

**PENGARUH KONSENTRASI AMMONIUM SULFAT PADA
PRESIPITASI ALBUMIN IKAN GABUS (*Ophiocephalus striatus*)**

**LAPORAN SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**

Oleh :

FATONI RAHMAN

0210830033



**FAKULTAS PERIKANAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2007

**PENGARUH KONSENTRASI AMMONIUM SULFAT PADA
PRESIPITASI ALBUMIN IKAN GABUS (*Ophiocephalus striatus*)**

Oleh :
FATONI RAHMAN
0210830033

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dosen Pembimbing I

(DR. Ir. T.J. Moedjiharto, MAppSc)

(Ir. Titik Dwi Sulistiyati,MP)

Tanggal :

Tanggal :

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

(Ir. Bambang Budi S, MS)

(Ir.Sri Dayuti)

Tanggal :

Tanggal :

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**

(Ir. Maheno Sri Widodo, MS)

Tanggal :

KOMISI PENGUJI

No. 43/J.I.27/PP/2006

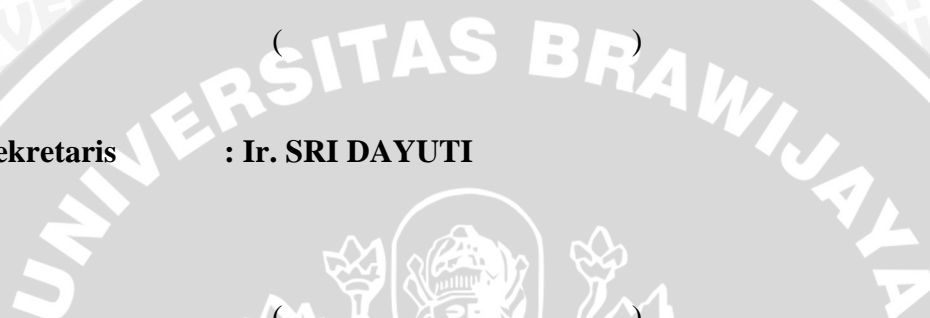
Ketua : Ir. TITIK DWI SULISTIYATI, MP

()
Sekretaris : Ir. SRI DAYUTI

()
Anggota : Dr. Ir. T.J. MOEDJIHARTO, MAppSc

()
Anggota : Ir. BAMBANG BUDI S, MS

()



RINGKASAN

FATONI RAHMAN. Skripsi. Tentang Pengaruh Konsentrasi Ammonium Sulfat Pada Presipitasi Albumin Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*) (dibawah bimbingan Ir. Titik Dwi Sulistyati, MP dan Ir. Sri Dayuti).

Albumin merupakan komponen utama dalam plasma manusia sekitar 4,5 g/dl. Albumin mempunyai fungsi utama yaitu mengangkut molekul-molekul kecil melewati plasma dan cairan sel yang erat kaitannya dengan bahan metabolisme dan berbagai macam obat yang kurang larut, serta memberikan tekanan osmotik didalam kapiler darah. Telah dilakukan penelitian untuk memperoleh albumin, namun kebanyakan masih dalam bentuk crude albumin. Salah satu cara untuk memperoleh albumin yaitu dengan menggunakan metode presipitasi penambahan larutan garam ammonium sulfat. Keterbatasan presipitasi albumin yang hanya pada serum darah manusia, maka dilakukan penelitian lanjutan mengetahui pengaruh penambahan konsentrasi ammonium sulfat pada proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dari crude albumin dengan metode salting-out.

Maksud dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada masyarakat mengenai cara memisahkan albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dari crude albumin dengan penambahan larutan ammonium sulfat. Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ammonium sulfat pada proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dan menetapkan konsentrasi ammonium sulfat yang optimum terhadap proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dengan kualitas dan rendemen yang terbaik.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan jumlah perlakuan sebanyak 5 dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Data yang dihasilkan dianalisa dengan RAL (Rancangan Acak Lengkap) sederhana dan dilakukan uji lebih lanjut dengan Uji BNT 5% serta menggunakan metode De Garmo untuk mendapatkan perlakuan terbaik.

Untuk proses ekstraksi crude albumin digunakan alat ekstraktor vakum. Pertama-tama ikan dicuci bersih dan disiangi kemudian diambil dagingnya dan dihaluskan. Ditimbang berat daging sebesar $\frac{1}{4}$ kg untuk 1 kali proses ekstraksi. Sampel daging ikan gabus kemudian dimasukkan dalam tabung sampel dari alat ekstraktor vakum dengan dilapisi kain saring, proses ekstraksi dimulai, dengan suhu 35 °C selama 12,5 menit. Crude albumin yang diperoleh kemudian disentrifuse selama 20 menit pada suhu 4 °C kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang diperoleh kemudian ditambah dengan ammonium sulfat dengan konsentrasi 50-90% dengan perbandingan (ammonium sulfat : sampel = 2 : 1) kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 0-4 °C. Selanjutnya disentrifuse kembali selama 20 menit pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm. Endapan yang diperoleh kemudian diredissolved dengan buffer phosphate pH 8.0 dan divortek sampai semua endapan tersuspensi dalam buffer phosphate, kemudian dianalisa kadar albumin dan kadar proteinnya.

Data yang dihasilkan yaitu untuk kadar protein endapan tertinggi yaitu pada konsentrasi ammonium sulfat 80%) yaitu sebesar 0,757 g/dl, dan kadar protein supernatan tertinggi yaitu pada konsentrasi ammonium sulfat 60% sebesar 1,720 g/dl. Untuk kadar albumin endapan tertinggi yaitu pada konsentrasi ammonium sulfat 80%

sebesar 0,647 g/dl, dan kadar supernatan tertinggi yaitu pada konsentrasi ammonium sulfat 60% sebesar 0,277 g/dl.

Hasil analisa data dengan menggunakan Uji BNT 5%, untuk kadar protein endapan berbeda nyata, dimana perlakuan A4 nilainya berbeda nyata dengan perlakuan A3 dan A5. Untuk kadar protein supernatan nilainya berbeda nyata, dimana perlakuan A1 dan A2 nilainya berbeda nyata dengan perlakuan A4 dan A5. Untuk kadar albumin endapan nilainya berbeda nyata dimana perlakuan A4 nilainya tidak berbeda nyata dengan perlakuan A3 dan A5, sedangkan kadar albumin supernatan nilainya berbeda nyata, dimana perlakuan A1 berbeda nyata dengan perlakuan yang lain.

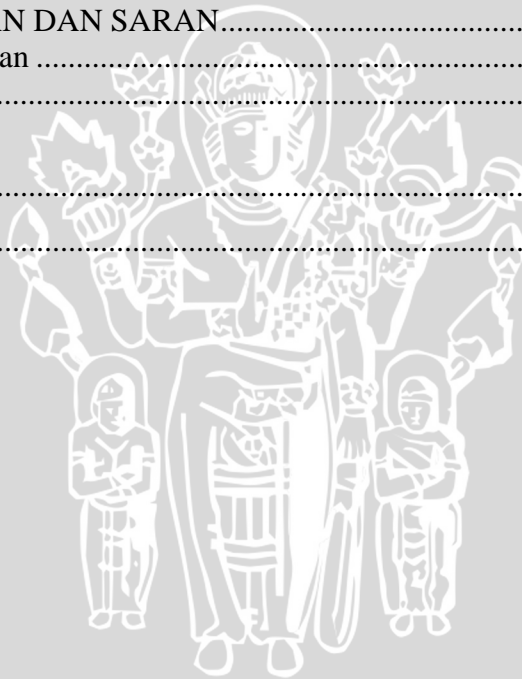
Dari berbagai data parameter uji selama penelitian dengan metode RAL sederhana ternyata menunjukkan perbedaan yang sangat nyata dari pengaruh penambahan konsentrasi ammonium sulfat terhadap presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*). Untuk mengetahui kualitas albumin hasil presipitasi maka dilakukan elektroforesis terhadap sampel dan diperoleh 10 jenis protein pada albumin endapan, dari data densitogram menunjukkan bahwa kadar albumin dalam endapan sebesar 20,3% dari total keseluruhan total protein. Penetapan perlakuan terbaik presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*). dengan metode De Garmo dihasilkan perlakuan terbaik yaitu pada konsentrasi ammonium sulfat 80%.

Dan yang dapat kami sarankan untuk kesinambungan penelitian berkelanjutan yaitu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk pemurnian albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dari hasil presipitasi dengan ammonium sulfat, hingga diperoleh albumin murni tanpa dikotori oleh komponen protein lain sehingga diperoleh albumin murni yang dapat dikonsumsi manusia dan dilakukan penelitian lanjutan mengenai jenis-jenis garam lain yang dapat digunakan untuk presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) untuk memperoleh kualitas dan rendemen albumin yang terbaik.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PERSETUJUAN	i
RINGKASAN	ii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Kegunaan Penelitian	4
1.5. Hipotesis	4
1.6. Tempat dan Waktu Penelitian	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Gambaran Umum Ikan Gabus	6
2.2. Komposisi Kimia Ikan Gabus	7
2.3. Protein	8
2.4. Albumin	10
2.5. Metode Pemisahan Protein	14
2.6. Presipitasi Albumin Dengan Ammonium Sulfat	18
2.7. Elektroforesis	22
BAB III. MATERI DAN METODE PENELITIAN	24
3.1. Materi	24
3.1.1. Bahan Penelitian	24
3.1.2. Peralatan Penelitian	25
3.2. Metode Penelitian	26
3.2.1. Variabel	26
3.2.2. Rancangan Percobaan	26
3.2.3. Analisis Data	27
3.3. Prosedur Kerja	28
3.4. Parameter Uji	32
3.4.1. Rendemen	32
3.4.2. Kadar Albumin	32

3.4.3. Kadar Protein	34
3.4.4. Spektrofotometer.....	36
3.4.5. Elektroforesis	37
3.4.6. Densitometer	40
BAB IV. PEMBAHASAN.....	41
4.1. Hasil Penelitian	41
4.2. Protein	
4.3. Albumin	46
4.4. Rendemen.....	53
4.5. Perlakuan Terbaik	54
4.6. Spektrofotometer.....	54
4.7. Elektroforesis	55
4.8. Analisis Kadar Protein Dengan Densitometer	60
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	65
5.1. Kesimpulan	65
5.2. Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN.....	70



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Daging ikan merupakan bahan biologik yang secara kimiawi sebagian besar tersusun oleh unsur-unsur organik seperti oksigen (75%), hidrogen (10%), karbon (9,5%) dan nitrogen (2,5%). Unsur-unsur tersebut merupakan penyusun senyawa protein, karbohidrat, lemak, vitamin, enzim, dan sebagainya (Hadiwiyoto, 1993). Daging ikan mengandung tiga jenis protein yaitu, protein larut (mudah dihilangkan dengan cara ekstraksi), protein jaringan ikat (stroma), dan protein kontraktile (de Man, 1997).

Protein merupakan komponen utama jaringan tubuh yang digunakan untuk pertumbuhan sel, penyusun struktur sel, memelihara membrane sel, mengatur keseimbangan air dalam jaringan, penyusun antibodi, hormon dan enzim (Winarno, 2002). Protein penyusun plasma dalam tubuh terbagi menjadi 3 kelompok utama, antara lain : albumin, globulin dan prolamin (Harper *et al.*, 1979).

Albumin merupakan komponen utama dalam plasma manusia (kurang lebih 4,5 g/dl), berbentuk elips dengan panjang 150 Å, mempunyai berat molekul bervariasi tergantung jenis spesies. Berat albumin plasma manusia 69.000, albumin telur 44.000 dan didalam daging mamalia adalah 63.000 (Murray, *et al.*, 1993).

Albumin mempunyai 2 fungsi utama yaitu mengangkut molekul-molekul kecil melewati plasma dan cairan sel yang erat kaitannya dengan bahan metabolisme dan berbagai macam obat yang kurang larut, serta memberi tekanan osmotik didalam kapiler darah (Montgomery *et al.*, 1993).

Aplikasi dari penggunaan albumin telah banyak dilakukan, antara lain dari hasil penelitian Agustini (2006), yang dilakukan pada tikus putih yang dilukai, dalam waktu

tiga hari akan mengalami penutupan luka dan kadar albumin serum sebesar 2,67 g/dl. Penelitian lain yaitu dari hasil uji coba pada instalasi gizi dan bagian bedah RSUD Dr. Syaiful Anwar Malang terhadap pasca operasi dengan kadar albumin rendah (1,8 g/dl), dengan diet 15 butir telur/hari selama 8 hari kadar albumin dapat normal kembali (Suprayitno, 2003).

Kebutuhan albumin yang semakin meningkat, dimana selama ini digunakan *Human Serum Albumin* (HSA) yang harus diimport dan harganya yang sangat mahal yang mencapai Rp. 1.300.000,- per ampul (Suprayitno, 2003). Oleh karena itu diperlukan sumber albumin lain yang harganya lebih murah dengan aspek klinis yang sama sebagai pengganti HSA yang selama ini sering digunakan.

Ikan gabus sebagai salah satu jenis ikan yang memiliki kandungan protein cukup tinggi sekitar 25,2 % (Poedjiadi, 1994), dan dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Suprayitno, *et al.*, (2005) bahwa kandungan asam amino esensial dan asam amino non esensial penyusun albumin ikan gabus memiliki kualitas yang jauh lebih baik dari albumin telur yang juga digunakan dalam penyembuhan pasien pasca bedah.

Proses ekstraksi albumin selama ini telah banyak dilakukan untuk memperoleh albumin. Namun albumin yang diperoleh kebanyakan masih dalam bentuk crude albumin. Berbagai protein globuler mempunyai daya kelarutan yang berbeda didalam air. Presipitasi protein dengan cara penambahan garam didasarkan pada pengaruh yang berbeda-beda daripada penambahan garam tersebut pada kelarutan beberapa protein globuler (Wirahadikusumah, 1981).

Berdasarkan sifat albumin menurut Krause *et al.*, (1972), bahwa albumin merupakan protein yang larut air, terkoagulasi oleh panas dan dapat diendapkan dalam larutan garam konsentrasi tinggi. Adapun jenis garam yang sering digunakan untuk

langkah pemurnian pertama isolasi protein adalah ammonium sulfat. Berbagai protein dapat larut pada konsentrasi ammonium sulfat yang berbeda-beda sesuai dengan komposisi asam aminonya (Anonymous, 2006^b). Proses presipitasi dengan penambahan garam berkonsentrasi tinggi (salting-out) hanya bersifat menarik air disekeliling protein, sedangkan molekul protein sendiri tidak mengalami perubahan kimia, maka perubahan tersebut bersifat reversibel. Kelarutan dan fungsi protein pada umumnya akan pulih kembali bila dikembalikan pada keadaan semula (Soewoto, *et.al.*, 2001).

Namun, penelitian tentang presipitasi albumin dengan ammonium sulfat masih terbatas pada serum albumin darah manusia, sedangkan pemurnian albumin ikan gabus belum pernah dilakukan. Berdasarkan penelitian sebelumnya albumin dalam serum darah dapat diendapkan pada ammonium sulfat dengan konsentrasi 50% (Lebuton, 1967). Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk menetapkan penambahan konsentrasi ammonium sulfat yang optimum pada proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dari crude albumin dengan menggunakan metode salting out protein untuk memperoleh albumin dengan rendemen dan kualitas yang terbaik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, permasalahan yang timbul yaitu :

- Apakah konsentrasi ammonium sulfat berpengaruh terhadap proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) agar diperoleh albumin dengan kualitas dan rendemen yang terbaik ?

- Berapakah konsentrasi ammonium sulfat yang optimum pada proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) yang dapat menghasilkan albumin dengan kualitas dan rendemen yang terbaik ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ammonium sulfat pada proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dengan kualitas dan rendemen yang terbaik
- Untuk menetapkan konsentrasi ammonium sulfat yang optimum terhadap proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) agar dapat menghasilkan albumin dengan kualitas dan rendemen yang terbaik

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini berguna untuk memberikan informasi kepada masyarakat, pusat penelitian, dan pusat kesehatan mengenai cara memisahkan albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dari crude albumin ikan gabus, dengan penambahan konsentrasi ammonium sulfat agar dihasilkan albumin dengan kualitas yang baik.

1.5 Hipotesa

- Penambahan ammonium sulfat dengan konsentrasi yang berbeda pada crude albumin dapat mempengaruhi presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*), sehingga dihasilkan albumin dengan kualitas dan rendemen yang terbaik

- Semakin tinggi konsentrasi ammonium sulfat yang ditambahkan pada proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) maka albumin yang akan terpresipitasi semakin meningkat.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Januari 2007-Maret 2007 di Laboratorium Biokimia dan Gizi Ikani Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Klinik Pattimura, Malang dan Laboratorium Dasar Bersama, Universitas Airlangga, Surabaya.



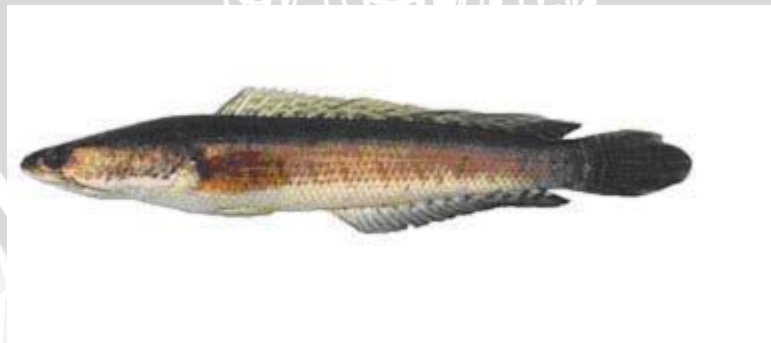
2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gambaran Umum Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*)

Menurut Asmawi, (1986), ikan gabus termasuk dalam famili *Ophiocephalidae* yang mempunyai ciri-ciri tubuh hampir bulat panjang, makin kebelakang makin pipih dan ditutupi sisik yang berwarna hitam dengan sedikit belang pada bagian punggung, sedangkan perutnya berwarna putih. Ikan gabus mempunyai sisi badan berbentuk mengarah kedepan, bagian atas umumnya tidak jelas pada jenis dewasa, tidak ada gigi bentuk taring pada vomer dan palatine, 4-5 sisik antara gurat sisi dan pangkal jari-jari sirip punggung bagian depan (Kottelat, *et al.*, 1993).

Ikan gabus mempunyai bentuk badan hampir bundar dibagian depan dan pipih dibagian belakang. Kepalanya melebar dan bersisik besar, mulutnya bersudut tajam, sirip punggung dan sirip dubur panjang dan tingginya hampir sama. Memiliki organ tambahan untuk pernafasan atau pengambilan oksigen dari udara. Mempunyai 4-5 sisik antara gurat sisi dan pangkal jari-jari sirip punggung bagian depan (Cholik, *et al.*, 2005).

Adapun gambar ikan gabus dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan gabus (*Ophicephalus striatus*)

Adapun klasifikasi ikan gabus adalah:

Filum : Chordata

Sub filum : Pisces

Kelas : Actinopterygii

Ordo : Perciformes

Famili : Channidae

Genus : *Ophiocephalus*

Spesies : *Ophiocephalus striatus*

Nama lokal : Gabus, Kutuk

Spesies lain : *Ophiocephalus wrahl*, *Ophiocephalus chena*,
Ophiocephalus planiceps (Saanin, 1984)

2.2 Komposisi Kimia Ikan Gabus

Komposisi kimiawi daging ikan yang berupa unsur-unsur tidak berdiri sendiri, melainkan merupakan senyawa sederhana dan senyawa kompleks. Senyawa-senyawa ini merupakan penyusun sel-sel jaringan, daging, dan sebagian merupakan zat-zat makanan yang berguna bagi manusia. Zat-zat tersebut adalah protein, lemak, vitamin, mineral dan sedikit karbohidrat. Komponen terbesar dalam daging adalah air kemudian disusul oleh protein, lemak, dan zat-zat lainnya (Muchtadi, *et al.*, 1992). Secara umum komposisi daging ikan terdiri dari kadar air 60-84%, protein 18-30%, lemak 0,1-2,2%, karbohidrat 0-1% dan sisanya vitamin dan mineral. Protein ikan merupakan komponen terbesar dalam jumlahnya setelah air (Afrianto dan Liviawaty 1989). Komposisi kimia ikan gabus per 100 gram bahan dapat dilihat pada Tabel 1 berikut :

Tabel 1. Komposisi Kimia Ikan Gabus (dalam 100 g bahan)

Komponen Kimia	Jenis	
	Ikan Gabus segar	Ikan Gabus Kering
Air (g)	69	24
Kalori (kal)	74	292
Protein (g)	25,2	58,0
Lemak (g)	1,7	4,0
Kalsium (mg)	62	15
Fosfor (mg)	176	100
Besi (mg)	0,9	0,7
Vit. A (SI)	150	100
Vit. B1 (mg)	0,04	0,1

Sumber : Poedjiadi, 1994

2.3 Protein

Protein adalah sumber asam-asam amino yang mengandung unsur-unsur C, H, O, dan N yang tidak dimiliki oleh lemak dan karbohidrat. Molekul protein mengandung pula fosfor belerang, dan ada jenis protein yang mengandung unsur logam seperti besi dan tembaga (Winarno, 2002).

