Nazir, M. 1985. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Pesce, A.J and L.A. Kaplan., 1987. Methode in Critical Chemistry. The CV. Mosby Company. Washington, DC.
- Poedjiadi, A. 1994. Dasar-Dasar Biokimia. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Puspitasari, Y, E., 2007. Pengaruh Suhu dan lama Pemanasan dengan Menggunakan Ekstraktor Vakum Terhadap Crude Albumin Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*). Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Raghavachari, K and J. Reilly., 2005. Principles of Chemistry and Biochemistry 1. Laboratory Fall. Indiana University. Indiana.
- Saanin, H., 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Penerbit Liberty. Jakarta.
- Sadjok, J., Pozarkova, D., Rauch, P. and J. Kas., 1989. Thermal Denaturation of Hen Egg White Studied by Chomatografic and Immunochemical Techniques. *J. Sci.*, 54 : 906-908.
- Setyawijaya, D., 1987. Pupuk dan Pemupukan. CV Simplex. Jakarta.
- Soewoto, H., Saikin, M., Kurniati, S., I., Retno, D., Abadi, P., Prijanti, A., R., Harahap, I., P., dan Jusman, S., W., 2001. Biokimia. Eksperimen Laboratorium. Widya Medika. Jakarta.
- Sudarmadji, S., Bambang H. dan Suhardi., 2003. Analisa Bahan Makanan Dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Sugiono. 2002. Pengaruh Suhu Dan Lama Pengukusan Terhadap Kadar Albumin Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*). Skripsi. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang.
- Sugito, Y. 1995. Metodologi Penelitian. Lembaga Penerbitan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.

- Tandra, H., H. W. Soemarto., H. A. Tjokropawiro., 1988. *Metabolisme dan Aspek Klinik Albumin*. Medika No. 3.
- Thenawijaya. 1987. *Dasar-dasar Biokimia Pangan dan Gizi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Voet, D., and Voet, Judith, G., 1990. *Biochemistry*. John Willey and Sons. New York.
- Walpole, R.E., 1982. *Pengantar Statistik*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- White, A., Handler, P., and Smith, E, L., 1959. *Principles of Biochemistry*. Mc Graw-Hill Book Company. London.
- Widyarti, S. 2000. *Isolasi Protein dan Elektroforesis. Pedoman Praktikum*. Jurusan Biologi-Fakultas MIPA-universitas Brawijaya. Malang.
- Winarno, F.G., Srikandi Fardiaz dan Dedi Fardiaz., 1980. *Pengantar Teknologi Pangan*. Gramedia Pustaka Tama. Jakarta.
- Winarno, F.G., 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Tama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, Muhammad. 1989. *Biokimia*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Yitnosomarto, S. 1993. *Percobaan Perancangan, Analisi dan Interpretasinya*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Lampiran 1. Perhitungan Rendemen Endapan

RENDEMEN ENDAPAN

Tabel Rerata Rendemen

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
pH 4	60	38	64	162	54
pH 4,5	48	20	24	92	30.67
pH 5	24	62	52	138	46.00
pH 5,5	30	54	60	144	48
pH 6	16	46	28	90	30

FK = 13.132
 JK Total = 3990.93
 JK Perlakuan = 1404.27
 JK Acak = 2586.67

ONE-WAY AOV FOR RENDEMEN BY PH

SOURCE	DF	SS	MS	Fhitung	P
BETWEEN	4	1404.27	351.067	1.36	0.3156
WITHIN	10	2586.67	258.667		
TOTAL	14	3990.93			

PH	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	54.000	3	14.000
2	46.000	3	19.698
3	30.667	3	15.144
4	48.000	3	15.875
5	30.000	3	15.100
TOTAL	41.733	15	16.083

LSD (T) PAIRWISE COMPARISONS OF MEANS OF RENDEMEN BY PH

PH	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
1	54.000	I
4	48.000	I
2	46.000	I
3	30.667	I
5	30.000	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL T VALUE	2.228
REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	29.259
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	13.132

Keterangan:

- DF = Degree of Free
- SS = Sum Square
- MS = Mean Square
- F = Frequency
- P = Probalility