Protein adalah zat yang sangat penting dalam sistem biologis, berperan dalam berbagai mekanisme struktural dan fungsional. Protein membentuk struktur dasar organisme seperti rambut, tendon, otot, dan kulit (Parker, 1992).

Penggolongan protein berdasarkan struktur susunan molekul dibagi menjadi 4 macam, yaitu struktur primer, sekunder, tersier, dan kuartener. Struktur primer yaitu susunan linier asam amino dalam protein. Struktur primer ini untuk menentukan tingkatan struktur berikutnya. Struktur sekunder yaitu protein dengan polipeptida yang berlipat-lipat dan merupakan bentuk tiga dimensi dengan cabang-cabang rantai polipeptida yang tersusun saling berdekatan. Struktur tersier merupakan susunan dari

struktur sekunder yang berikatan satu dengan yang lain. Struktur kuarterner melibatkan beberapa polipeptida dalam membentuk suatu protein (Davidson *et al.*, 1999).

Protein jika diklasifikasikan berdasarkan kelarutannya dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu albumin, globulin, glutelin, gliadin, histon, protamin. Albumin merupakan protein yang larut dalam air, terkoagulasi oleh panas dan dapat diendapkan dalam larutan garam konsentrasi tinggi. Globulin yaitu protein yang tidak larut dalam air murni (air bebas garam) tetap larut dalam larutan garam encer dan mengendap dalam larutan garam konsentrasi tinggi (30-50%). Glutelin adalah protein yang tidak larut dalam pelarut netral tetapi larut dalam asam atau basa encer. Gliadin yaitu protein yang larut dalam 70-80% etanol dan tidak larut dalam air. Histon merupakan protein yang larut dalam air dan tidak larut dalam ammonia encer. Protamin yaitu protein yang larut dalam air, asam dan alkali, tidak terkoagulasi oleh panas (Krause, *et al.*, 1972).

Penggolongan protein berdasarkan bentuknya dibagi menjadi : protein globuler dan protein fibrosa. Protein globular mempunyai struktur yang berlipat-lipat, rantai polipeptida yang berpilin dan rasio aksial (perbandingan antara panjang dan lebar) kurang dari 10 dan tidak lebih dari 3-4. Sedangkan protein fibrosa mempunyai rasio aksial lebih dari 10 (Murray, *et al.*, 1993). Ditambahkan oleh Martin, *et al.*, (1987), bahwa protein yang digolongkan dalam protein globular antara lain insulin, albumin, globulin, plasma, dan banyak enzim. Sedangkan protein yang digolongkan dalam protein fibrosa antara lain adalah keratin dan miosin.

Protein didapatkan dari makanan yang menjadi asupan sehari-hari. Protein merupakan suatu zat gizi yang sangat penting bagi tubuh, karena secara umum protein berfungsi sebagai bahan bakar dalam tubuh, juga berfungsi sebagai enzim (ribonuklease, tripsin), protein transport/plasma (albumin, hemoglobin, serum miogolbin), membentuk

antibodi, membentuk konjugat bersama senyawa lain dalam struktur jaringan (kolagen, elastin, keratin, lipoprotein), protein bergerak/kontraktile (myosin, aktin), protein nutrisi dan penyimpanan (kasein, oval albumin), protein pertahanan tubuh (fibrinogen, antibodi), protein pengatur dan hormonal (insulin) (Winarno, 2002).

2.4 Albumin

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).

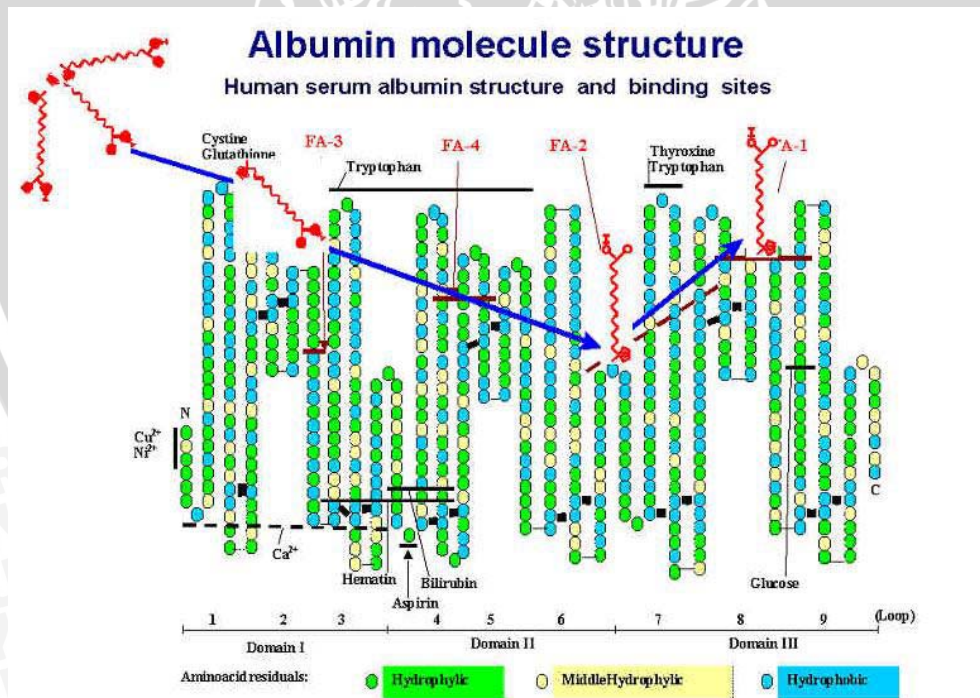
Albumin termasuk salah satu protein globuler yang larut dalam air, molekul-molekulnya berbentuk bulat, dapat dipertahankan bentuknya melalui ikatan silang antara asam amino dalam rantai itu dan dapat terdispersi dengan mudah dalam air atau larutan garam yang membentuk koloid (Martin, *et al.*, 1987).

Albumin adalah bagian dari protein yang banyak terdapat pada jaringan hewan dan tumbuhan. Albumin larut air dan larutan garam encer dan dapat terkoagulasi oleh panas (Considine and Considine, 1973). Berikut ini adalah gambar struktur kimia Human Serum Albumin (HSA) yang berikatan dengan 6 molekul asam palmitat :



Gambar 2. Struktur Kimia Human Serum Albumin (HSA)
Sumber : Anonymous, (2006^a)

Serum albumin adalah komponen paling banyak dalam serum manusia jumlahnya sekitar 50% dari total protein dalam plasma darah manusia. Albumin mempunyai kemampuan menjaga tekanan osmotik darah dan transport asam lemak bebas dalam darah. (Warker, 1954). Albumin memiliki 100 grup karboksil, 58 grup asam amino, 16 grup imidazole, 19 grup fenol, dan 22 grup guanidine per molekul albumin (West, *et. al.*, 1970). Albumin mempunyai tiga domain (I, II, III), yang bercabang menjadi 9 putaran dengan 17 ikatan disulfide yang menyatu menjadi 1 ikatan polipeptida tunggal. Masing-masing domain mempunyai 2 sub domain. Dari hasil data kristalography X-ray diketahui bahwa struktur albumin dominan berbentuk alpha-helix sekitar 67%. (Anonymous, 2006^b) Gambar struktur dan ikatan pada albumin dapat dilihat pada Gambar 3 dibawah ini.



Gambar 3. Struktur dan Ikatan Albumin
Sumber : Seibt, (2006)

Albumin memiliki berat molekul sekitar 69.000. Struktur primer dari serumnya mengandung 610 asam amino yang tersusun dalam peptida rantai tunggal. Struktur sekunder albumin menyebabkan strukturnya menjadi berlipat. Lipatan ini dapat dihilangkan dengan menurunkan pH, dan dapat dibentuk kembali jika pH dinaikkan seperti semula (Harper *et al.*, 1979). Kandungan asam amino esensial dan non esensial albumin ikan gabus dapat dilihat pada Tabel 2 berikut :

Tabel 2. Komposisi Asam Amino Albumin Ikan Gabus

Jenis Asam Amino	Jumlah Asam Amino (%)
Glisin	0,578
Alanina	0,558
Valina	0,628
Leusina	0,91
Isoleusina	0,535
Serina	0,596
Treonina	0,64
Sestina	0,16
Metionina	0,12
Fenilalanina	0,752
Tirosina	0,534
Prolina	0,438
Hidrosiprolina	0,501
Asam aspartat	1,217
Glutamine	1,812
Lisina	0,957
Arginina	0,87
Histisina	0,97
Hiposilina	0,045
NH ₃	0,167

Sumber : De Man (1997)

Albumin diproduksi oleh hati menghasilkan 12 gram albumin setiap harinya dan merupakan 25% dari total protein yang diproduksi oleh hati. Molekul albumin merupakan suatu rantai polipeptida dengan 585 residu asam amino dan mempunyai

bentuk elips yang tidak menambah kepekatan darah. Waktu paruhnya berkisar antara 2-3 minggu atau 20 hari (Murray, *et al.*, 1993).

Sintesis albumin dalam hati sangat responsif terhadap influks asam amino dari makanan. Penting diperhatikan bahwa sekitar 1/3 asam amino diperlukan setiap hari dalam diet dapat dilaporkan sebagai sintesis albumin dan protein plasma lain yang kemudian memasuki sirkulasi (Linder, 1992).

Montgomery *et al.*, (1993), menjelaskan bahwa albumin mempunyai dua fungsi utama yaitu mengangkut molekul-molekul kecil melewati plasma dan cairan sel, serta memberi tekanan osmotik didalam 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 lemak bebas dan bilirubin. Dua senyawa kimia tersebut kurang dapat larut dalam air tetapi harus diangkut melalui darah dari satu organ ke organ lain agar dapat dimetabolisme atau diekskresi. Albumin berperan membawa senyawa kimia tersebut dan peran ini disebut protein pengangkut non spesifik. Dijelaskan pula oleh Parker, (1992), fungsi albumin yang kedua adalah albumin bertanggung jawab untuk sekitar 80% pengaturan tekanan osmotik dalam darah dan mengangkut asam lemak antar jaringan adipose. Dalam menjalankan fungsinya, albumin bertanggung jawab terhadap 70% tekanan koloid yang mencegah cairan ke luar kapiler, masuk keruang interstitial (Murray, *et al.*, 1993).

2.5 Metode Pemisahan Protein

Setiap jenis sel dapat mengandung ribuan protein berbeda, setiap spesies organisme mengandung kumpulan protein yang secara kimiawi berbeda dari organisme lainnya. Protein-protein tersebut merupakan makromolekul yang relatif rapuh

mempertahankan aktivitas biologisnya pada daerah pH dan suhu yang relatif sempit. Isolasi suatu protein tertentu dalam bentuk murni dari sel atau jaringan merupakan usaha yang tidak mudah (Sindumarta dan Natalia, 1999). Suatu teknik isolasi dan identifikasi protein harus mempertimbangkan sifat-sifat fisik, kimiawi dan kelistrikan suatu protein sedemikian rupa sehingga konformasi dan aktifitasnya tidak berubah (Fatchiyah, *et.al*, 2006).

Metode pemisahan atau isolasi suatu protein antara lain :

a. Homogenisasi

Homogenisasi adalah suatu prosedur fraksinasi sel yaitu memisahkan sel dari jaringan, dan menghancurkan membran sel untuk mengambil sitoplasma dan organelnya serta memisahkan organel-organel sel dan molekul penyusunnya. Hasil homogenisasi masih berupa larutan keruh yang terdiri dari debris sel (bagian sel yang tidak hancur), organel-organel sel dan makromolekul penyusun sel diantaranya protein (Fatchiyah, *et.al.*, 2006).

b. Presipitasi

Presipitasi suatu protein dapat menggunakan beberapa metode antara lain : presipitasi isoelektrik yang merupakan fungsi dari pH isoelektrik yaitu pH dimana kelarutan suatu protein paling minimum, dimana molekul protein tidak bermuatan listrik dan tidak bergerak dalam medan listrik. Pada kondisi ini tidak ada gaya tolak-menolak listrik diantara molekul-molekul protein, sehingga molekul-molekul protein yang bertetangga, cenderung saling berikatan dan mengendap. (Sindumarta dan Natalia, 1999). Selain itu penambahan suatu jenis garam seperti ammonium sulfat pada suatu larutan campuran protetin, maka beberapa jenis protein akan mengendap pada konsentrasi garam tertentu yang merupakan fungsi dari salting-out (Davidson *et.al.*,

1999). Peningkatan konsentrasi ammonium sulfat lebih besar dari 1,0 M menyebabkan kelarutan protein berkurang. Molekul air akan berikatan kuat dengan molekul garam sehingga terjadi kompetisi antara ion garam dan molekul protein untuk berikatan dengan molekul air. Semakin banyak molekul garam yang berikatan dengan molekul air maka molekul-molekul protein akan berinteraksi satu sama lain melalui interaksi hidrofobik, sehingga protein akan mengendap (Zayas, 1997)

e. Gel filtrasi

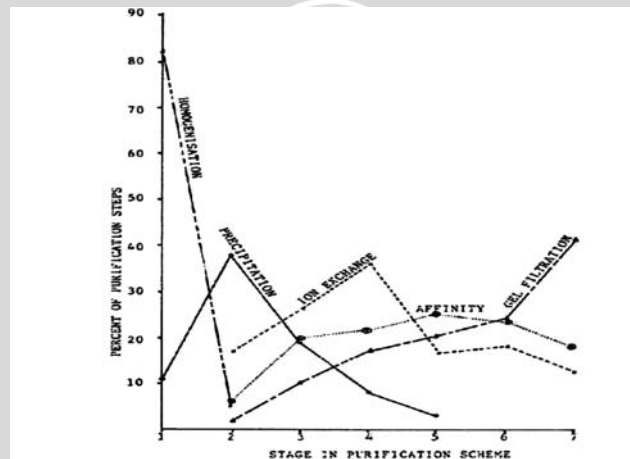
Protein dipisahkan menurut ukurannya dengan cara melakukan campuran protein pada suatu gel yang berpori-pori. Protein yang sangat besar akan disingkirkan oleh gel dengan cepat muncul dalam cairan yang menetes dari kolom gel tadi. Protein-protein yang lebih kecil memasuki gel dan diperlambat dengan jalannya dalam melintasi gel. Perlambatan protein berbeda-beda, sesuai dengan ukuran molekul. Protein yang paling besar keluar pertama kali. Protein yang lebih kecil akan keluar lebih lama, tergantung pada ukuran masing-masing (Schumm, 1993).

f. Kromatografi Penukar Ion

Materi yang paling umum digunakan pada kromatografi penukar ion adalah dietilaminoetilselulose (DEAE-selulose), pada pH 7,0 mengandung gugus muatan positif, penukar ion karboksimetilselulose (CMC-selulose) pada pH netral mengandung gugus muatan negatif. Masing-masing komponen protein dalam campuran dielusi dari kolom menggunakan buffer dengan pH meningkat atau larutan garam dengan kekuatan ionik meningkat yang mempunyai efek mengurangi ikatan protein-protein anionik. Dapat juga digunakan cara elusi gradient. Matrik penukar ion dapat digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul dan muatan protein (Sindumarta dan Natalia, 1999).

g. Kromatografi Afinitas

Beberapa protein dapat diisolasi dengan derajat kemurnian tinggi dari campuran yang sangat kompleks hanya dalam satu tahap dengan kolom kromatografi afinitas. Metode ini berdasarkan sifat biologis dari protein yang dapat mengikat nonkovalen molekul lain secara spesifik (Sindumarta dan Natalia, 1999). Aplikasi ini dapat digunakan untuk memisahkan memurnikan enzim dengan penambahan substrat untuk enzim pada gugus fungsional dipermukaan partikel matrik poros terhidrasi yang ditempatkan dalam kolom (Parker, 1992).



Gambar 4. Persentase Hasil Pemisahan Protein dengan Masing-Masing Metode Pemurnian (Janson, *et al.*, 1998)

Crude ekstrak dapat dipisahkan dengan kotoran melalui preparasi sentrifugasi. Supernatan hasil sentrifus kemudian dapat dipisahkan dari fraksi protein yang tidak diinginkan dengan presipitasi (Janson, *et al.*, 1998). Pemilihan metode presipitasi untuk fraksinasi albumin harus mempertimbangkan sifat-sifat fisik dan kimia dari albumin. Presipitasi dengan penambahan garam ammonium sulfat lebih efektif dibandingkan dengan metode presipitasi yang lain. Menurut Boyer, (1998), ammonium sulfat memiliki

kelarutan yang tinggi didalam air sehingga dapat mengurangi interaksi antara molekul air dan protein. Selain itu, ammonium sulfat juga dapat mengurangi terjadinya denaturasi akibat perubahan-perubahan kimia yang terjadi pada saat proses presipitasi. Untuk memperoleh albumin murni diperlukan suatu perlakuan khusus dengan tahap-tahap teknik pemisahan yang cukup rumit dengan kombinasi berbagai metode teknik pemisahan protein (Voet, *et al.*, 1999). Persentase strategi pemisahan suatu protein dengan berbagai metode dapat digambarkan pada Gambar 4 diatas.

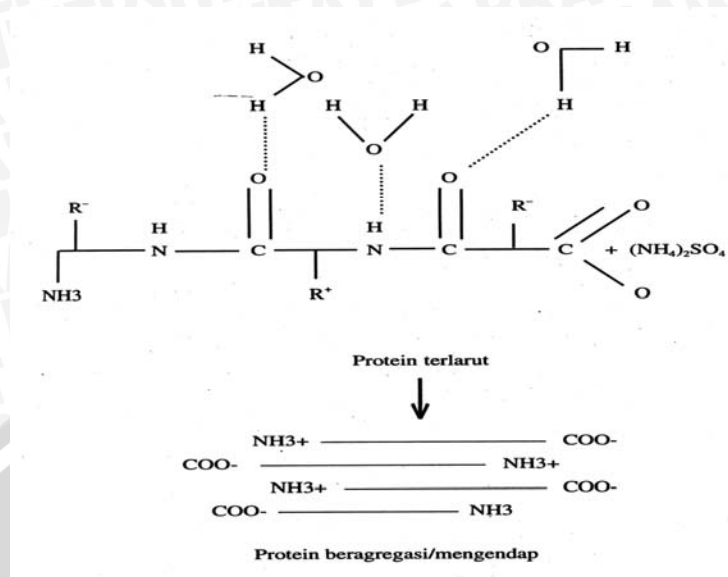
2.6 Presipitasi Albumin Dengan Ammonium Sulfat

Albumin merupakan fraksi protein yang larut air, sehingga proses pemisahannya dapat dilakukan dengan menggunakan prinsip-prinsip pemisahan protein. Pemisahan fraksi protein seringkali dilakukan menggunakan berbagai pelarut, elektrolit, atau keduanya untuk mengeluarkan fraksi protein yang berbeda menurut kelarutannya (Murray, *et al.*, 1993).

Salah satu cara pemisahan fraksi protein yaitu dengan presipitasi dengan cara perbedaan kelarutan. Berbagai protein globuler mempunyai daya kelarutan yang berbeda didalam air (Wirahadikusumah, 1981). Kelarutan protein dipengaruhi oleh komposisi asam amino, berat molekul konformasi dan kandungan gugus-gugus polar dan non polar dalam asam amino protein yang terdiri dari ikatan hidrofobik dan hidrofilik yang mempengaruhi kelarutan protein (Zayas, 1997). Kelarutan protein merupakan fungsi dari pH, kekuatan ion, sifat dielektrik pelarut dan suhu, dan dapat dipakai untuk memisahkan campuran protein, karena setiap protein mempunyai komposisi residu asam amino yang khas, yang menentukan sifatnya sebagai suatu elektrolit (Sindumarta dan Natalia, 1999). Albumin adalah zat yang larut dalam air, dapat dikoagulasikan oleh panas, dan

dipresipitasi oleh larutan garam yang jenuh (Iskandar, 1991). Menurut Parker, (1992), albumin dapat larut dalam larutan ammonium sulfat 50%.

Pendekatan umum untuk memisahkan albumin adalah dengan menambahkan garam konsentrasi tertentu untuk “salting out” protein. Salting out adalah suatu proses pemisahan dimana konsentrasi garam netral yang ditambahkan tersebut dinaikkan terus, sehingga kelarutan protein akan berkurang, sampai pada konsentrasi garam yang sangat tinggi protein akan mengalami presipitasi (Wirahadikusumah, 1981). Jika konsentrasi garam dinaikkan sebagian molekul air akan tertarik oleh ion garam, pengurangan molekul air yang ada akan saling berinteraksi dengan bagian protein. Dengan ditingkatkannya molekul garam maka ikatan antar protein-protein lebih kuat daripada ikatan garam-solut sehingga molekul protein akan mengalami koagulasi satu sama lain dengan membentuk interaksi hidrofobik (Seidman *et al.*, 2006). Lebih lanjut Lehninger, (1982), menjelaskan bahwa pada umumnya dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan protein semakin besar, tetapi setelah mencapai suatu titik tertentu kekuatannya justru akan menurun. Pada kekuatan ion rendah gugus protein yang terionisasi dikelilingi oleh ion lawan sehingga terjadinya interaksi antar protein dan akibatnya kelarutan protein akan menurun. Proses ini sebaiknya dilakukan pada suhu 0-4 °C untuk memaksimalkan stabilitas protein, dan untuk mempercepat proses pemisahan tanpa mengalami denaturasi (Wilbur *et al.*, 1999). Gambar mekanisme presipitasi protein dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Mekanisme Presipitasi Protein Oleh Ammonium Sulfat
Sumber : Soewoto, *et al.*, (2001)

Penggunaan garam ammonium sulfat sering digunakan sebagai langkah pertama dalam pemisahan suatu jenis protein. Protein-protein yang berbeda dapat larut pada berbagai derajat konsentrasi ammonium sulfat. Beberapa protein dimungkinkan terendapkan pada kejenuhan 30% sedangkan yang lain dapat larut pada 80% kejenuhan (Seidman *et al.*, 2006). Kemampuan ion ammonium sulfat untuk mengikat molekul air dapat digunakan sebagai dasar proses presipitasi protein. Penambahan ion-ion garam dalam suatu campuran akan mempengaruhi struktur protein dalam larutan. Sifat dari partikel garam sebagai agen presipitan dijelaskan sebagai *Hofmeister series* seperti pada Gambar 6. Jenis garam dibagian sebelah kiri disebut *antichaotropic* yang bersifat efisien sebagai agen salting out. Garam jenis ini dapat meningkatkan efek hidrofobik dalam suatu larutan dan dapat meningkatkan kemampuan pergerakan protein dengan menggabungkan ikatan hidrofobik pada permukannya. Jenis garam disebelah kanan

disebut *chaotropic*. Garam-garam tersebut mengurangi efek hidrofobik dan menjaga stabilitas protein dalam suatu larutan (Janson, *et al.*, 1998).

Cations	NH ₄ ⁺ >	K ⁺ >	Na ⁺ >	Li ⁺ >	Mg ²⁺ >	Ca ²⁺ >	guanidium >			urea				
Anions	SO ₄ ²⁻ >	HPO ₄ ²⁻ >	OH ⁻ >	F ⁻ >	CH ₃ COO ⁻ >	citrate >	tartrate >	Cl ⁻ >	Br ⁻ >	NO ₃ ⁻ >	ClO ₃ ⁻ >	I ⁻ >	ClO ₄ ⁻ >	SCN ⁻ >

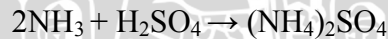
← Salting out
Netral
→ Salting-in

Gambar 6. Hofmeister Series Berbagai Jenis Ion (Franks, 1993)

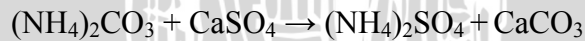
Ammonium sulfat merupakan senyawa kimia yang berbentuk kristal berwarna putih, abu-abu kebiru-biruan atau kuning, tetapi paling banyak berwarna putih seperti gula pasir. Senyawa ini mengandung nitrogen antara 20,4%-21%, bersifat tidak higroskopis dan baru akan menyerap air bila kelembapan nisbi sudah 80% pada suhu 30°C (Setyawidjaya, 1987).

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

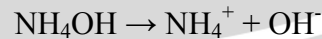
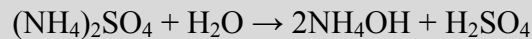
1. Mereaksikan ammonia dengan asam sulfat dengan reaksi sebagai berikut :



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



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



Larutan garam divalent lebih efisien dalam mengendapkan protein, karena didalam air garam tersebut akan berdisosiasi menjadi 3 ion, yang masing-masing berinteraksi sempurna dengan air. Albumin akan mengendap dengan penambahan ammonium sulfat jenuh (Soewoto, *et al.*, 2001).

Proses lebih lanjut setelah penambahan ammonium sulfat pada larutan protein, adalah sentrifuse. Pemisahan secara sentrifugasi dilakukan berdasar sifat partikel dalam medan gaya sentrifugal. Partikel yang akan dipisahkan biasanya disuspensikan dalam medium cair yang dimasukkan dalam tabung sentrifuse yang ditempatkan dalam rotor yang berputing, sehingga partikel yang berbeda dalam hal berat jenis, ukuran dan bentuk akan mengendap searah dengan gaya sentrifugal dengan kecepatan yang berbeda (Sudarmadji, 1996). Menurut Fatchiyah, *et.al.*, (2006), untuk presipitasi albumin dalam serum disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 20-30 menit.

2.7 Elektroforesis

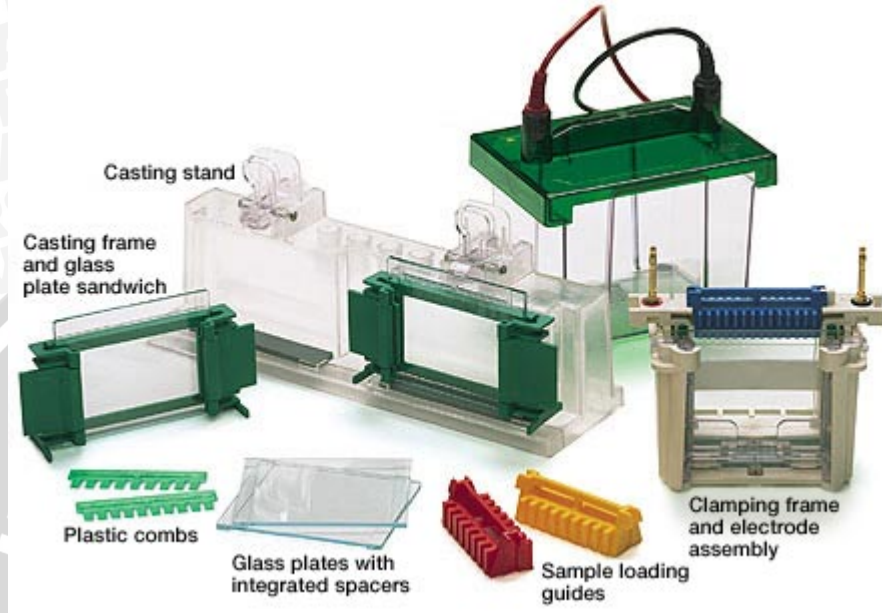
Pemisahan protein berdasarkan muatan listrik tergantung pada sifat asam basa protein tersebut, yang ditentukan oleh jumlah dan jenis gugus R mengion pada rantai polipeptida. Karena berbagai protein berbeda komposisi residu asam amino dan urutannya, maka setiap protein mempunyai sifat asam basa yang berbeda pula (Sindumarta dan Natalia, 1999).

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan senyawa yang tergantung dari pergerakan molekul bermuatan. Jika suatu larutan campuran protein diletakkan diantara 2 elektrode, molekul yang bermuatan akan berpindah kesalah satu elektrode dengan kecepatan tergantung pada muatan bersihnya, dan tergantung pada medium penyangga yang digunakan (Montgomery *et al.*, 1993).

Ada dua cara Pemisahan campuran protein dengan cara elektroforesis. Cara pertama disebut elektroforesis bergerak, dimana campuran protein diletakkan dalam tabung U yang kedua ujungnya masing-masing dihubungkan dengan anoda dan katoda. Jika listrik dijalankan molekul protein yang bermuatan negatif akan bergerak keanoda dan yang positif akan bergerak kekatoda. Kecepatan bergerak protein berbeda-beda. Perbedaan ini akan menghasilkan batas atau lapisan dalam tabung U yang dapat dilihat dengan indeks refraksinya. Jumlah lapisan yang terjadi menunjukkan banyaknya macam protein dalam campuran. Cara kedua disebut elektroforesis lajur, dimana sedikit dari campuran protein ditempatkan pada suatu matriks padat, misalnya kertas saring, gel kanji atau gel poliakrilamida. Pergerakan protein pada matrix padat tersebut akan jelas terlihat setelah dilakukan penentuan kuantitatif dengan uji warna (Wirahadikusumah, 1981).

Salah satu metode elektroforesis yang sering digunakan untuk memisahkan protein yaitu SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Elektroforesis dengan gel poliakrilamid sebagai pemisah, dimana mula-mula protein didenaturasi dengan pemanasan dalam larutan dapar yang mengandung sodium dodesil sulfat (SDS). Denaturasi dalam SDS panas ini akan menimbulkan muatan negatif pada seluruh protein dalam larutan, karena terjadi interaksi hidrofobik antara molekul protein dengan molekul SDS. Interaksi ini sebanding dengan ukuran molekul protein. Jadi makin besar ukuran molekul protein makin banyak muatan positif yang dihasilkan. Selanjutnya bila diberi medan listrik, kompleks protein yang terdenaturasi SDS didalam gel poliakrilamid akan berjalan ke satu arah yaitu kutub positif. Jarak yang ditempuh ditentukan oleh ukuran molekul dalam menembus pori-pori gel. Dengan demikian

terjadi pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya (Soewoto, *et al.*, 2001). Gambar alat elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 7 dibawah ini.



Gambar 7. Alat elektroforesis
 Sumber : Boder, (2006)

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan baku, bahan untuk proses presipitasi, dan bahan untuk analisa berkualitas pro-analisis. Bahan baku yang digunakan untuk ekstraksi adalah ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) yang diperoleh dari Kecamatan Umbulan, Kabupaten Pasuruan dalam keadaan masih hidup dengan panjang tubuh sekitar $\pm 7-15$ cm dan berat badan $\pm 150-450$ g. Bahan kimia yang digunakan untuk proses presipitasi albumin antara lain: ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsentrasi 50%; 60%; 70%; 80%; 90%, buffer fosfat (KH_2PO_4) 0,1 M pH 8,0 dan aquades. Adapun bahan yang digunakan untuk analisa kadar albumin dengan metode *brom cresol green* adalah buffer *succinat* (87 mmol/L pH 3,8), *brom cresol green* 0,2 mmol/L, *brij 35* (7,35 ml/L), larutan standar bovine serum albumin (BSA), dan aquades. Bahan untuk analisa kadar protein total dengan metode biuret adalah larutan protein standar bovine serum albumin (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 aquades.

Adapun bahan yang digunakan untuk analisa kadar protein endapan dan supernatan dengan spektrofotometer adalah reagen biuret. Bahan yang digunakan untuk elektroforesis antara lain : gel poliakrilamid 10%, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) gliserol, 1,8 M Glisin, 10 % SDS, 0,15% Coomassie Brilliant Blue R-250, 250 ml etanol, 50 ml asam asetat, aquades dan isobutanol.

3.1.2 Peralatan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kasar ikan gabus antara lain: pisau, talenan, timbangan analitik, plastik, benang, termos es, ekstraktor vakum, kain saring, erlenmeyer 250 ml, labu ukur 100 ml, labu ukur 50 ml, dan botol berwarna gelap. Alat-alat untuk presipitasi albumin antara lain: pH meter, sentrifugasi dingin merk HETTICH Mikro 22R, pipet mikro 200 μ l dan 1000 μ l, eppendorf 1,5 ml, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 250 ml, beaker glass 250 ml, dan pipet 1 ml dan pipet mikro 0.02ml, fortex dan freezer.

Alat-alat yang digunakan untuk analisa kadar albumin adalah *Spectrofotometer* SMA (*Automatic Analyser Hitachi 902*) dengan panjang gelombang 628 nm, pipet mikro 200 μ l, eppendorf 1,5 ml. Peralatan yang digunakan untuk analisa protein sama dengan pada analisa albumin, dengan menggunakan *spectrophotometer* SMA (*Automatic Analyser Hitachi 902*) dengan panjang gelombang 546 nm.

Peralatan yang digunakan untuk elektroforesis adalah : pipet volumetrik, pipet tetes, eppendorf 1,5 ml, pipet mikro 100 μ l dan tips, parafilm, sentrifuse dingin, vortek, penangas air, sarung tangan, erlenmeyer, peralatan elektroforesis (kawat platinum, lempeng kaca, dan spacer plastik), power supply. Spektrofotometer merk Genesys UV 10 dengan panjang gelombang 540 nm untuk mengukur kadar protein endapan dan supernatan. Adapun peralatan yang digunakan untuk analisa kuantitatif profil protein yaitu : densitometer Shimadzu CS-930 V-05.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimental. Eksperimen adalah observasi dibawah kondisi buatan (*artificial condition*), dimana kondisi tersebut dibuat dan diatur oleh sipeneliti, dan dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya control (Nazir, 1985). Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan untuk mengetahui konsentrasi ammonium sulfat yang akan digunakan sebagai presipitan albumin ikan gabus, dilanjutkan dengan penelitian inti yang merupakan pelaksanaan dari penelitian sebenarnya.

3.2.1 Variabel

Variabel adalah gambaran dari sifat suatu benda yang menjadi obyek penelitian yang mempunyai bermacam-macam nilai. Variabel terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diramalkan akan muncul sebagai pengaruh variabel bebas (Nazir, 1998). Adapun variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi ammonium sulfat (50%, 60%, 70%, 80%, 90%), sedangkan variabel terikat yaitu kadar albumin, total protein.

3.2.2 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara sederhana. Menurut Yitnosumarto (1993), Rancangan Acak Lengkap adalah dimana penempatan perlakuan kedalam satuan-satuan percobaan dilakukan secara acak lengkap, yang artinya kita perlakukan semua satuan percobaan sebagai satu kesatuan dimana perlakuan-perlakuan ditempatkan kedalamnya

secara acak. Faktor yang diteliti adalah konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan untuk pengendapan albumin, yang terdiri dari lima perlakuan yaitu:

- Perlakuan K1 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 50%
- Perlakuan K2 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 60%
- Perlakuan K3 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 70%
- Perlakuan K4 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 80%
- Perlakuan K5 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 90%

3.2.3 Analisa Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan ANOVA (Analysis of Variance) yang merupakan suatu cara menguraikan ragam total menjadi komponen ragam. Metode analisa menurut Yitnosumarto (1993), adalah sidik ragam yang mengikuti model analisis sebagai berikut :

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

$$i = 1, 2, \dots, p$$

$$j = 1, 2, \dots, n_p$$

Dimana : Y_{ij} = nilai pengamatan pada perlakuan ke- i ulangan ke- j

μ = nilai tengah umum

τ_i = pengaruh perlakuan ke- i

ε_{ij} = kesalahan (galat) percobaan pada perlakuan ke- i
ulangan ke- j

p = banyaknya perlakuan

n_p = banyaknya ulangan pada perlakuan

Didalam penelitian ini menggunakan 3 perlakuan dan pengulangan sebanyak 5 kali, maka data yang diperoleh kemudian ditata dalam tabel penataan data dengan menyatakan nilai pengamatan sebagai peubah Y_{ij} kemudian dibuat untuk masing-masing parameter uji. Penataan data tersebut dapat dilihat pada Tabel 3 berikut :

Tabel 3. Penataan Data

Perlakuan	Ulangan			$Y_i = \sum_{j=1}^n Y_j$
	I	II	III	
K1	Y_{11}	Y_{12}	Y_{13}	Y_1
K2	Y_{21}	Y_{22}	Y_{23}	Y_2
K3	Y_{31}	Y_{32}	Y_{33}	Y_3
K4	Y_{41}	Y_{42}	Y_{43}	Y_4
K5	Y_{51}	Y_{52}	Y_{53}	Y_5
$Y_i = \sum_{i=1}^i Y_i$	Y_1	Y_2	Y_3	$\sum_{i=1}^i \sum_{j=1}^n Y_{ij} = Y_n$

Keterangan :

- Perlakuan K1 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 50%
- Perlakuan K2 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 60%
- Perlakuan K3 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 70%
- Perlakuan K4 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 80%
- Perlakuan K5 = konsentrasi ammonium sulfat sebesar 90%

3.3 Prosedur Kerja

Prosedur penelitian ini terdiri dari 5 tahap yaitu :

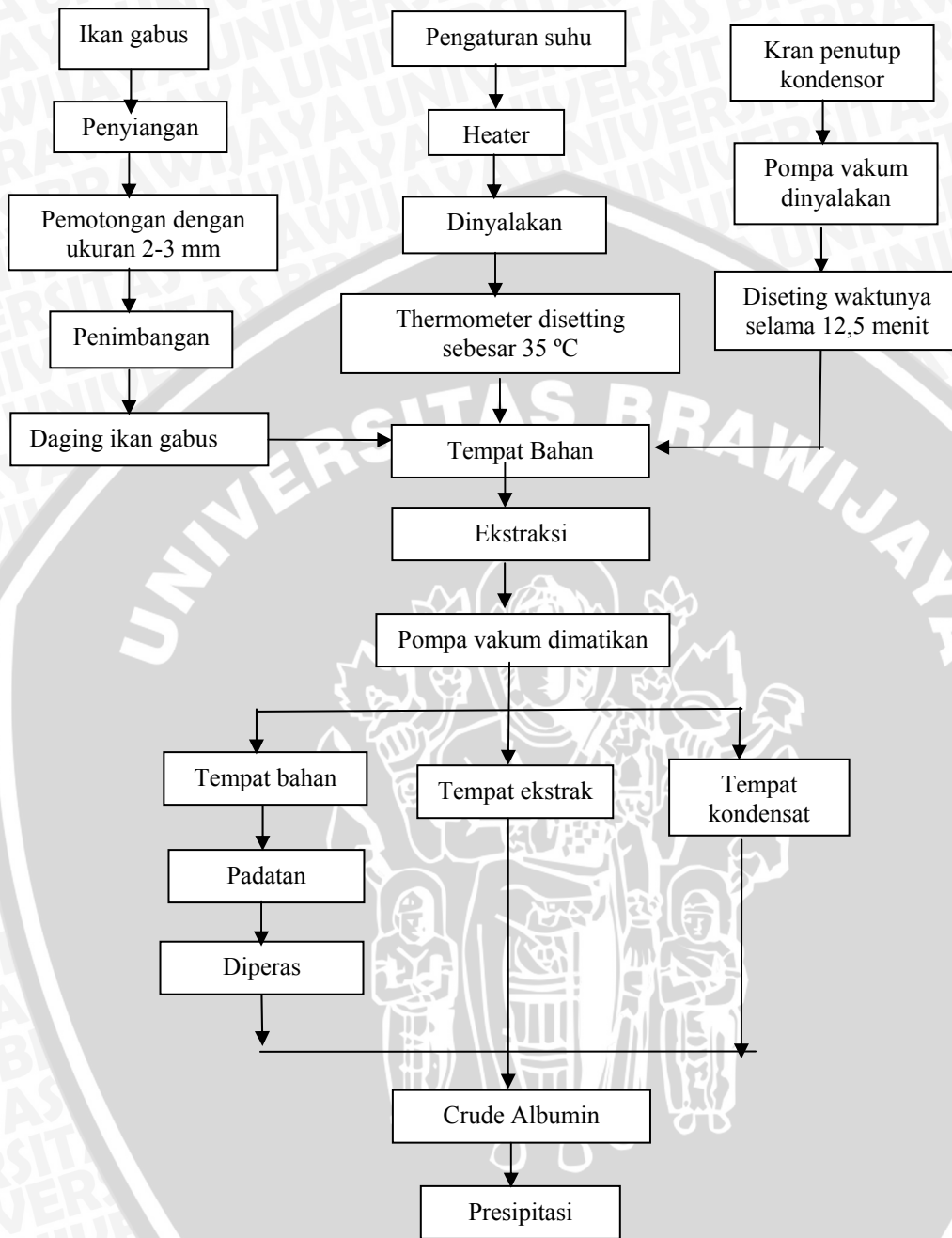
Pertama : Disiapkan 5 kg ikan gabus hidup, dimatikan dan disiangi (kepala, isi perut, sirip, dan duri), diambil dagingnya kemudian dicuci dengan air PDAM, dicincang halus (kurang lebih 2-3 mm), dan ditimbang masing-masing $\frac{1}{4}$ kg. Tiap-tiap $\frac{1}{4}$ kg daging dibungkus plastik kemudian diikat kuat dengan benang, dan didinginkan di dalam termos es sampai proses dimulai.

Kedua : Ekstraktor vakum disiapkan. Tabung pelarut diisi aquades sesuai dengan volume yang telah ditentukan. Kemudian thermokopel dinyalakan hingga suhu pelarut mencapai suhu 35 °C. Daging ikan yang telah halus dimasukkan ke dalam kain saring yang terdapat pada ekstraktor vakum dan disusun sedemikian rupa hingga didapatkan bidang permukaan yang luas. Hidupkan pompa vakum dan proses ekstraksi dijalankan selama $\pm 12,5$ menit.