Lampiran 2. Perhitungan Rendemen Supernatan

RENDEMEN SUPERNATAN

Tabel Rerata Rendemen Supernatan					
Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
pH 4	80	87.33	78.67	246	82
pH 4,5	84	93.33	92	269.33	89.78
pH 5	92	79.33	82.67	254	84.67
pH 5,5	90	82	80	252	84.00
pH 6	94.67	84.67	90.67	270.01	90.00

FK = 4.1743

JK Total = 444.387

JK Perlakuan = 183.019

JK Acak = 261.368

ONE-WAY AOV FOR RENDEMEN BY PH

SOURCE	DF	SS	MS	Fhitung	P
BETWEEN	4	183.019	45.7548	1.75	0.2153
WITHIN	10	261.368	26.1368		
TOTAL	14	444.387			

PH	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	82.000	3	4.6644
2	84.667	3	6.5668
3	89.777	3	5.0467
4	84.000	3	5.2915
5	90.003	3	5.0332
TOTAL	85.889	15	5.1124

LSD (T) PAIRWISE COMPARISONS OF MEANS OF RENDEMEN BY PH

PH	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
5	90.003	I
3	89.777	I
2	84.667	I
4	84.000	I
1	82.000	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL T VALUE	2.228
REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	9.3009
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	4.1743

- Keterangan:
- DF = Degree of Free
 - SS = Sum Square
 - MS = Mean Square
 - F = Frequency
 - P = Probalility



Lampiran 3. Perhitungan Kadar Albumin Endapan

KADAR ALBUMIN ENDAPAN

Tabel Rerata Albumin Endapan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
pH 4	0.6	0.66	0.67	1.93	0.64
pH 4,5	0.86	0.77	0.75	2.38	0.79
pH 5	0.88	0.86	0.85	2.59	0.86
pH 5,5	0.59	0.57	0.62	1.78	0.59
pH 6	0.5	0.51	0.5	1.51	0.50

FK = 0.0322

JK Total = 0.27109

JK Perlakuan = 0.25956

JK Acak = 0.01153

ONE-WAY AOV FOR ALBUMIN BY PH

SOURCE	DF	SS	MS	F hitung	P
BETWEEN	4	0.25956	0.06489	56.26	0.0003
WITHIN	10	0.01153	0.00155		
TOTAL	14	0.27109			

PH	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	0.6433	3	0.0379
2	0.7933	3	0.0586
3	0.8633	3	0.0153
4	0.5933	3	0.0252
5	0.5033	3	0.0058
TOTAL	0.6793	15	0.0286

LSD (T) PAIRWISE COMPARISONS OF MEANS OF ALBUMIN BY PH

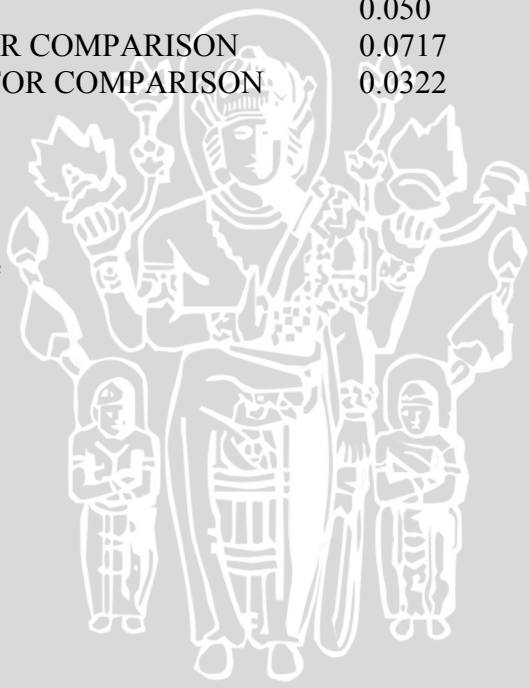
PH	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
3	0.8633	I
2	0.7933	I
1	0.6433	.. I
4	0.5933	I
5	0.5033	I

THERE ARE VERY SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS

CRITICAL T VALUE	2.228
REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.0717
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.0322

Keterangan:

- DF = Degree of Free
- SS = Sum Square
- MS = Mean Square
- F = Frequency
- P = Probalility