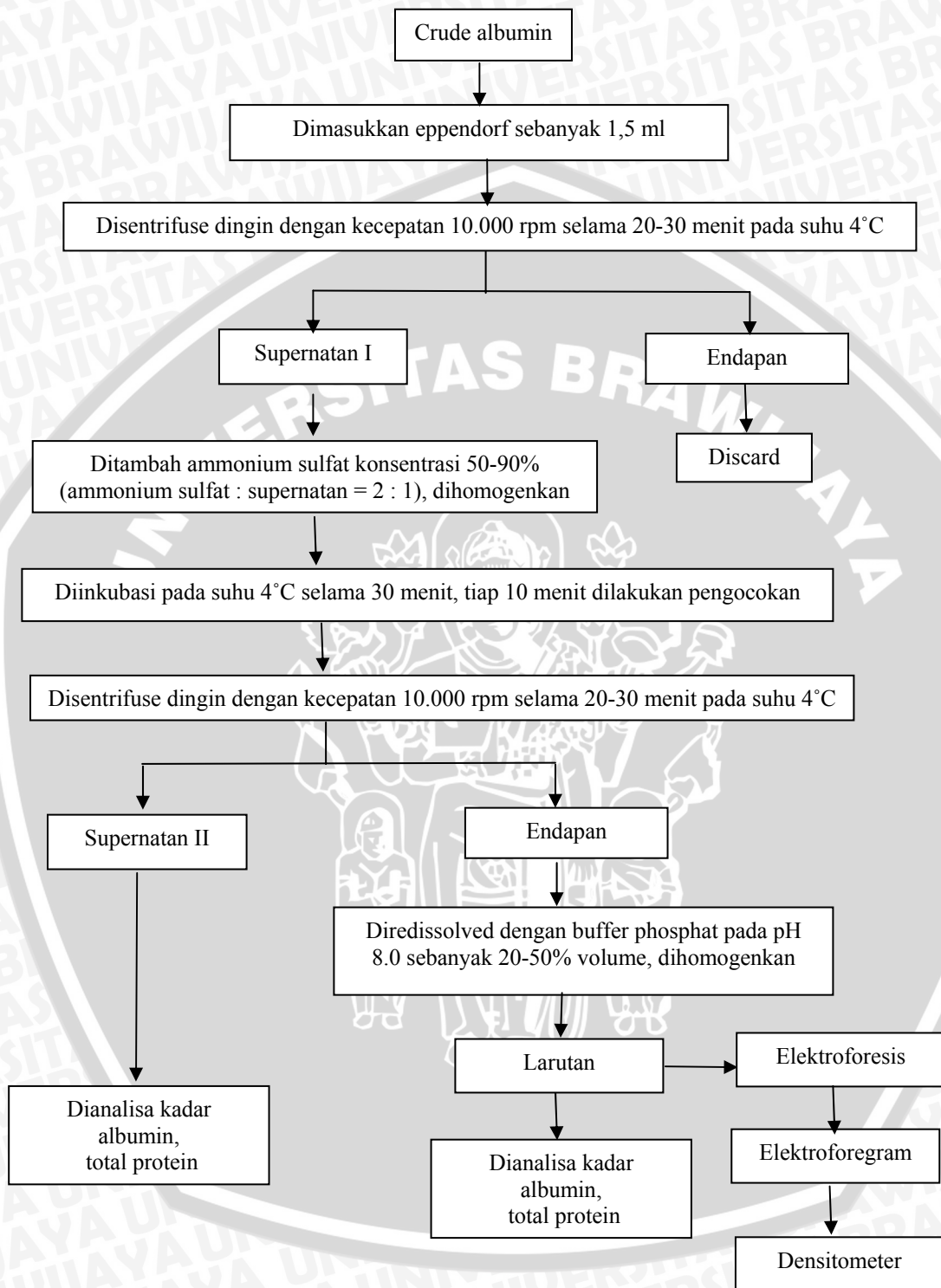
Ketiga : Hasil dari ekstraksi yaitu pada kondensat, filtrat dan perasan yang diperoleh, dipreparasi terlebih dahulu sebelum memasuki tahap berikutnya yaitu dengan disentrifuse dingin pada suhu 4°C selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, kemudian supernatan diambil dan pelletnya dibuang.

Keempat : Supernatan kemudian ditambah ammonium sulfat dengan konsentrasi 50-90%, dimasukkan dalam eppendorf sebanyak 1,2 ml dengan perbandingan ammonium sulfat : sampel yaitu 2 : 1. Kemudian sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit, dan divortek tiap 10 menit, kemudian dilanjutkan dengan sentrifuse dingin pada suhu 4°C selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, supernatan yang diperoleh kemudian dianalisa, sedangkan pelletnya diredissolved dengan buffer phosphate pH 8.0 dan divortek sampai semua endapan tersuspensi dalam buffer phosphate, kemudian dianalisa analisa lebih lanjut.

Kelima : Dilakukan uji kadar albumin dan kadar protein dengan metode *brom cresol green*, absorbansinya dibaca dengan *spectrophotometer SMA autoanalyzer* dengan panjang gelombang 546 nm untuk protein dan 628 nm untuk albumin. Untuk analisa kualitatif dilakukan elektroforesis dan elektroforegram hasil elektroforesis dianalisa dengan densitometer untuk mengetahui kadar dari jenis-jenis profil protein pada elektroforegram. Adapun diagram alir prosedur kerja dapat pada Gambar 8 dan 9.



Gambar 8. Prosedur Pembuatan Filtrat Albumin Ikan Gabus Menggunakan Alat Ekstraktor Vakum (Modifikasi Prasasti, 2007)



Gambar 9. Proses Pengendapan Albumin dengan Penambahan Ammonium Sulfat (Modifikasi Fatchiyah, *et, al.*, 2006)

3.4 Parameter Uji

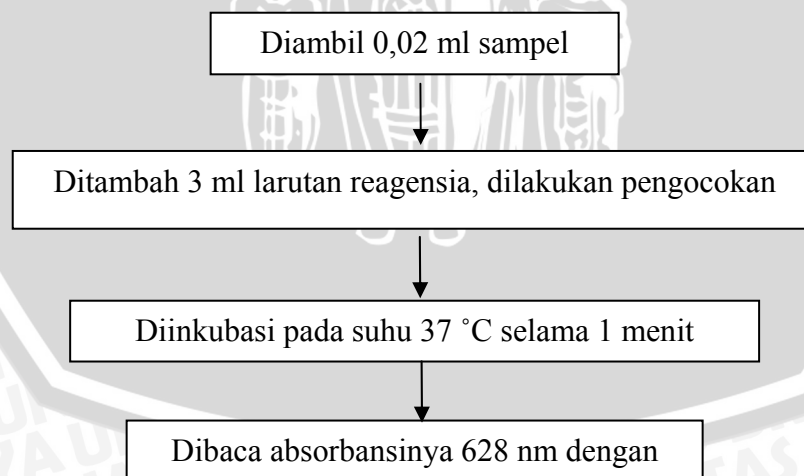
3.4.1 Rendemen

Rendemen merupakan prosentase total filtrat hasil ekstraksi dibandingkan dengan jumlah bahan baku yang digunakan. Rendemen filtrat dihitung dengan menggunakan

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat filtrat yang dihasilkan}}{\text{Berat awal daging}} \times 100 \%$$

3.4.2 Kadar albumin Metode *Brom Cresol Green* (Eltech, 2006)

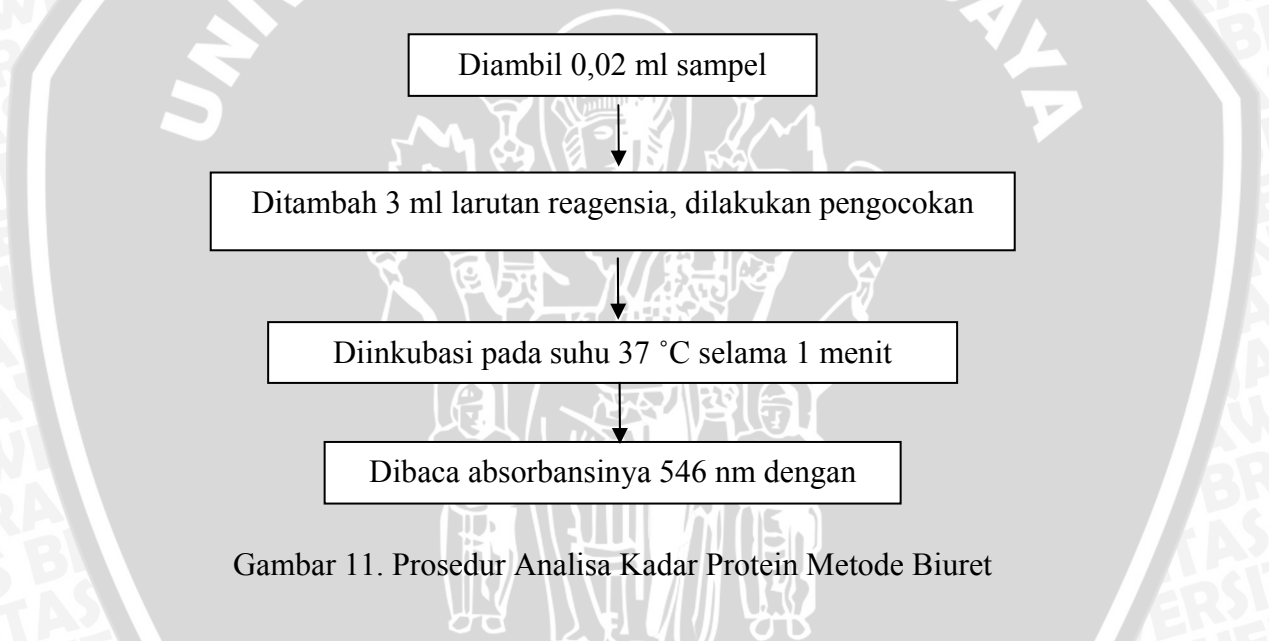
Analisis kadar albumin dengan metode pengecatan *brom cresol green* membentuk kompleks berwarna hijau pada pH 3,8 dan pengukuran absorbasinya dilakukan secara fotometris pada panjang gelombang 628 nm. Reagensia yang digunakan terdiri atas buffer *succinat* (87 mmol/L pH 3,8), *brom cresol green* 0,2 mmol/L, *brij 35* (7,35 ml/L), larutan standar (BSA) dan aquades. Diagram alir analisa kadar albumin dapat dilihat pada Gambar 10. Adapun prosedur analisa kadar albumin dapat dilihat pada Lampiran 1.



Gambar 10. Prosedur Analisa Albumin Metode *Brom Cresol Green*

3.4.3 Kadar protein Metode *Brom Cresol Green* (Eltech, 2006)

Analisa kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode biuret pada dasarnya metode ini hampir sama dengan analisa kadar albumin secara photometri, yang membedakan adalah penggunaan absorbansi kadar protein sebesar 546 nm. Reagensia yang digunakan terdiri atas buffer *succinat* (87 mmol/L pH 3,8), *brom cresol green* 0,2 mmol/L, *brij 35* (7,35 ml/L), larutan standar (BSA) dan aquades. Diagram alir analisa kadar protein dapat dilihat pada Gambar 11. Adapun prosedur analisa kadar protein dapat dilihat pada Lampiran 2.

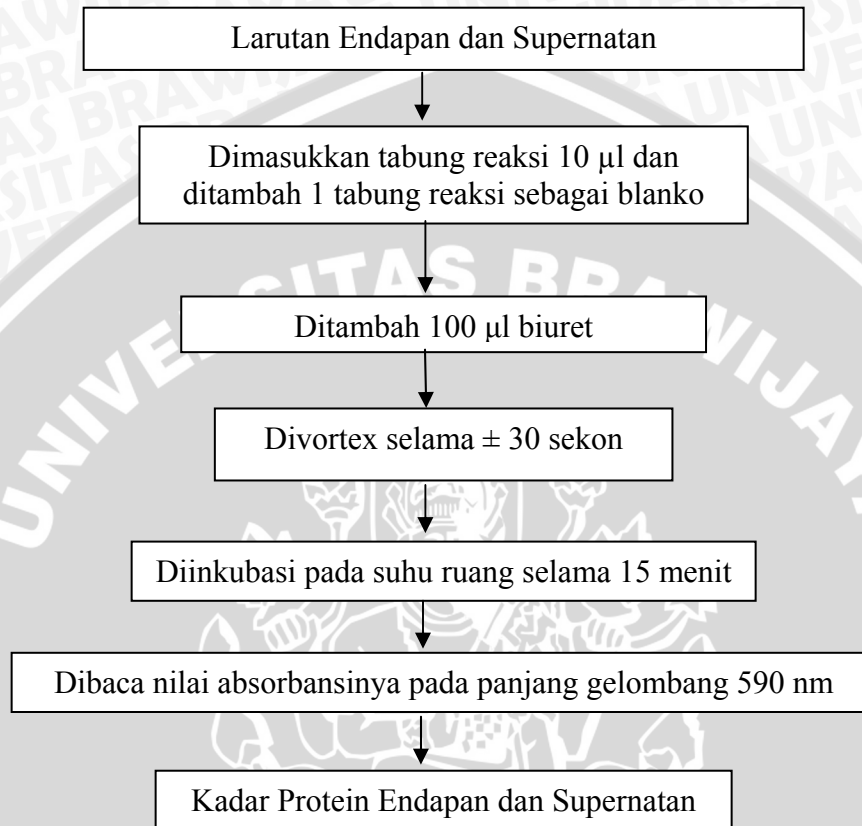


Gambar 11. Prosedur Analisa Kadar Protein Metode Biuret

3.4.4 Spektrofotometer UV (Fatchiyah, *et al.*, 2006)

Penentuan kadar protein endapan dengan spektrofotometer yaitu dengan mengambil 10 μ l larutan sampel dan dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 3 ml reagen biuret, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Penentuan kadar protein ini dilakukan pada alat spektrofotometer dengan menggunakan panjang gelombang 595 nm. Sampel kemudian dimasukkan kedalam alat

spektrofotometer untuk diukur kadar proteinnya. Prosedur analisa kadar protein dengan spektrofotometer dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Prosedur Analisa Kadar Protein dengan (*Spektrofotometer*) Metode Biuret (Fatchiyah, *et al.*, 2006)

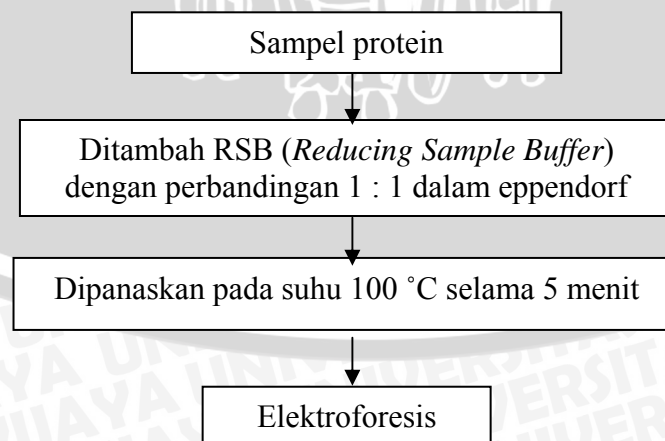
3.4.5 Elektroforesis Metode SDS-PAGE (Fatchiyah, *et al.*, 2006)

Sampel yang akan dipisahkan dilarutkan dalam suatu buffer RSB (*Reducing Sample Buffer*) yang mengandung Tris-HCL, SDS, 2-merkaptotanol, gliserol atau sukrosa dan tracking dye : biru bromfenol (BPB). Setelah dilarutkan dalam dapar sampel, protein didenaturasi dengan pemanasan pada suhu 95 °C sampai 100 °C selama 2-5 menit.

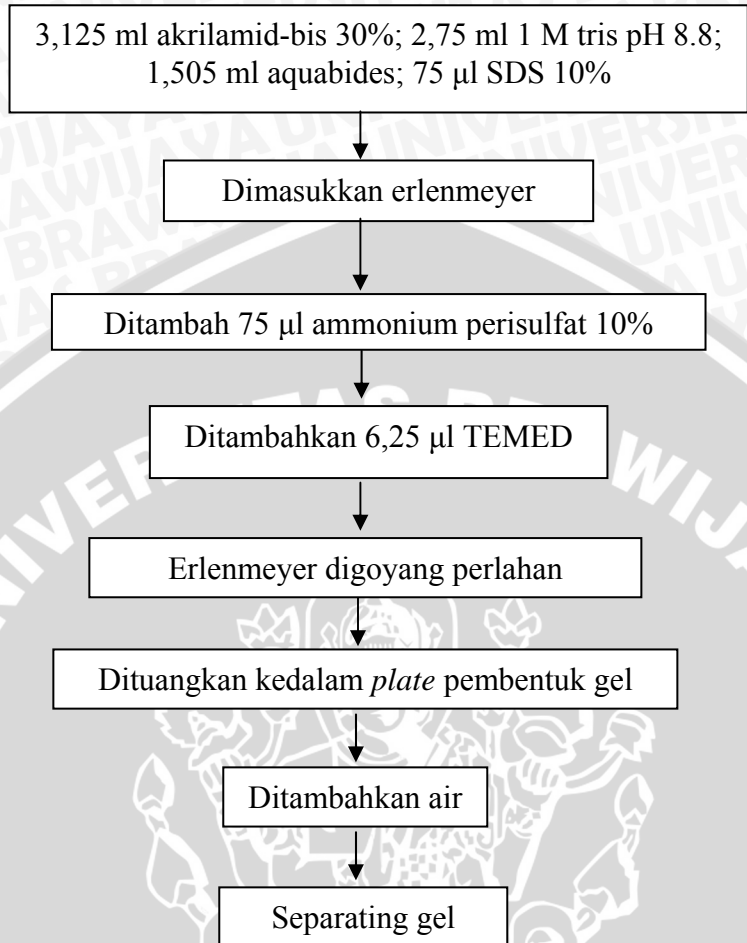
Alat elektroforesis yang terdiri dari tempat dapar anoda dan katoda umumnya terbuat dari kawat platinum. Gel dibentuk diantara 2 lempeng kaca yang dipisahkan oleh spacer plastik. Sumur sampel dibentuk pada bagian atas gel dengan menggunakan plastic berbentuk sisir yang disisipkan diantara sisi atas lempeng kaca selama proses polimerisasi. Setelah polimerisasi selesai spacer bawah dan plastic pembentuk sumur diangkat dengan hati-hati. Kemudian lempeng kaca tersebut diletakkan diantara dapar anoda dan katode.

Deteksi protein dalam gel dilakukan dengan pewarnaan. Zat pewarna yang digunakan untuk deteksi protein 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 dicuci dalam methanol asam asetat dan air.

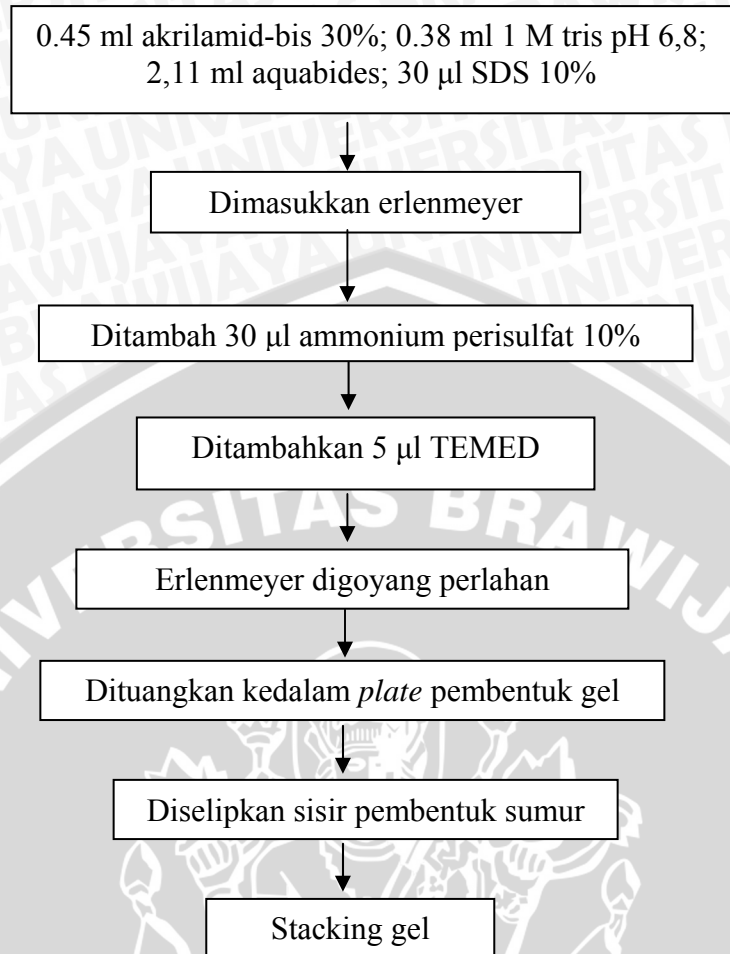
Dari hasil pewarnaan diperoleh hasil elektroforegram yang berupa pita-pita protein. Pada elektroforegram diukur jarak pergerakan masing-masing protein standart dan dicatat nilai Rf-nya. Digambarkan kurva standart berat molekul. Prosedur elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 13, 14, 15, 16 dan 17.