Lampiran 4. Perhitungan Kadar Albumin Supernatan

KADAR ALBUMIN SUPERNATAN

Tabel rerata albumin supernatan					
Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
pH 4	0.01	0.02	0.05	0.08	0.03
pH 4,5	0.03	0.01	0.04	0.08	0.03
pH 5	0.05	0.05	0.05	0.15	0.05
pH 5,5	0.02	0.02	0.05	0.09	0.03
pH 6	0.05	0.03	0.04	0.12	0.04

FK = 0.0119

JK Total = 0.00337

JK Perlakuan = 0.00124

JK Acak = 0.00213

ONE-WAY AOV FOR ALBUMIN BY PH

SOURCE	DF	SS	MS	F hitung	P
BETWEEN	4	0.00124	3.100E-04	1.45	0.2871
WITHIN	10	0.00213	2.133E-04		
TOTAL	14	0.00337			

PH	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	0.0267	3	0.0208
2	0.0267	3	0.0153
3	0.0500	3	0.0000
4	0.0300	3	0.0173
5	0.0400	3	0.0100
TOTAL	0.0347	15	0.0146

LSD (T) PAIRWISE COMPARISONS OF MEANS OF ALBUMIN BY PH

PH	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
3	0.0500	I
5	0.0400	I
4	0.0300	I
1	0.0267	I
2	0.0267	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL T VALUE	2.228
REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.0266
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.0119

- Keterangan:
- DF = Degree of Free
 - SS = Sum Square
 - MS = Mean Square
 - F = Frequency
 - P = Probalility



Lampiran 5. Perhitungan Kadar Protein Endapan

KADAR PROTEIN ENDAPAN

Tabel Rerata Protein Endapan					
Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
pH 4	0.86	1.3	1.28	3.44	1.15
pH 4,5	0.89	1.32	1.35	3.56	1.19
pH 5	0.94	1.24	1.32	3.5	1.17
pH 5,5	0.94	1.32	1.13	3.39	1.13
pH 6	1.01	1.21	1.12	3.34	1.11

FK = 0.1690

JK Total = 0.43857

JK Perlakuan = 0.01011

JK Acak = 0.42847

ONE-WAY AOV FOR PROTEIN BY PH

SOURCE	DF	SS	MS	Fhitung	P
BETWEEN	4	0.01011	0.00253	0.06	0.9925
WITHIN	10	0.42847	0.04285		
TOTAL	14	0.43857			

PH	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	1.1467	3	0.2485
2	1.1867	3	0.2574
3	1.1667	3	0.2003
4	1.1300	3	0.1900
5	1.1133	3	0.1002
TOTAL	1.1487	15	0.2070

LSD (T) PAIRWISE COMPARISONS OF MEANS OF PROTEIN BY PH

PH	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
2	1.1867	I
3	1.1667	I
1	1.1467	I
4	1.1300	I
5	1.1133	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL T VALUE	2.228
REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.3766
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1690

Keterangan:

- DF = Degree of Free
- SS = Sum Square
- MS = Mean Square
- F = Frequency
- P = Probalility



Lampiran 6. Perhitungan Kadar Protein Supernatan

KADAR PROTEIN SUPERNATAN

Tabel Rerata Protein Supernatan					
Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
pH 4	0.62	0.64	0.46	1.72	0.57
pH 4,5	0.32	0.65	0.52	1.49	0.50
pH 5	0.11	0.5	0.47	1.08	0.36
pH 5,5	0.6	0.73	0.52	1.85	0.62
pH 6	0.78	0.49	0.54	1.81	0.60

FK = 0.1264

JK Total = 0.37380

JK Perlakuan = 0.13433

JK Acak = 0.23947

ONE-WAY AOV FOR PROTEIN BY PH

SOURCE	DF	SS	MS	Fhitung	P
BETWEEN	4	0.13433	0.03358	1.40	0.3018
WITHIN	10	0.23947	0.02395		
TOTAL	14	0.37380			

SAMPLE PH	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
1	0.5733	3	0.0987
2	0.4967	3	0.1662
3	0.3600	3	0.2170
4	0.6167	3	0.1060
5	0.6033	3	0.1550
TOTAL	0.5300	15	0.1547

LSD (T) PAIRWISE COMPARISONS OF MEANS OF PROTEIN BY PH

PH	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
4	0.6167	I
5	0.6033	I
1	0.5733	I
2	0.4967	I
3	0.3600	I

THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS.

CRITICAL T VALUE	2.228
REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.2815
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1264

Keterangan:

- DF = Degree of Free
- SS = Sum Square
- MS = Mean Square
- F = Frequency
- P = Probability



Lampiran 7. Perlakuan Terbaik

DATA PERLAKUAN TERBAIK

1. ENDAPAN

Perlakuan	Rerata Perlakuan Pellet					Nilai T'baik	Nilai T'jelek	Selisih
	pH 4	pH 4,5	pH 5	pH 5,5	pH 6			
protein	1.15	1.19	1.17	1.13	1.11	1.19	1.11	0.08
albumin	0.64	0.79	0.86	0.71	0.68	0.86	0.64	0.22
globulin	0.5	0.39	0.3	0.42	0.44	0.5	0.3	0.2
rendemen	54	30.67	46	48	30	54	30	24

Variabel	B V	B N	pH 4		pH 4,5		pH 5		pH 5,5		pH 6	
			Ne	Nh	Ne	Nh	Ne	Nh	Ne	Nh	Ne	Nh
			protein	1	0.33	0.5	0.17	1	0.33	0.75	0.25	0.25
albumin	0.8	0.27	0	0	0.68	0.18	1	0.27	0.32	0.08	0.18	0.05
globulin	0.5	0.17	1	0.17	0.45	0.08	0	0	0.6	0.1	0.7	0.12
rendemen	0.7	0.23	1	0.23	0.03	0.01	0.67	0.16	0.75	0.18	0.00	0.00
jumlah	3	1.00		0.57		0.60	0.67		0.44			0.17

Keterangan :

BV = Berat Variabel

BN = Berat Normal

2. SUPERNATAN

Perlakuan	Rerata Perlakuan Supernatan					Nilai T'baik	Nilai T'jelek	Selisih
	pH 4	pH 4,5	pH 5	pH 5,5	pH 6			
protein	0.57	0.5	0.36	0.62	0.6	0.62	0.36	0.26
albumin	0.03	0.03	0.05	0.03	0.04	0.05	0.03	0.02
globulin	0.55	0.47	0.31	0.59	0.56	0.59	0.31	0.28
rendemen	82	89.78	84.67	84	90	90	82	8

Variabel	B V	B N	pH 4		pH 4,5		pH 5		pH 5,5		pH 6	
			Ne	Nh	Ne	Nh	Ne	Nh	Ne	Nh	Ne	Nh
protein	1	0.33	0.81	0.27	0.54	0.18	0	0	1	0.33	0.92	0.31
albumin	0.8	0.27	0	0	0.00	0.00	1	0.27	0.00	0.00	0.50	0.13
globulin	0.5	0.17	0.86	0.14	0.57	0.10	0	0	1	0.17	0.89	0.15
rendemen	0.7	0.23	0	0	0.97	0.23	0.33	0.08	0.25	0.06	1.00	0.23
jumlah	3	1.00		0.41		0.50		0.34		0.56		0.82



Lampiran 8. Data Jenis Protein Marker

Nilai Rf

No Pita	A (mm)	B (mm)	Rf
1	49,8000	117,1999	0.424915
2	65,0000	117,1999	0.554608
3	74,6999	117,1999	0.637372
4	84,1999	117,1999	0.71843
5	93,2999	117,1999	0.796075
6	96,6998	117,1999	0.825085
7	112,9999	117,1999	0.964164

Keterangan :

A = Jarak pergerakan pita dari tempat awal (mm)

B = Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal (mm)