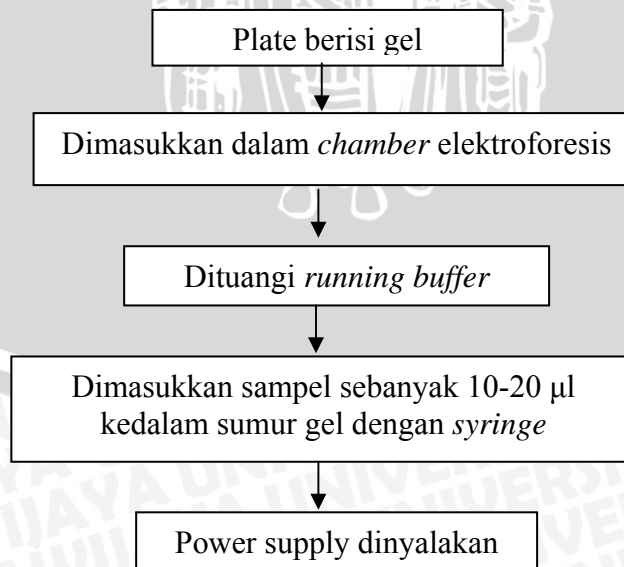
Gambar 13. Preparasi sampel elektroforesis



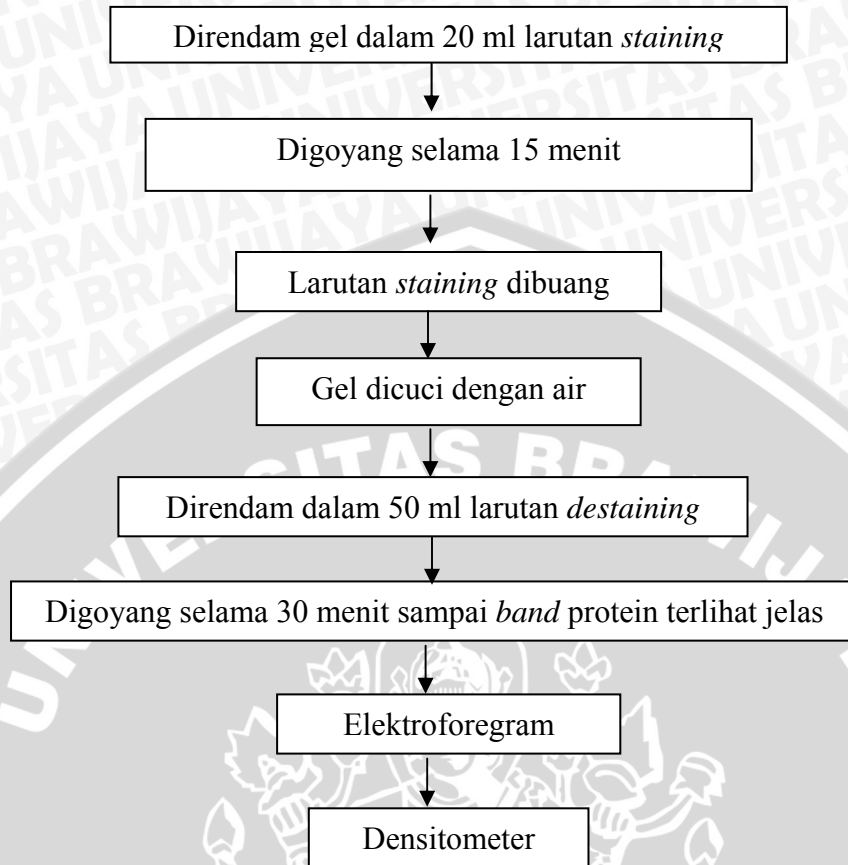
Gambar 14. Pembuatan Separating Gel



Gambar 15. Pembuatan Stacking Gel



Gambar 16. Proses Injeksi Sampel



Gambar 17. Pewarnaan Gel

3.4.6 Densitometer

Dari hasil elektroforesis dapat diperoleh dua macam data yaitu data kualitatif berupa pita-pita protein dalam suatu elektroforegram dan data kuantitatif dari hasil scanning dengan menggunakan alat densitometer. Densitometer adalah alat yang digunakan untuk mengetahui derajat atau kadar dari suatu pita protein yang ada dalam *fotografic film* ataupun gel. Kebanyakan densitometer menggunakan *photoelectric cell* yang secara sederhana cahaya yang berasal dari *photosensitive cell* akan memperlihatkan konsentrasi atau berat dari sampel. Gambaran-gambaran pita-pita elektroforegram akan dirubah menjadi puncak-puncak vertikal yang kemudian dapat diukur secara kuantitatif.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Dari hasil penelitian pada proses presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) diperoleh hasil sebagai berikut :

Tabel 4. Rerata Kadar Protein dan Kadar Albumin

Perlakuan	Kadar Protein (g/dl)		Kadar Albumin (g/dl)	
	Endapan	Supernatan	Endapan	Supernatan
A1	0.753	1.713	0.303	0.313
A2	0.743	1.720	0.403	0.277
A3	0.690	1.433	0.583	0.230
A4	0.757	1.360	0.647	0.193
A5	0.660	1.343	0.567	0.223

Tabel 5. Rendemen Crude Albumin, Kadar Albumin dan Kadar Protein

Ulangan	Rendemen (%)	Albumin (g/dl)	Total Protein (g/dl)
A1	10.16	2.87	5.76
A2	11.46	2.23	4.26
A3	13.12	2.57	4.55

4.2 Protein

Protein merupakan polimer dari sekitar 21 asam amino yang berlainan disambungkan dengan ikatan peptida. Karena keragaman rantai samping yang terbentuk jika asam-asam amino tersebut disambung-disambungkan, protein yang berbeda dapat mempunyai sifat kimia yang berbeda dan struktur sekunder dan tersier yang sangat berbeda (de Man, 1997). Asam amino dalam protein bersifat amfoter yang memiliki ion dipolar (zwitter ion) sehingga dapat bereaksi dengan asam maupun basa. Protein bersifat

labil dan dapat dilakukan modifikasi dalam suatu larutan dengan adanya perubahan terhadap pH, penambahan garam, dan solvent (White, *et. al.*, 1959).

Kadar protein total dalam serum pada orang dewasa berkisar antara 6-8,2 g/dl. Protein total dalam serum merupakan campuran berbagai protein yang masing-masing mempunyai fungsi yang berlainan. Protein merupakan makromolekul dan tidak dapat menembus membran pembuluh darah, sehingga berperan untuk mempertahankan tekanan osmotik darah (Soewoto, *et. al.*, 2001).

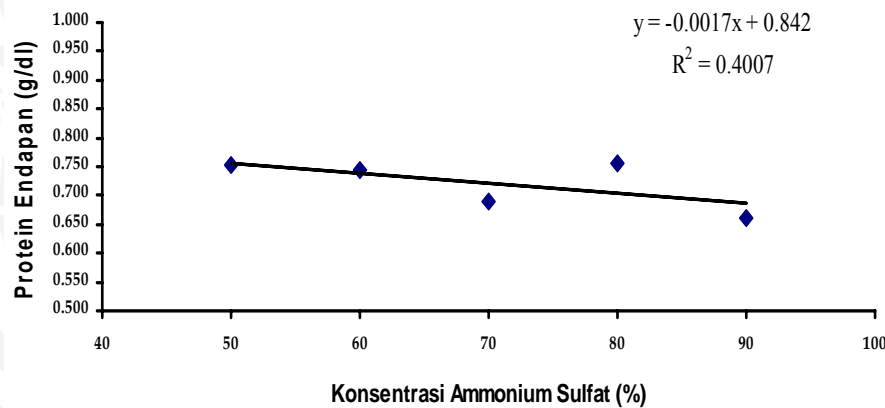
Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa rata-rata protein yang dapat terpresipitasi dengan penambahan ammonium sulfat pada konsentrasi 50%-90% yaitu berkisar antara 0,660-0,757 g/dl. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan penambahan konsentrasi ammonium sulfat memberikan pengaruh yang nyata ($F_{hit} (10,814) > F_{tabel} 5\% (3,48)$) terhadap presipitasi protein. Data hasil penelitian dan analisis ragam dapat dilihat pada Lampiran 3. Rerata kadar protein endapan akibat pengaruh penambahan konsentrasi ammonium sulfat dengan menggunakan Uji BNT 5% dapat dilihat pada Tabel 6 dibawah ini.

Tabel 6. Uji BNT 5% Rerata Kadar Protein Endapan

Perlakuan	Rerata	Notasi
A5	0.660	a
A3	0.690	ab
A2	0.743	b
A1	0.753	b
A4	0.757	b

Berdasarkan Tabel 6 diatas menunjukkan bahwa nilai rerata kadar protein endapan tertinggi pada perlakuan A4 (konsentrasi ammonium sulfat 80%) yaitu sebesar 0,757 g/dl. Perlakuan A4 nilainya tidak berbeda nyata dengan perlakuan A1 dan A2,

namun berbeda nyata dengan perlakuan A5 dan A3. Dari data diatas diketahui bahwa terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi ammonium sulfat terhadap kadar protein endapan. Hal ini dikarenakan ammonium sulfat yang ditambahkan pada saat proses presipitasi akan mempengaruhi kelarutan protein sehingga kadar protein yang terpresipitasi juga akan berbeda-beda sesuai dengan konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan sebagai presipitan. Menurut West, *et, al.*, (1970), penambahan ammonium sulfat sebagai garam pada suatu larutan didasarkan pada kelarutan protein, dimana penambahan konsentrasi ammonium sulfat pada konsentrasi tinggi akan mengurangi kelarutan protein sehingga protein akan mengendap yang selanjutnya disebut dengan efek salting-out. Protein ikan bersifat tidak stabil dan mempunyai sifat yang berubah-ubah sesuai dengan kondisi lingkungannya. Apabila larutan protein tersebut dalam suasana asam hingga mencapai pH 4,5 maka terjadi efek salting-out, sehingga protein dapat dipresipitasi (Junianto, 2003). Proses presipitasi ini terjadi karena persaingan antara molekul ammonium sulfat dengan protein untuk mengikat air. Pada konsentrasi tinggi, kekuatan ionik garam semakin kuat sehingga garam lebih dapat mengikat molekul air. Dengan berkurangnya molekul air yang terikat pada protein sehingga gaya tarik-menarik antara molekul protein lebih besar dibandingkan gaya tarik-menarik air dan protein, sehingga dalam kondisi demikian protein akan mengendap (Fatchiyah, *et, al.*, 2006). Grafik hubungan konsentrasi ammonium sulfat terhadap kadar protein endapan dapat dilihat pada Gambar 18 dibawah ini.



Gambar 18. Grafik Hubungan Konsentrasi Ammonium Sulfat Terhadap Protein Endapan

Dari Grafik diatas diketahui bahwa rata-rata total protein endapan tertinggi terdapat pada konsentrasi ammonium sulfat 80% sebesar 0,757 g/dl, sedangkan rerata total protein endapan terendah pada konsentrasi 90% sebesar 0,660 g/dl. Pada konsentrasi ammonium sulfat 50% dan 60% mempunyai kadar protein yang cukup tinggi yaitu sebesar 0,753 g/dl dan 0,743 g/dl. Hal ini dikarenakan masih tingginya fraksi globulin yang ikut terendapkan pada saat proses presipitasi albumin. Kadar protein endapan dihitung dengan menggunakan metode biuret yang menyatakan kadar albumin dan globulin dalam larutan. Menurut Harper, *et.al.*, (1979) analisis total protein dalam serum, selain menggunakan non protein nitrogen, menggunakan estimasi total albumin dan globulin. Konsentrasi globulin didapatkan dari pengurangan konsentrasi albumin dengan total protein. Konsentrasi dari 2 komponen major fraksi protein tersebut biasanya disebut sebagai rasio albumin-globulin (A/G) rasio. Fraksi plasma protein dapat terpresipitasi dengan metode salting-out, dimana dengan penambahan separuh dari tingkat kejenuhan ammonium sulfat maka fraksi globulin akan terendapkan (Karlson, 1965). Hal ini menyebabkan tingginya nilai kadar protein endapan. Kenaikan dan

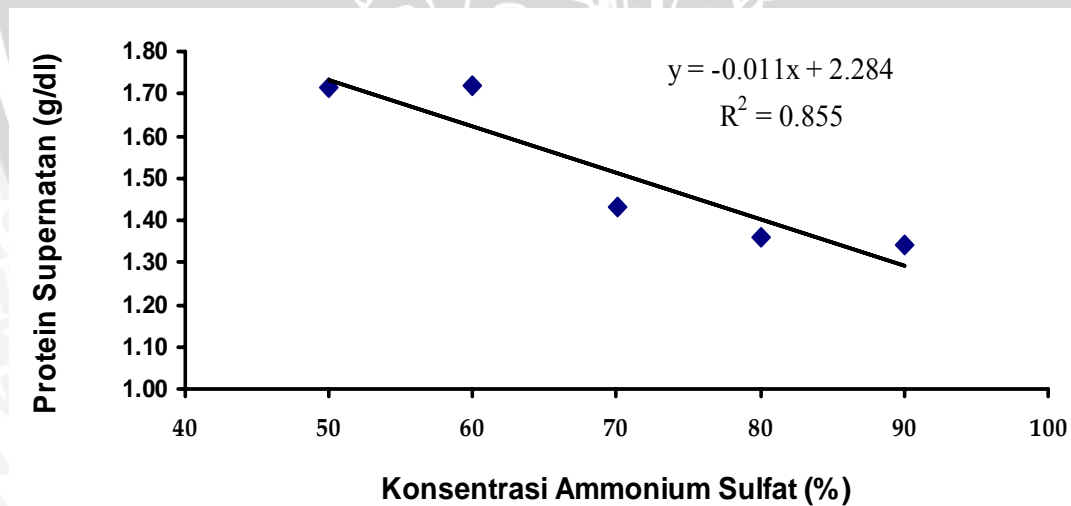
penurunan presipitasi protein endapan dikarenakan pengaruh dari perubahan kelarutan protein dalam larutan. Menurut Zayas, (1997), proses pengendapan protein dengan penambahan garam merupakan fungsi dari kelarutan protein. Kelarutan suatu jenis protein dipengaruhi oleh keseimbangan hidrofilik dan hidrofobik komposisi asam amino yang melekat pada molekul protein. Ikatan hidrofobik residu asam amino dan frekuensi muatan adalah hal penting yang menentukan kelarutan. Peningkatan jumlah ammonium sulfat dalam larutan akan meningkatkan frekuensi muatan pada permukaan protein sehingga akan mempengaruhi kestabilan hidrofobik yang akan menyebabkan meningkatnya kelarutan protein, sehingga protein yang mengendap akan semakin berkurang. Ditambahkan oleh Modler, *et. al.*, (1996), 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 hidrofil dan hidrofobik antar protein dengan molekul air yang mengelilinginya, pada kemampuan hidrofobik yang rendah, kelarutan protein meningkat sehingga protein yang terpresipitasi akan berkurang.

Protein supernatan menunjukkan jumlah protein sisa yang belum dapat terpresipitasi dengan penambahan ammonium sulfat. Rerata kadar protein supernatan dengan menggunakan Uji BNT 5% dapat dilihat pada Tabel 7 dibawah ini.

Tabel 7. Uji BNT 5% Rerata Kadar Protein Supernatan

Perlakuan	Rerata	Notasi
A5	1.343	a
A4	1.360	a
A3	1.433	ab
A1	1.713	b
A2	1.720	b

Berdasarkan hasil Uji BNT 5% menunjukkan bahwa kadar protein supernatan tertinggi yaitu pada perlakuan A2 (konsentrasi ammonium sulfat 60%) sebesar 1,720 g/dl, yang nilainya tidak berbeda nyata dengan perlakuan A1. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi yang rendah kelarutan protein dalam larutan ammonium sulfat masih tinggi sehingga protein yang mengendap juga cenderung berkurang, menyebabkan tingginya kadar protein pada supernatan. Pada perlakuan A3, A4 dan A5, nilainya tidak berbeda nyata antara ketiganya dikarenakan kadar protein yang mengendap juga semakin meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi ammonium sulfat. Pada konsentrasi garam yang tinggi kelarutan protein akan berkurang dengan cepat. Keadaan protein pada konsentrasi garam yang tinggi mengacu pada teori Kirkword dimana kelimpahan ion garam pada suatu larutan akan mengurangi kelarutan protein sehingga protein akan mengendap (Seidman *et al.*, 2006). Grafik hubungan kadar protein supernatan dengan ammonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 19 dibawah ini.



Gambar 19. Grafik Hubungan Konsentrasi Ammonium Sulfat Terhadap Protein Supernatan

Grafik tersebut menunjukkan bahwa tidak semua protein dapat terendapkan dengan penambahan ammonium sulfat. Hal ini dikarenakan perbedaan tingkat kelarutan masing-masing jenis protein dalam larutan garam. Menurut Damodaran (19), kelarutan protein pada dasarnya tergantung dari keseimbangan hidrofobik dan hidrofilik yang dipengaruhi oleh komposisi asam amino masing-masing jenis protein. Keseimbangan hidrofobik yang rendah dan frekuensi muatan yang tinggi maka kelarutannya akan tinggi. Dikarenakan masing-masing jenis protein mempunyai komposisi asam amino yang berbeda-beda, maka jenis protein yang banyak mengandung gugus hidrofobik dari residu asam aminonya cenderung akan mengendap karena mempunyai kelarutan yang rendah, namun sebaliknya protein yang mempunyai gugus hidrofilik residu asam amino tinggi maka cenderung kelarutannya akan meningkat, sehingga tidak ikut mengendap. Kadar protein disupernatan akan semakin berkurang seiring dengan meningkatnya konsentrasi ammonium sulfat. Dikarenakan meningkatnya protein yang mengendap. Penambahan jenis ion garam pada suatu campuran protein akan memperlemah kekuatan tarik-menarik diantara molekul protein. Jika penambahan garam yang ditambahkan berlebihan maka akan mengurangi kelarutan protein, sehingga molekul-molekul protein akan berkumpul dan akhirnya mengendap (Voet, *et.al.*, 1999).

4.2 Albumin

Protein yang paling banyak didalam plasma adalah albumin. Albumin memiliki titik isoelektrik sebesar 4,8 jadi memiliki muatan negatif cukup besar pada pH fisiologis. Albumin merupakan protein globosa yang terdiri dari rantai polipeptida tunggal, dan mempunyai berat molekul 66.300 Da (Montgomery *et. al.*, 1993). Albumin bersifat larut air, dapat diendapkan dengan penambahan ammonium sulfat berkonsentrasi tinggi

(70-100%) atau pengaturan pH sampai mencapai titik isoelektriknya yaitu sebesar 4,8 untuk Human Serum Albumin (HSA) (Kusnawijaya, 1981).

Kadar albumin merupakan jumlah fraksi albumin yang terdapat didalam suatu protein yang biasanya dinyatakan dalam g/dl. Albumin merupakan 60% dari total protein serum. Untuk menetapkan kadar fraksi albumin, terlebih dahulu dilakukan penetapan kadar protein total dengan metode biuret, selanjutnya baru ditetapkan kadar fraksi albumin dengan teknik pengikatan warna menggunakan bromkresol hijau. (Soewoto, *et. al.*, 2001). Pengujian kadar albumin dalam endapan bertujuan untuk mengetahui nilai albumin yang dapat terendapkan selama proses presipitasi dengan menggunakan konsentrasi ammonium sulfat yang berbeda-beda sebagai agen presipitan. Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan konsentrasi ammonium sulfat yaitu konsentrasi ammonium sulfat 50% (A1), 60% (A2), 70% (A3), 80% (A4), dan 90% (A5) dengan 3 kali ulangan.

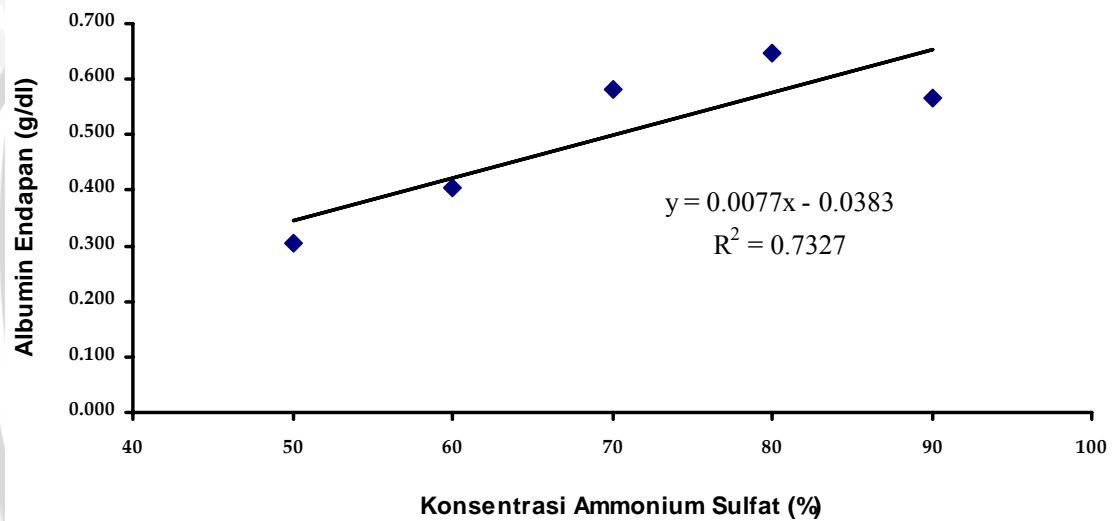
Berdasarkan hasil analisa statistik dapat diketahui bahwa rerata kadar albumin yang dapat terendapkan oleh ammonium sulfat berkisar antara 0,303 – 0,647 g/dl. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan penambahan konsentrasi ammonium sulfat pada proses presipitasi albumin ikan gabus memberikan pengaruh yang sangat nyata $F\text{-hit} (21,27) > F\text{-tabel } 1\% (5,99)$ terhadap kadar albumin endapan ikan gabus. Data hasil penelitian dan analisis ragam dapat dilihat pada Lampiran 1. Rerata kadar albumin endapan ikan gabus dengan menggunakan Uji BNT 5% dapat dilihat pada Tabel 8 dibawah ini.

Tabel 8. Uji BNT 5% Rerata Kadar Albumin Endapan

Perlakuan	Rerata	Notasi
A1	0.303	a
A2	0.403	b
A5	0.567	c
A3	0.583	c
A4	0.647	c

Berdasarkan Uji BNT 5% diketahui bahwa kadar albumin endapan tertinggi yaitu pada perlakuan A4 sebesar 0,647 g/dl (konsentrasi ammonium sulfat 80%). Perlakuan A4 nilainya tidak berbeda secara nyata dengan perlakuan A3 dan A5. Peningkatan konsentrasi ammonium sulfat akan mempengaruhi kadar albumin endapan, seiring dengan meningkatnya konsentrasi ammonium sulfat maka kelarutan albumin akan berkurang sehingga albumin yang mengendap juga akan semakin meningkat. Proses presipitasi albumin dengan ammonium sulfat merupakan fungsi dari kelarutan albumin dalam larutan garam. Menurut Sindumarta dan Natalia (1999), penambahan konsentrasi garam yang semakin tinggi akan mengurangi kelarutan albumin sehingga albumin akan mengendap. Hal ini dikarenakan terambilnya air hidrasi dipermukaan molekul albumin yang selanjutnya disebut efek "salting out". Albumin mempunyai muatan negatif yang tinggi yang ada dipermukaannya pada pH 7,4, sehingga akan menyebabkan molekul air mengumpul pada permukaannya (Montgomery *et al.*, 1993). Penambahan ammonium sulfat sebagai garam pada suatu larutan akan mengakibatkan tertariknya molekul-molekul air yang ada dipermukaan 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). Akibat tertariknya molekul air dari permukaan albumin maka kelarutan albumin dalam campuran akan berkurang. Pada konsentrasi ammonium sulfat yang semakin tinggi maka ikatan antara molekul albumin-albumin lebih besar daripada ikatan molekul air-albumin (Voet *et al.*, 1990). Ikatan antara molekul-molekul albumin akan mengakibatkan molekul-molekul albumin terkoagulasi dalam bentuk interaksi hidrofobik antara yang satu dengan yang lain, sehingga albumin akan terendapkan (Seidman, *et al.*, 2006).



Gambar 20. Grafik Hubungan Konsentrasi Ammonium Sulfat Terhadap Albumin Endapan

Dari Grafik diatas diketahui bahwa rerata kadar albumin tertinggi yaitu pada konsentrasi ammonium sulfat 80% sebesar 0,647 g/dl, dan kadar albumin terendah yaitu pada konsentrasi ammonium sulfat 50% sebesar 0,303 g/dl. Pada umumnya proses presipitasi albumin sama dengan proses pengendapan protein, karena albumin merupakan fraksi dari protein. Menurut Hadiwiyoto, (1993) albumin merupakan bagian dari protein sarkoplasma dalam daging ikan, yang termasuk didalam jenis protein sarkoplasma antara lain : albumin, mioalbumin, mioprotein, globulin dan miostromin.

Jenis-jenis protein yang sama mempunyai karakteristik kelarutan tertentu dalam suatu larutan yang bercampur dengan garam pada konsentrasi dan pH tertentu. Perbedaan karakteristik masing-masing jenis protein ini dapat digunakan untuk membedakan dan mengisolasi jenis protein yang satu dan yang lain. (White, *et, al.*, 1959). Semakin tinggi konsentrasi ammonium sulfat yang ditambahkan maka albumin yang terendapkan akan semakin tinggi. Meningkatnya kadar albumin yang dapat terendapkan, dikarenakan proses presipitasi albumin dipengaruhi oleh berbagai faktor yang berpengaruh terhadap kelarutan albumin. Menurut Wirahadikusumah, (1981), proses presipitasi protein globuler dengan cara penambahan garam didasarkan pada pengaruh yang berbeda-beda daripada penambahan garam tersebut pada kelarutan beberapa protein globuler. Kelarutan dari beberapa jenis protein pada konsentrasi garam yang tinggi akan berkurang secara logaritmik seiring dengan peningkatan konsentrasi garam (ammonium sulfat) sehingga jenis protein yang akan terpresipitasi juga akan semakin meningkat (West, *et,al.*, 1970). Namun pada konsentrasi 90% terjadi penurunan kadar albumin yang terpresipitasi. Hal ini dikarenakan kelarutan albumin dalam larutan kembali meningkat seiring dengan peningkatan kekuatan ion ammonium sulfat dalam larutan akibat penambahan ammonium sulfat yang semakin jenuh. Menurut Cohn and Edsall dalam Voet, *et,al.*, (1990), menunjukkan bahwa kelarutan serum albumin akan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya kekuatan ion dalam larutan ammonium sulfat. Efektifitas berbagai ion dalam mempengaruhi kelarutan protein adalah sama untuk jenis protein yang berbeda-beda, hal ini dikarenakan sifat dari ion ammonium sulfat dan adanya efek hidrasi molekul air. Ditambahkan oleh Modler, *et, al.*, (1996), konsentrasi garam yang semakin meningkat akan meningkatkan elektronegativitas protein, sehingga

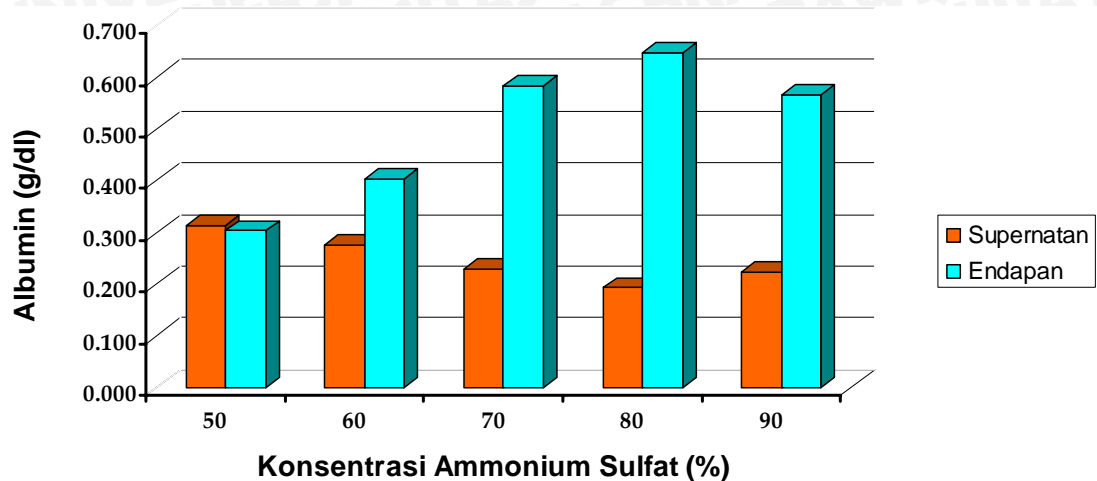
pergerakan gugus hidrofobik akan tidak stabil maka kelarutan protein akan meningkat, sehingga protein yang mengendap akan berkurang.

Untuk mengetahui kadar albumin yang belum dapat terpresipitasi oleh ammonium sulfat maka dilakukan analisa kadar albumin supernatan. Rerata kadar albumin supernatan dengan menggunakan Uji BNT 5% dapat dilihat pada Tabel 9 dibawah ini.

Tabel 9. Uji BNT 5% Rerata Kadar Albumin Supernatan

Perlakuan	Rerata	Notasi
A4	0.193	a
A5	0.223	a
A3	0.230	ab
A2	0.277	b
A1	0.313	b

Berdasarkan tabel tersebut diatas diketahui bahwa kadar albumin supernatan tertinggi yaitu pada perlakuan A1 (konsentrasi ammonium sulfat 50%) sebesar 0,313 g/dl yang nilainya tidak berbeda nyata dengan perlakuan A2. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi ini albumin mulai mengendap. Menurut Parker, (1992) albumin dapat mengendap pada konsentrasi ammonium sulfat 50%. Albumin supernatan terendah pada perlakuan A4 (konsentrasi ammonium sulfat 80%) sebesar 0,183 g/dl yang nilainya tidak berbeda nyata dengan perlakuan A5, namun berbeda nyata dengan perlakuan A1, A2 dan A3. Semakin tinggi kadar albumin endapan maka kadar albumin supernatan semakin berkurang, hal ini dikarenakan albumin supernatan merupakan albumin sisa yang belum dapat terpresipitasi dengan penambahan ammonium sulfat. Grafik hubungan albumin endapan dan albumin supernatan terhadap konsentrasi ammonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 21 dibawah ini.



Gambar 21. Grafik Hubungan Albumin Endapan dan Albumin Supernata Terhadap Konsentrasi Ammonium Sulfat

Dari Grafik tersebut diatas menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara albumin supernatan dengan albumin endapan, dimana meningkatnya albumin endapan maka albumin supernatan akan semakin menurun. Berdasarkan penelitian Nugroho, (2001), pada crude albumin hasil pengukusan dengan waterbath pada suhu 40°C selama 30 menit diperoleh kadar albumin sebesar 145,7 mg/g. Crude albumin tersebut kemudian dimurnikan dengan kromatografi kolom filtrasi gel Sephadex G-75 menghasilkan isolat albumin tertinggi sebesar 1,77 mg/g albumin. Jika dibandingkan dengan isolat albumin hasil presipitasi nilainya jauh lebih besar dimana pada ekstrak kasar crude albumin hasil ekstraksi dengan ekstraktor vakum pada suhu 35 °C selama 12,5 menit dengan kadar albumin sebesar 2,87 g/dl, setelah dipresipitasi dengan ammonium sulfat diperoleh isolat albumin sebanyak 0,647 g/dl. Penambahan ammonium sulfat pada suatu larutan crude albumin tidak dapat mempresipitasi albumin secara keseluruhan. Menurut Voet *et, al.*, (1990), metode pemurnian protein dengan fraksinasi, adalah metode pemurnian yang tidak berdiri sendiri. Karakteristik protein yang berbeda-beda menyebabkan banyak

variasi prosedur pemisahan protein antara lain dipengaruhi oleh kelarutan, kekuatan ion, ukuran molekul, sifat adsorpsi, dan kekuatan tarik-menarik dengan molekul lain. Oleh karena sulitnya mengontrol faktor-faktor tersebut maka proses pemisahan berdasarkan kelarutannya yaitu dengan penambahan garam (ammonium sulfat) tidak dapat mengendapkan albumin secara keseluruhan, sehingga pemurnian dengan cara ini disebut dengan pemurnian parsial. Ditambahkan oleh Janson, *et al.*, (1998), metode presipitasi untuk pemisahan suatu jenis protein hanya dapat merecovery sekitar 40% dari total protein yang ada.

4.3 Rendemen

Rendemen diperoleh dari perbandingan massa akhir ekstrak hasil perasan dengan massa awal daging ikan gabus. Rerata rendemen crude albumin yang dihasilkan dari perasan ekstrak daging ikan gabus berkisar antara 10,46-13,12%. Rendemen tersebut diperoleh dari hasil ekstraksi dengan menggunakan ekstraktor vakum pada suhu pemanasan 35 °C selama 12,5 menit. Perbedaan nilai ini dikarenakan pengaruh kemampuan daging ikan gabus mengikat air selama penyimpanan, dimana selama menunggu proses ekstraksi berlangsung daging ikan disimpan pada suhu dingin berkisar 4-6 °C, sehingga menyebabkan sebagian daging membeku. Semakin lama daging ikan disimpan pada suhu dingin, maka rendemen yang diperoleh semakin meningkat. Menurut de Man, (1997), kemampuan daging mengikat air disebabkan oleh protein otot. Perubahan kemampuan air selama pemrosesan berkaitan dengan air bebas yang ditambat oleh struktur jaringan tiga dimensi dan penyusutan jaringan ini mengakibatkan penurunan air yang tertambat, sehingga dengan sedikit tekanan, air ini akan hilang. Pada proses pendinginan dan pembekuan penurunan kemampuan daging mengikat air terjadi

pada rentang pH isoelektrik otot. Selain itu, pemanasan pada saat proses ekstraksi akan mempengaruhi nilai rendemen. Temperatur yang tinggi akan meningkatkan penurunan daya ikat air oleh protein daging karena daya solubilitas protein daging (Soeparno, 1994). Dari hasil analisa diketahui kadar albumin dari hasil perasan berkisar 2,23-2,87 g/dl, sedangkan kadar protein dari hasil perasan berkisar 4,26-5,76 g/dl. Perbedaan kadar albumin dan protein dari hasil perasan dikarenakan adanya perbedaan faktor umur, jenis kelamin, kebiasaan makan, dari jenis ikan gabus yang digunakan, sehingga mempengaruhi komposisi kimia ikan. Menurut Hadiwiyoto, (1993), faktor-faktor yang mempengaruhi komposisi kimia ikan meliputi : faktor intrinsik yaitu : umur ikan, jenis kelamin, kebiasaan makan, dan tingkat kematangan seksual, sedangkan faktor ekstrinsik atau faktor dari luar yang mempengaruhi komposisi kimia ikan yaitu : kehidupan ikan, persediaan makanan, dan musim. Data rendemen, kadar albumin dan kadar protein dari crude albumin perasan hasil ekstraksi disajikan dalam Lampiran 5.

4.4 Perlakuan Terbaik

Untuk menentukan perlakuan terbaik dari 5 perlakuan dalam eksperimen ini, digunakan uji efektifitas dengan metode (De Garmo). Perlakuan terbaik diperoleh dari total NH (nilai hasil) yang tertinggi dari semua perlakuan. Analisa metode De Garmo dapat dilihat pada Lampiran 6.

Hasil analisis metode De Garmo menunjukkan bahwa perlakuan terbaik untuk proses presipitasi albumin ikan gabus dengan penambahan ammonium sulfat yaitu pada perlakuan A4 (konsentrasi ammonium sulfat 80%), dengan kadar albumin endapan sebesar 0,647 g/dl, kadar albumin supernatan 0,210 g/dl, total protein endapan 0,757 g/dl, dan protein supernatan sebesar 1,360 g/dl.

4.5 Spektrofotometer

Teknik yang dipakai pada alat spektrofotometer menggunakan prinsip tegangan listrik yang terbentuk pada sel fotoelektron setara dengan jumlah radiasi sinar yang mengenainya (Sudarmadji, 1996). Penyerapan cahaya oleh protein terutama disebabkan oleh ikatan peptida, sisa tirosin, triptofan dan fenilalanin, bersama-sama dengan sifat-sifat spectral lainnya yang disumbangkan oleh gugus nonprotein yang berkaitan. Dimana penyerapan maksimal untuk serum albumin manusia terlihat pada spectrum sekitar 230 nm (Montgomery, *et, al.*, 1993). Pada penelitian ini digunakan spektrofotometer cahaya tampak dengan panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan reagen biuret yang mampu mendeteksi protein dengan kadar 1-20 mg/ml.

Dalam penelitian ini dihitung kadar protein, untuk mengetahui kadar protein yang terdapat pada endapan dan supernatan hasil presipitasi. Dari hasil analisa diperoleh nilai kadar protein endapan sebesar 0,419 mg/ml, sedangkan kadar protein supernatan sebesar 1,634 mg/ml.

4.6 Elektroforesis

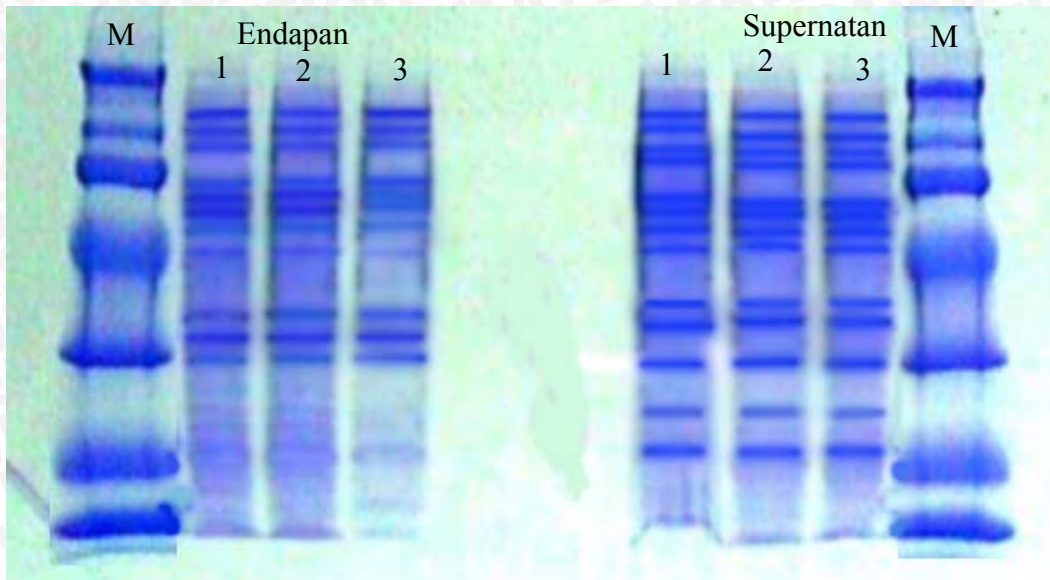
Metode analisis elektroforesis didasarkan atas prinsip bahwa protein dalam suatu larutan, pada pH diatas dan dibawah titik isoelektrik pada medan listrik akan bergerak menuju muatan yang berlawanan dengan muatan protein itu sendiri. Molekul protein dengan jenis yang sama akan bergerak dengan kecepatan yang sama dalam larutan (West, *et,al.*, 1970).

Menurut Lehninger, (1994), pada pH tertentu suatu campuran protein akan mengandung beberapa gugus yang bermuatan positif, bermuatan negatif dan beberapa yang tidak bermuatan. Jika ditempatkan didalam medan listrik protein yang bermuatan

positif akan bergerak menuju electrode negatif dan protein yang bermuatan negatif akan bergerak menuju electrode positif sedangkan yang tidak bermuatan akan tetap. Selain itu molekul protein dengan densitas muatan yang relative tinggi akan bergerak menuju elektroda secara lebih cepat dibandingkan dengan protein densitas rendah.

Elektroforesis biasanya memerlukan media penyangga sebagai tempat bermigrasinya molekul biologi. Gel poliakrilamid dapat digunakan untuk elektroforesis protein dan peptide. Poliakrilamid dibentuk dari polimerisasi struktur monomer akrilamid. Gel poliakrilamid membentuk struktur 3 dimensi, dan konsentrasinya dalam larutan akan mempengaruhi ukuran molekul gel, elastisitas dan kekuatan mekanik (Franks, 1993). Poliakrilamid dapat memisahkan protein dengan kisaran berat molekul 500-250.000 Dalton atau polinukleotida dengan kisaran 5-2000 pasang basa (Fatchiyah, *et. al.*, 2006).

Dalam teknik elektroforesis protein dengan menggunakan media SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), dimana protein dielektroforesis pada buffer yang mengandung SDS. Pada sistem ini protein dalam kondisi disosiasi atau denaturing, dimana SDS akan mengikat pada bagian hidrofobik dari residu asam amino sehingga menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi protein, SDS juga akan menyebabkan terputusnya ikatan disulfide (rusaknya struktur sekunder protein), dan menyebabkan bagian luar molekul protein terselubungi oleh muatan negatif dari SDS sehingga protein akan terseparasi berdasarkan berat molekulnya. Pada saat elektroforesis, protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju electrode positif sampai pada jarak tertentu pada gel poliakrilamid tergantung berat molekulnya (Fatchiyah, *et.al.*, 2006).



Gambar 22. Elektroforegram Profil Protein Endapan dan Supernatan

Keterangan :

M = Marker

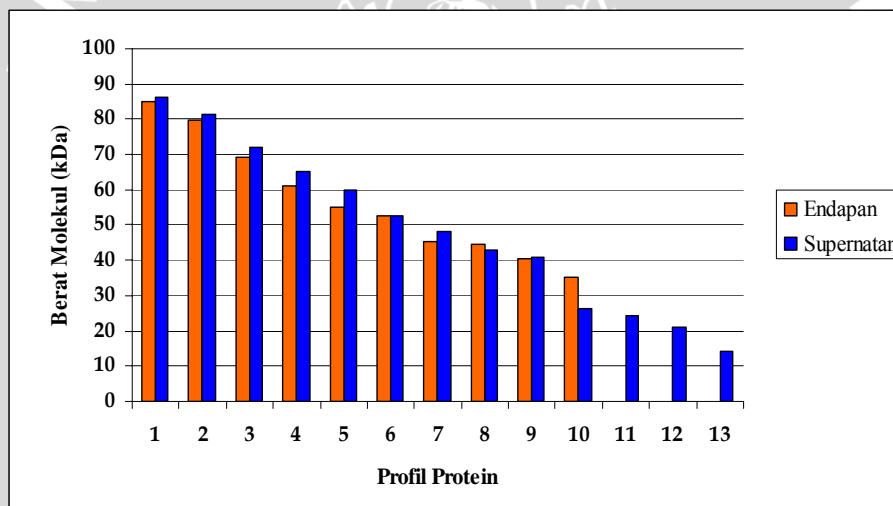
1,2,3 = Sumur 1, Sumur 2 dan Sumur 3

— = Pita/Band Protein hasil elektroforesis

Dari hasil analisis elektroforesis pada albumin endapan dan supernatan diperoleh elektroforegram yang menunjukkan pita-pita (*band*) protein. Protein standar (marker) dijadikan sebagai standar untuk menentukan berat molekul dari setiap pita protein yang terbentuk dalam gel poliakrilamid. Gambar elektroforegram hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 22 diatas. Pita-pita dari marker ini telah diketahui berat molekulnya, sehingga dari kurva standar berat molekul protein standar dapat diperoleh persamaan regresi linier ($y = -1,384x + 2,0952$) dimana $y = \log$ berat molekul standar dan $x =$ nilai R_f dari pita elektroforegram. Dari persamaan ini dapat digunakan untuk menentukan berat molekul dari pita-pita protein yang terbentuk pada endapan dan

supernatan. Data hasil perhitungan nilai R_f dan kurva standar berat molekul dapat dilihat pada Lampiran 7.