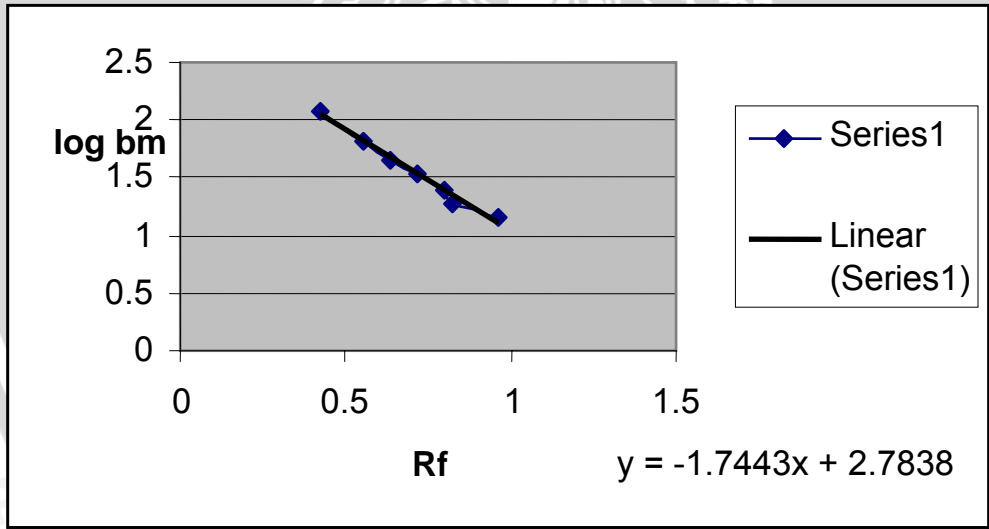
$Rf = A / B$



Data Berat Molekul Standart

Marker	Rf	Log BM	BM (kDa)
β-galaktosidase	0.424915	2.064	116
Bovine serum Albumin	0.554608	1.821	66.2
Oval Albumin	0.637372	1.653	45
Lactate dehydrogenase	0.71843	1.544	35
Restriction endonuclease	0.796075	1.398	25
β-lactoglobulin	0.825085	1.265	18.4
Lysozime	0.964164	1.158	14.4

Kurva Standar Berat Molekul



Lampiran 9. Pergerakan Pita Protein Endapan dan Supernatan

Data Jarak Pergerakan Pita Protein Endapan

Data Endapan					
No Pita	Jarak Pita / A (mm)	Jarak Warna / B (mm)	x = Rf	y = Log BM	BM (KDa)
1	49,40000	111,49983	0,44305	2,01098	102,5623
2	54,60000	111,49983	0,48969	1,92963	85,04205
3	61,40000	111,49983	0,55067	1,82326	66,56719
4	66,30000	111,49983	0,59462	1,74660	55,79612
5	69,40000	111,49983	0,62242	1,69811	49,9014
6	78,70000	111,49983	0,70583	1,55262	35,69609
7	86,80000	111,49983	0,77848	1,42589	26,66228
8	89,50000	111,49983	0,80269	1,38367	24,19178
9	90,50000	111,49983	0,81166	1,36802	23,33573
10	93,80000	111,49983	0,84126	1,31639	20,72002
11	104,00000	111,49983	0,93274	1,15682	14,34899
12	105,90000	111,49983	0,94978	1,12709	13,39981
13	109,60000	111,49983	0,98296	1,06922	11,72737

Data Jarak Pergerakan Pita Protein Supernatan

Data Supernatan					
No Pita	Jarak Pita / A (mm)	Jarak Warna / B (mm)	x = Rf	y = Log BM	BM (KDa)
1	66,60000	117,10096	0,56874	1,79174	61,90703
2	68,50000	117,10096	0,58497	1,76344	58,0016
3	70,40000	117,10096	0,60120	1,73513	54,34129
4	73,50000	117,10096	0,62767	1,68896	48,86073
5	78,90000	117,10096	0,67378	1,60852	40,59943
6	83,10000	117,10096	0,70965	1,54596	35,1528
7	91,40000	117,10096	0,78053	1,42232	26,44356
8	93,80000	117,10096	0,80102	1,38657	24,35398
9	97,00000	117,10096	0,82835	1,33891	21,82277

Lampiran 10. Contoh Perhitungan Berat Molekul Protein

Persamaan:

$$y = -1,7443x + 2,7838$$

dimana $x = R_f$

$$x = A/B$$

 $A =$ Jarak pergerakan pita dari tempat awal (mm) $B =$ Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal (mm)

$$y = \text{Log BM}$$

Contoh perhitungan pada protein endapan pita 1, $x = 0,44305$ Sehingga $y = -1,7443x + 2,7838$

$$y = -1,7443 (0,44305) + 2,7838$$

$$y = 2,01098$$

Karena $y = \text{Log BM} = 2,01098$

Maka Berat Molekul (BM) Protein = anti Log BM = 102, 5623 KDa