Dari hasil perhitungan diketahui bahwa pada endapan albumin ikan gabus hasil presipitasi ammonium sulfat terdapat 10 pita protein, yang mengandung protein dengan kisaran berat molekul 35.15-85.11 kDa. Untuk supernatan terdapat 13 pita protein dengan kisaran berat molekul 14,19-86.1 kDa. Data hasil perhitungan berat molekul dari profil protein endapan dan supernatan dapat dilihat pada Lampiran 8 dan 9. Perbandingan berat molekul terhadap profil protein endapan dan supernatan dapat dilihat pada Gambar 23.



Gambar 23. Grafik perbandingan berat molekul terhadap profil protein endapan dan supernatan.

Profil-profil protein yang telah diketahui beratnya dari hasil elektroforegram dapat dilakukan pendugaan jenis protein berdasarkan berat molekul standar yang dapat dilihat nilainya pada Lampiran 10. Adapun jenis-jenis protein yang dapat diidentifikasi pada protein endapan dan supernatan dapat dilihat pada Tabel 10 dibawah ini.

Tabel 10. Identifikasi Jenis Protein Endapan dan Supernatan

Endapan		Supernatan	
Berat Molekul (Da)	Jenis Protein	Berat Molekul (Da)	Jenis Protein
85.1138	α_1 T-Glycoprotein	86.0994	Haptoglobin Type I
79.6159	Transferrin	81.2831	Galactoglycoprotein
69.1831	Albumin	71.9449	Prothrombin
61.235	Prealbumin	65.013	α_1 -Fetoprotein
54.9541	Prealbumin, thyroxine-binding	61.517	Prealbumin
52.6017	GC Globulin	52.6017	GC Globulin
45.4988	Ovalbumin	48.0839	B ₂ -Glycoprotein I
44.4631	α_1 -Globulin (glycoprotein)	42.9536	Zn- α_2 -Glycoprotein
40.6443	α_1 -Acid glycoprotein	39.7192	α_1 -Acid glycoprotein
35.156	β_2 -Glycoprotein III	26.8534	A ₁ -Microglobulin
		22.3357	Factor D
		19.8609	Retinol-binding protein
		14.1906	Lysozyme

Dari tabel diatas menunjukkan bahwa pergerakan albumin dalam elektroforesis lebih cepat daripada globulin. Menurut Montgomery, *et., al.*, (1993) albumin mempunyai titik isoelektrik sebesar 4,8 sehingga memiliki muatan negatif cukup besar yang mengakibatkan mobilitas albumin anodal yang relatif tinggi pada elektroforegram protein plasma. Berat molekul albumin yang lebih kecil dari globulin akan mempengaruhi pergerakan albumin saat elektroforesis. Pergerakan jenis-jenis protein saat elektroforesis tergantung dari berat molekulnya, dimana semakin rendah berat molekul maka mobilitasnya semakin tinggi sehingga pergerakan protein akan semakin jauh (Fatchiyah, *et.al.*, 2006). Metode elektroforesis didasarkan pada bahwa protein dalam suatu larutan pada pH dibawah atau diatas titik isoelektrik akan bergerak menuju ke kutub yang berlawanan dengan muatan protein itu sendiri. Pada saat elektroforesis

semua molekul protein plasma akan bermuatan negatif karena adanya penambahan buffer veronal pada pH 8,6 sehingga semua jenis protein akan menuju kutub positif (West, *et. al.*, 1970).

Dari Tabel 10 diatas menunjukkan bahwa ada 4 jenis albumin yang dapat terpresipitasi yaitu :

a. Albumin

Albumin adalah protein essensial yang merupakan komponen utama dalam darah hampir 50% dari protein plasma. Albumin merupakan protein plasma yang paling penting dalam membantu mempertahankan tekanan osmotik dalam darah. Kadar albumin dalam darah adalah 3,5-5,5 g/dl dan merupakan 60% total albumin tubuh yang terdapat dalam plasma dan sekitar 40% sisanya terdapat dalam ruangan antar sel (Julius, 2003)

b. Prealbumin

Pre Albumin biasa dikenal sebagai transthyretin, yang mempunyai waktu paruh dalam plasma selama 2 hari. Prealbumin banyak mengandung triptofan dan sama seperti albumin disintesis didalam hati. Fungsi utama prealbumin adalah untuk mengikat dan transpor protein. Prealbumin dapat digunakan sebagai alat diagnosa untuk perbaikan nutrisi dan mengukur intervensi dari nutrisi dalam tubuh (Warker, 1954)

c. Prealbumin, Thyroxine-Binding

Merupakan jenis protein yang terdiri dari prealbumin yang berikatan dengan albumin dan thyroxine. Prealbumin Thyroxine-Binding bertanggung jawab terhadap pengangkutan hormon tiroksin dari kelenjar tiroid dan 3,5,3-triiodothyronine dalam peredaran darah (Warker, 1954).

d. Ovalbumin

Merupakan komponen protein utama dalam putih telur, terdiri dari 50-60% dari total protein. Ovalbumin terdiri dari 385 asam amino, dan mempunyai berat molekul 45kDa. Ovalbumin terdiri dari glycoprotein dengan 4 glycosylation. Ovalbumin dapat diklasifikasikan sebagai phosphoglycoprotein, ketika fosfat dan glycogen berinteraksi kedalam rantai protein. Ovalbumin dapat diklasifikasikan sebagai albumin ketika gugus prostetik dari sulfat kurang dari 5% dari berat molekul protein dan sifat dari ovalbumin secara umum berhubungan dengan albumin (Cassels, 2005).

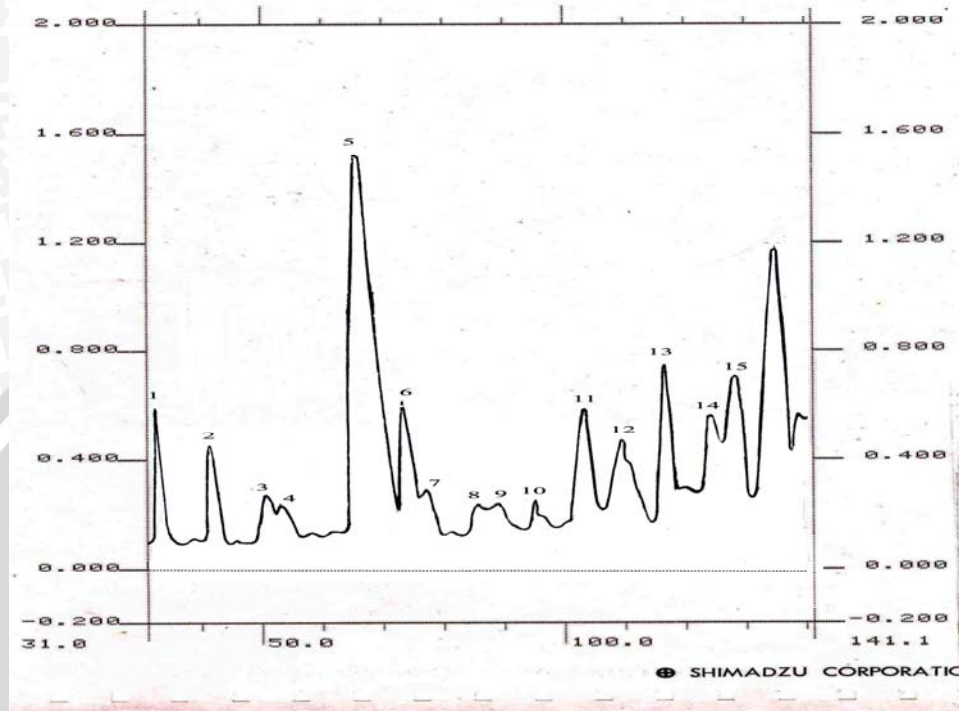
Dari tabel diatas juga menunjukkan bahwa tidak semua jenis molekul albumin dapat terpresipitasi, jenis prealbumin masih terdapat pada supernatan. Pada endapanpun, juga masih ada fraksi globulin yang ikut mengendap yaitu golongan α_1 -Globulin, β_2 -Globulin. Hal ini menunjukkan bahwa pada endapan masih dikotori oleh molekul lain yang ikut mengendap bersama-sama albumin. Pada presipitasi plasma protein dengan ammonium sulfat menunjukkan bahwa albumin dan globulin mempunyai kesesuaian dalam kelarutan dan karakteristik salting-out, sehingga sulit untuk memisahkan albumin dan globulin (White, *et. al.*, 1959).

4.6 Analisa Kadar Protein dengan Densitometer

Pada tahap akhir pemisahan protein, pita diwarnai dan diperiksa dengan densitometer yang mengubah gambaran pita menjadi puncak-puncak vertikal yang dapat diukur secara kuantitatif (Harper, *et.al.*, 1979). Densitometer adalah alat yang digunakan untuk menganalisa secara kuantitatif elektroforegram hasil elektroforesis. Dengan menggunakan peralatan optik yang sesuai sehingga dapat dibuat rekaman fotografi dari variasi refraksi indeks dan menentukan tingkat pergerakan berbagai jenis protein (West,

et.al., 1970). Hal-hal yang berhubungan dengan densitometer elektroforegram meliputi : pergerakan protein berdasarkan Hukum Beer's (*adsorpsi optical*), perbedaan adsorpsi dari berbagai jenis protein yang berbeda (pengukuran area salah satu puncak dan dibagi dengan total area semua puncak). Penggunaan standard dan kurva standar seperti HPLC merupakan salah cara yang dapat digunakan untuk analisa densitometerik (Franks, 1993).

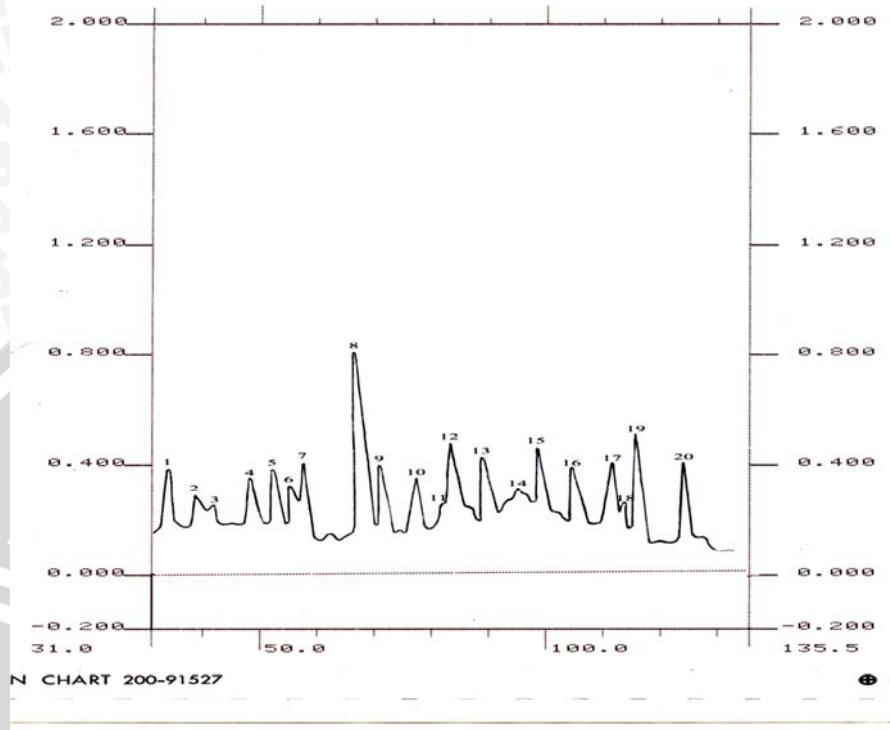
Hasil analisis dengan densitometer pada endapan hasil presipitasi terdeteksi 15 puncak dengan persentase masing-masing puncak secara berurutan yaitu : 8,0%; 6,7%; 3,4%; 2,8%; 20,3%; 6,7%; 3,3%; 2,6%; 2,6%; 2,7%; 7,2%; 6,2%; 10,6%; 7,5%; 9,5%. Sedangkan pada elektroforegram supernatan terdapat 20 puncak dengan persentase masing-masing puncak yaitu : 4,4%; 2,1%; 1,2%; 3,9%; 4,4%; 2,8%; 4,9%; 15,2%; 7,8%; 4,8%; 1,1%; 8,6%; 4,6%; 1,3%; 4,6%; 5,0%; 5,6%; 1,1%; 9,4%; 7,2%. Data pengukuran densitometer dapat dilihat pada Lampiran 11 dan 12. Kadar masing-masing profil protein endapan dan supernatan dapat dilihat pada Tabel 11 dibawah ini. Densitogram protein endapan dan supernatan dapat dilihat pada Gambar 23 dan 24.



Gambar 24. Densitogram Protein Endapan

Keterangan :

- | | |
|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. α_1 T-Glycoprotein | 11. GC Globulin |
| 2. Transferrin | 12. Ovalbumin |
| 3. – (tidak teridentifikasi) | 13. Prealbumin, thyroxine-binding |
| 4. – (tidak teridentifikasi) | 14. α_1 -Acid glycoprotein |
| 5. Albumin | 15. β_2 -Glycoprotein III |
| 6. Prealbumin | |
| 7. – (tidak teridentifikasi) | |
| 8. – (tidak teridentifikasi) | |
| 9. – (tidak teridentifikasi) | |
| 10. α_1 -Globulin (glycoprotein) | |



Gambar 25. Densitogram Protein Supernatan

Keterangan :

- | | |
|------------------------------|-----------------------------------|
| 1. – (tidak teridentifikasi) | 11. β_2 -Glycoprotein I |
| 2. – (tidak teridentifikasi) | 12.(tidak teridentifikasi) |
| 3. – (tidak teridentifikasi) | 13. Zn- α_2 -Glycoprotein |
| 4. Haptoglobin Type I | 14. α_1 -Acid glycoprotein |
| 5. – (tidak teridentifikasi) | 15. α_1 -Microglobulin |
| 6. Galactoglycoprotein | 16. Factor D |
| 7. Prothrombin | 17. Retinol-binding protein |
| 8. α_1 -Fetoprotein | 18. – (tidak teridentifikasi) |
| 9. Prealbumin | 19. Lysozyme |
| 10. GC Globulin | 20.– (tidak teridentifikasi) |

Tabel 11. Kadar Profil Protein Endapan dan Supernatan

Kadar (%)	Jenis Protein	Kadar (%)	Jenis Protein
8	α_1 T-Glycoprotein	3.9	Haptoglobin Type I
6.7	Transferrin	2.8	Galactoglycoprotein
20.3	Albumin	4.9	Prothrombin
6.7	Prealbumin	15.2	A ₁ -Fetoprotein
2.7	Prealbumin, thyroxine-binding	7.8	Prealbumin
7.2	GC Globulin	4.8	GC Globulin
6.2	Ovalbumin	1.1	β_2 -Glycoprotein I
10.6	α_1 -Globulin (glycoprotein)	4.6	Zn- α_2 -Glycoprotein
7.5	α 1-Acid glycoprotein	1.3	α 1-Acid glycoprotein
9.5	β_2 -Glycoprotein III	4.6	α_1 -Microglobulin
		5.0	Factor D
		5.6	Retinol-binding protein
		9.4	Lysozyme

Dari Tabel diatas menunjukkan bahwa kadar total albumin (albumin, prealbumin, prealbumin-thyroxine-binding, dan ovalbumin) sebesar 35,9% sedangkan jenis komponen lain (α -Globulin dan β -Globulin) sebesar 49,5%. Preparat albumin yang beredar diIndonesia adalah Plasbumin dari cutter yang mengandung 25% NSA (Normal Serum Albumin) yang terdiri dari 96% albumin dan 4% globulin. Preparat lain adalah Plasma Protein Fraction (PPF) yang mengandung 83% albumin dan 17% globulin. Preparat ini kurang murni dibandingkan NSA (Tandra, *et al.*, 1988). Untuk memenuhi standar tersebut diatas, maka perlu proses lebih lanjut untuk pemurnian albumin dengan mengurangi kadar globulin. Nilai kadar albumin endapan sebesar 20,3% lebih banyak dibandingkan dengan komponen yang lain. Berdasarkan penelitian Ditalia (2004) pada identifikasi protein ikan gabus perairan danau menunjukkan bahwa kandungan albumin ikan gabus sebesar 0,8% dari total keseluruhan jenis protein. Pengukuran puncak-puncak

jenis-jenis protein dengan densitometer didasarkan atas urutan ukuran dan bentuk dari protein (West, *et.al.*, 1970). Albumin akan bergerak lebih cepat dibandingkan jenis protein lain pada pita elektroforegram. Menurut Karlson, (1965), hasil fotometer pita elektroforegram pada human serum plasma normal, masing-masing jenis protein akan menempati urutan sebagai berikut : albumin 59,2%, α_1 -Globulin 3,9%, α_2 -Globulin 7,5%, β -Globulin 12,1%, γ -globulin 17,3%.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

- Penggunaan ammonium sulfat pada konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*).
- Perlakuan terbaik diperoleh pada penambahan konsentrasi ammonium sulfat 80% dengan kadar albumin sebesar 0,647 g/dl dan kadar protein endapan sebesar 0,757 g/dl. Dengan analisa densitometer pada elektroforegram menunjukkan bahwa kadar albumin endapan sebesar 20,3% dari total protein endapan.

5.2 Saran

Dari penelitian disarankan agar :

- Dilakukan penelitian lanjutan untuk pemurnian albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dari hasil presipitasi dengan ammonium sulfat, hingga diperoleh albumin murni tanpa dikotori oleh komponen protein lain sehingga diperoleh albumin murni yang dapat dikonsumsi manusia.
- Dilakukan penelitian lanjutan mengenai jenis-jenis garam lain yang dapat digunakan untuk presipitasi albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) untuk memperoleh kualitas dan rendemen albumin yang terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- _____, 2006^a Albumin.. <http://www.classis.encyclopedia.com/albumin.html>. Diakses tanggal 03 April 2007
- _____, 2006^b. Interaction Of SWP With Bovine Serum Albumin <http://friedli.com/research/phd/chapter5a.html>. Diakses tanggal 03 April 2007
- Afrianto, E., dan E, Liviawaty., 1989. Pengawetan dan Pengolahan Ikan. Kanisius. Yogyakarta. 125 hal
- Agustini, D, F., 2006. Pengaruh Pemberian Serbuk Albumin Ikan Terhadap Penutupan Luka Pada Tikus Putih Wistar (*Rattus novergicus*). Fakultas Perikana. Universitas Brawijaya. Malang. Tidak Diterbitkan. 102 hal
- Asmawi, S., 1986. Pemeliharaan Ikan dalam Keramba. Gramedia. Jakarta. 82 hal
- Ball, D. W., 2006. Basic Biochemical Techniques. Virginia Tech http://www.biotech.vt.edu/classes/bion_4784/9-ProteinPurification/ProteinPurification.html. Diakses tanggal 03 April 2007
- Boder, E. T., 2006. Electroforesis. <http://www.seas.upenn.edu/courses/belab/electrophoresis>. Diakses tanggal 28 April 2007
- Cholik, F., Jagatraya, A.G., Poernomo, R.P., Jauzi, A., 2005. Akuakultur. PT Victoria Kreasi Mandiri. Jakarta. 115 hal
- Cassels, C., 2005. Prealbumin. Medscape Medical News. http://www.healthtouch.com/bin/EContent_HT/cnoteShowLfts.asp?fname=07039&title=PREALBUMIN+&cid.html. Diakses tanggal 16 Mei 2007
- Considine, D, M., and Considine, G, D., 1973. Encyclopedia of Chemistry. 4th Edition. Van Nostrad Reinhold Company. New York. 781 hal
- Damodaran, S and Paraf, A., 1998. Food Protein and Their Application. Marcel Dekker, Inc. New York. 681 hal
- Davidson, V.L., and Sittman, D., B., 1999. Biochemistry 4th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Mississipi. 160 hal
- De Man, J. M., 1997. Kimia Pangan. Edisi 2. Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung. 550 hal

- Ditalia, A., 2004. Identifikasi Protein Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*) Pada Perairan Danau dan Perairan Payau Dengan Teknik Elektroforesis. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 79 hal
- Fatchiyah., Arumingtyas, E, L., Widyarti, S., dan Rahayu, S., 2006. Analisa Biologi Molekuler. Isolasi DNA, PCR dan RFLP, SDS-PAGE, Immunobloting dan Isoenzym. Jurusan Biologi. Universitas Brawijaya. Malang. 88 hal
- Franks, F., 1993. Protein Biotechnology. Humana Press. New Jersey. 592 hal
- Hadiwiyoto, S., 1993. Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan I. Liberty. Jakarta. 275 hal
- Harper, H.A., W.N, Rodwell., and P.A. Mayes., 1979. Biokimia. Review of Phsiological Chemistry. Alih Bahasa : Martin Muliaman. San Fransisco. 743 hal
- Iskandar, Y., 1991. Biokimia. Bagian I. Yayasan Dharma Graha. Yogyakarta. 201 hal
- Jones, U. S., 1982. Fertilizer and Soil Fertility. Reston Publishing Company. A Prentice Hall Company. Reston Virginia. 421 hal
- Julius., 2003. Metabolisme Albumin Pada Penderita Penyakit Hati. Sub Bagian Hepatogastroenterologi Penyakit Dalam. Fakultas Kedokteran. Unand.
<http://www.innews.com/albumin.htm>
- Janson, J., C., and Ryden, L., 1998. Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications. John Willey and Son, Inc. Canada. 572 hal
- Karlson, P., 1965. Introduction to Modern Biochemistry. 2nd Edition. Academic Press. New York. 436 hal
- Krause, M. V and Hunscher, M.A., 1972. Food Nutrition and Diet Theraphy. WB. Saunders Company. Philadelphia. London. Toronto. 620 hal
- Kottelat, M., Whitten, A. J., Kartika, S.N., Wirjoatmodjo, S., 1993. Ikan Air Tawar Indonesia Bagian Barat dan Sulawesi. Periplus Editions (HK) Ltd. Jakarta. 234 hal
- Kusnawijaya., 1981. Biokimia. Alumni Press. Jakarta. 146 hal
- Landry., 1999. Protein Puriffication Methods a Practical Approach.
<http://www.tulane.edu/~biochem/med/pure.htm>. Diakses tanggal 10 April 2007
- Linder., Maria, C., 1992. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian secara Klinis. Alih Bahasa : Aminuddin Parakkasi. Universitas Indonesia Pers. Jakarta. 781 hal

- Lebutton, A. V., 1967. Journal Precursor-Product Relation Between Interhepatic Albumin and Plasma Albumin. Department of Anatomy, Center for The Health Science. Los Angles.
- Lehninger, A., 1982. Dasar-Dasar Biokimia. Erlangga. Jakarta. 369 hal
- Martin, D.W., P.A. Mayes., V.W, Rodwell and D.K. Granner., 1982. Biokimia I. Darmawan. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 686 hal
- Muchtadi, D., Palupi, N. S., Astawan, M., 1992. Metode Kimia, Biokimia dan Biologi dalam Evaluasi Nilai Gizi Pangan Olahan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 324 hal
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 1993. Harper's Biochemistry. Appleton and Large Norwol. CT. Canada. 806 hal
- Modler, H. W and Nakai, S., 1996. Food Proteins. Properties and Characterization. VCH Publisher, Inc. New York. 382 hal
- Montgomery, R., R.L Dryer., Conway, T.W and Spector A, A., 1993. Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Jilid 1. Edisi ke-4. Alih Bahasa : Ismadi. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 686 hal
- Parker, S, P., 1992. Encyclopedia of Chemistry. 2nd Edition. McGraw-Hill, Inc. New York. 2065 hal
- Poedjiadi, A., 1994. Dasar-Dasar Biokimia. UI Press. Jakarta. 472 hal
- Peters, T., 2006. Albumin. http://www.brookscole.com/chemistry_d/templates/student_resources/0030223180_garrettgrisham/StructureTutorials/albumin/index.html. Diakses tanggal 03 April 2007
- Putnam, F. W., 1984. The Plasma Proteins. Volume IV. 2nd Edition. New York Press. New York. 420 hal
- Saanin, H., 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Penerbit Liberty. Jakarta. 245 hal
- Sudarmadji, S., 1996. Teknik Analisa Biokimiawi. Liberty. Yogyakarta. 322 hal
- Suprayitno, E., 2003. Penyembuh Luka, Gabus Temuan Sang Profesor. Surabaya. www.kompas/penyembuh-luka/15jan2003/co.ltd. Diakses tanggal 12 Februari 2007

- Seibt, G., 2006. Albumin. Berlin.
http://www.medinnovation.de/background/alb_struc.htm. Diakses tanggal 03 April 2007
- Seidman, L., and Mowery, J., 2006. Salting out: Ammonium Sulfate Precipitation.
http://matcmadison.edu/biotech/resources/proteins/labManual/chapter_4/section4_2.htm. Diakses tanggal 13 Maret 2007
- Setyawidjadja, D., 1987. Pupuk dan Pemupukan. CV Simplex. Jakarta. 122 hal
- Sindumarta, H., dan Natalia, D., 1999. Catatan Kuliah : Biokimia I : Struktur dan Katalis. Jurusan Kimia. Fakultas MIPA. ITB. Bandung. 101 hal
- Soeparno., 1994., Ilmu dan Teknologi Daging. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 346 hal
- Soewoto, H., Sadikin, 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. 187 hal
- Suprayitno, E., 2005. Pemanfaatan Ikan Hiu Sebagai Nutrisi Untuk Pasien Pasca Bedah. Seminar. Universitas Brawijaya. Malang. Tidak Diterbitkan. Hal 1-15
- Schumm, D, E., 1993. Intisari Biokimia. Alih Bahasa Sadikin, M. Binarupa Aksara. Jakarta. 477 hal
- Tandra, H., Soemarto, W., Tjokro, P., 1988. Metabolisme dan Aspek Klinik Albumin. Laboratorium Penyakit Dalam. Fakultas Kedokteran. Unair. Surabaya. Hal 249-254
- Voet, D., and Voet, Judith, G., 1990. Biochemistry. John Willey and Sons. New York. 1223 hal
- Voet, D., Voet, J.G., and Pratt, C. W., 1999. Fundamental Of Biochemistry. John Willey and Sonc.Inc. New York. 1018 hal
- Warker., 1954. Ovalbumin. http://www.answers.com/topic/ovalbumin-2#wp_ref-0
Diakses tanggal 16 Mei 2007
- White, A., Handler, P., and Smith, E, L., 1959. Principles of Biochemistry. Mc Graw-Hill Book Company. London. 1106 hal
- Wilbur, H and Campbell., 1999. Ammonium Sulfate Fractination.
http://instruct1.cit.cornell.edu/course/biobm330/protlab/ammonium_sulfate.html. Diakses tanggal 12 Februari 2007
- Winarno, F. G., 2002. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia. Jakarta. 251 hal

- Wirahadikusumah, M. 1981. Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat. ITB. Bandung. 574 hal
- West, E, S., Todd, W, R., Mason, H, S., and Bruggen, J, T, V., 1970. Text Book of Biochemistry. 4th Edition. The Macmillan Company. London. 1423 hal
- Yitnosumarto, S., 1993. Percobaan, Perancangan, Analysis dan Interpretasinya. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 285 hal
- 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. 92 hal
- Zayas, J. F., 2003. Functionality of Proteins in Food. Springer. Verlag. New York. 373 hal



Lampiran 1 . Prosedur Analisa Albumin Metode *Brom Cresol Green* (Eltech, 2006)

Prosedur analisa kadar albumin metode *Brom Cresol Green* adalah sampel sebanyak 0,02 ml dicampur dengan reagen sebanyak 3,1 ml, kemudian dikocok, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 menit, dibaca absorbansinya dengan spectrophotometer SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 628 nm. Standar: albumin standar sebanyak 0,02 ml dicampur dengan reagen sebanyak 3,1 ml, kemudian dikocok, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 menit, dibaca absorbansinya dengan *spectrophotometer* SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 628 nm. Blanko: reagen sebanyak 0,02 ml diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 menit, dibaca absorbansinya dengan *spectrophotometer* SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 628 nm. Diagram alir uji kadar albumin dapat dilihat pada Gambar 10. Konsentrasi albumin dalam filtrat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar albumin (C)} = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standart}} \times \text{actual value}_{\text{precinorm}}^{\text{®}} \text{ u (g/L)}$$

Lampiran 2. Prosedur Analisa Protein Metode *Brom Cresol Green* (Eltech, 2006)

Prosedur analisa kadar potein metode *Brom Cresol Green* adalah sampel sebanyak 0,02 ml dicampur dengan reagen sebanyak 3,1 ml, kemudian dikocok, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 menit, dibaca absorbansinya dengan *spectrophotometer* SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 546 nm. Standar: albumin standar sebanyak 0,02 ml dicampur dengan reagen sebanyak 3,1 ml, kemudian dikocok, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 menit, dibaca absorbansinya dengan *spectrophotometer* SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 546 nm. Blanko: reagen sebanyak 0,02 ml diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 menit, dibaca absorbansinya dengan *spectrophotometer* SMA *autoanalyzer* dengan panjang gelombang 546 nm. Diagram alir analisa kadar protein dapat dilihat pada Gambar 11.

Konsentrasi protein dalam filtrat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar albumin (C)} = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standart}} \times \text{actual value } \text{precinorm}^{\text{®}} \text{ u (g/L)}$$

Actual value tercantum dalam kit “*precinorm*”[®] U pada bagian SMA *autoanalyzer*

Lampiran 3. Analisis Data Albumin Endapan

Data Albumin Endapan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	B1	B2	B3		
A1	0.28	0.31	0.32	0.91	0.303
A2	0.51	0.35	0.35	1.21	0.403
A3	0.6	0.59	0.56	1.75	0.583
A4	0.58	0.69	0.67	1.94	0.647
A5	0.55	0.54	0.61	1.7	0.567
Total	2.52	2.48	2.51	7.51	

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.711	4	10	.079

Sig (0,79) > α (0,05) = Terima Ho (Ragam Homogen)

Analisis Ragam

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.243	4	.061	21.270	.000
Within Groups	.029	10	.003		
Total	.271	14			

F table 1% = 3,48

F table 5% = 5,99

F hit (21,270) > F tabel 5% : berbeda nyata

Sig (0,000) < α (0,05) = Terima H1 (berbeda nyata)

Lampiran 4. Analisis Data Albumin Supernatan

Data Albumin Supernatan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	B1	B2	B3		
A1	0,29	0,34	0,31	0,94	0,313
A2	0,31	0,22	0,3	0,83	0,277
A3	0,23	0,25	0,21	0,69	0,230
A4	0,18	0,19	0,21	0,58	0,193
A5	0,21	0,22	0,24	0,67	0,223
Total	1,22	1,22	1,27	3,71	

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.793	4	10	.085

Sig (0,85) > α (0,05) = Terima Ho (Ragam Homogen)

Analisis Ragam

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.027	4	.007	8.589	.003
Within Groups	.008	10	.001		
Total	.035	14			

F table 1% = 3,48

F table 5% = 5,99

F hit (8,589) > F tabel 5% : berbeda nyata

Sig (0,003) < α (0,05) = Terima H1 (berbeda nyata)

Lampiran 5. Analisis Data Protein Endapan

Data Protein Endapan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	B1	B2	B3		
A1	0,73	0,77	0,76	2,26	0,753
A2	0,74	0,76	0,73	2,23	0,743
A3	0,71	0,68	0,68	2,07	0,690
A4	0,72	0,76	0,79	2,27	0,757
A5	0,64	0,66	0,68	1,98	0,660
Total	3,54	3,63	3,64	10,81	

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.655	4	10	.637

Sig (0,637) > α (0,05) = Terima Ho (Ragam Homogen)

Analisis Ragam

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.022	4	.006	10.814	.001
Within Groups	.005	10	.001		
Total	.028	14			

F table 1% = 3,48

F table 5% = 5,99

F hit (10,814) > F tabel 5% : berbeda nyata

Sig (0,001) < α (0,05) = Terima H1 (berbeda nyata)

Lampiran 6. Analisis Data Protein Supernatan

Data Protein Supernatan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	B1	B2	B3		
A1	1.66	1.73	1.75	5.14	1.713
A2	1.84	1.56	1.76	5.16	1.720
A3	1.71	1.25	1.34	4.3	1.433
A4	1.44	1.31	1.33	4.08	1.360
A5	1.57	1.17	1.29	4.03	1.343
Total	8.22	7.02	7.47	22.71	

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.845	4	10	.082

Sig (0,082) > α (0,05) = Terima Ho (Ragam Homogen)

Analisis ragam

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.425	4	.106	4.098	.032
Within Groups	.259	10	.026		
Total	.684	14			

F table 1% = 3,48

F table 5% = 5,99

F hit (4,098) > F tabel 5% : berbeda nyata

Sig (0,032) < α (0,05) = Terima H1 (berbeda nyata)

Lampiran 7. Data Rendemen Ekstraksi

Data Rendemen Ekstraksi

No	Tekanan	Suhu bahan	Massa awal	Massa akhir	Volume			Massa		
					Filtrat	Kondesat	Perasan	Filtrat	Kondensat	Perasan
1	72	35	150,08	132,76	0	0	18,5	0	0	17,2
2	72	36	150,06	133,98	0	0	17	0	0	15,25
3	72	35	150,53	130,09	0	0,1	20	0	0,59	19,75

Hasil Analisa Crude Albumin

Ulangan	Rendemen (%)	Albumin (g/dl)	Total Protein (g/dl)
A1B1	10,16	2,87	5,76
A1B2	11,46	2,23	4,26
A1B3	13,12	2,57	4,55





Lampiran 9. Kurva Standar Berat Molekul

Nilai Rf

No. Pita	a	b	Nilai Rf
1	1.2	9.5	0.126
2	1.6	9.5	0.168
3	2.1	9.5	0.221
4	3.7	9.5	0.389
5	5.1	9.5	0.537
6	5.7	9.5	0.600
7	6.4	9.5	0.674

$$Rumus Rf = \frac{a}{b}$$

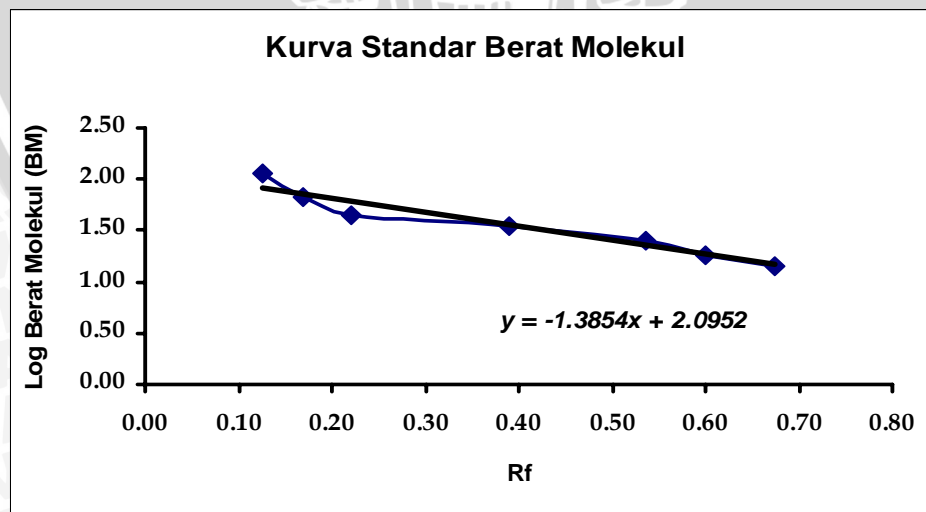
Keterangan : a = jarak pergerakan pita protein dari tempat awal

b = jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal

Data Berat Molekul Protein Standar

No.	Nama Protein	BM (kDa)	Log BM (y)	Rf (x)
1	β-galaktosidase	116	2.064	0.126
2	Bovine serum albumin	66.2	1.821	0.168
3	Oval albumin	45	1.653	0.221
4	Lactate dehydrogenase	35	1.544	0.389
5	Restriction endonuclease	25	1.398	0.537
6	β-lactoglobulin	18.4	1.265	0.600
7	Lysozyme	14.4	1.158	0.674

Kurva Standar Berat Molekul



Lampiran 10. Pengukuran Berat Molekul Protein Endapan

Data Jarak Pergerakan Pita Protein

No. Pita	Jarak Pergerakan Pita Protein Sumur Ke- (cm)			Rata-Rata (cm)
	1	2	3	
1	1.1	1.2	1.1	1.133
2	1.4	1.3	1.3	1.333
3	1.8	1.7	1.75	1.750
4	2.15	2.1	2.1	2.117
5	2.5	2.4	2.4	2.433
6	2.6	2.5	2.6	2.567
7	3	3	3	3.000
8	3.1	3	3.1	3.067
9	3.3	3.3	3.4	3.333
10	3.8	3.8	3.7	3.767

Data Pengukuran Berat Molekul

No. Pita	a	b	Rf (x)	log BM (y)	BM (kDa)
1	1.133	9.5	0.119	1.930	85.1138
2	1.333	9.5	0.140	1.901	79.6159
3	1.750	9.5	0.184	1.840	69.1831
4	2.117	9.5	0.223	1.787	61.235
5	2.433	9.5	0.256	1.740	54.9541
6	2.567	9.5	0.270	1.721	52.6017
7	3.000	9.5	0.316	1.658	45.4988
8	3.067	9.5	0.323	1.648	44.4631
9	3.333	9.5	0.351	1.609	40.6443
10	3.767	9.5	0.396	1.546	35.156

$$\text{Rumus } R_f = \frac{a}{b}$$

Keterangan : a = jarak pergerakan pita protein dari tempat awal

b = jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal

Lampiran 11. Pengukuran Berat Molekul Protein Supernatan

Data Jarak Pergerakan Pita Protein

No. Pita	Jarak Pergerakan Pita Protein Sumur Ke- (cm)			Rata-Rata (cm)
	1	2	3	
1	1.15	1.15	1	1.100
2	1.3	1.3	1.2	1.267
3	1.7	1.6	1.6	1.633
4	2	1.9	1.9	1.933
5	2.1	2.1	2.1	2.100
6	2.6	2.6	2.5	2.567
7	2.8	2.9	2.8	2.833
8	3.2	3.2	3.1	3.167
9	3.3	3.3	3.35	3.317
10	4.65	4.65	4.6	4.633
11	4.9	4.8	4.9	4.867
12	5.3	5.3	5.2	5.267
13	6.5	6.4	6.5	6.467

Data Pengukuran Berat Molekul

No. Pita	a	b	Rf (x)	log BM (y)	BM (kDa)
1	1.100	9.5	0.116	1.935	86.0994
2	1.267	9.5	0.133	1.910	81.2831
3	1.633	9.5	0.172	1.857	71.9449
4	1.933	9.5	0.204	1.813	65.013
5	2.100	9.5	0.221	1.789	61.5177
6	2.567	9.5	0.270	1.721	52.6017
7	2.833	9.5	0.298	1.682	48.0839
8	3.167	9.5	0.333	1.633	42.9536
9	3.317	9.5	0.349	1.612	40.9261
10	4.633	9.5	0.488	1.420	26.3027
11	4.867	9.5	0.512	1.385	24.2661
12	5.267	9.5	0.554	1.327	21.2324
13	6.467	9.5	0.681	1.152	14.1906

$$\text{Rumus } R_f = \frac{a}{b}$$

Keterangan : a = jarak pergerakan pita protein dari tempat awal

b = jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal

Lampiran 12. Standar Berat Molekul Komponen Protein Plasma

Protein	Symbol	Molecular Weight (Da)	Amount in Normal Serum (plasma) (mg/100ml)
Prealbumin, thyroxine-binding	TBPA	54,980	10-40
Pre albumin	PA	61,000	300
Retinol-binding protein	RBP	21,000	3-6
Albumin	Alb	66,500	3,500 - 5,000
Galactoglycoprotein	GGP	81,000	–
α-Globulins			
<u>α1-Acid glycoprotein</u>	α_1S	40,000	55-140
<u>α1-Antitrypsin</u>	α_1AT	54,000	200-400
<u>α1-Fetoprotein</u>	α_1F	66,300	~1 μ g
<u>α1-Globulin (glycoprotein)</u>	α_1G	44,100	30
9.5 S α 1-Glycoprotein (serum amyloid P protein)	α_1M , SAP	~250,000	3-8
<u>GC Globulin</u>	Gc	52,000	20-55
<u>Ceruloplasmin</u>	Cp	132,000	15-60
3.8 S Histidine-rich α 2-glycoprotein	HRG	58,500	5-15
<u>α2-Macroglobulin</u>	α_2M	725,000	150-420
4 S α 2, β 1-Glycoprotein	–	60,000	Trace
<u>α1B-Glycoprotein</u>	α_1B	68,000	15-30
<u>α1T-Glycoprotein</u>	α_1T	85,000	5-12
<u>α1-Antichymotrypsin</u>	α_1X	68,000	30-60
<u>α1-Microglobulin</u>	α_1m	26,000	4-9
<u>Zn-α2-Glycoprotein</u>	Zn α_2	41,000	2-15
<u>α2HS-Glycoprotein</u>	α_2HS	49,000	40-85
Pregnancy-associated α 2-glycoprotein	α_2PAG	360,000	Trace
3.1 S Leucine-rich α 2-glycoprotein	LRG	49,600	2-3
8 S α 3-Glycoprotein	8S α_3	220,000	3-5
Serum cholinesterase	CE	348,000	0.5-1.5
<u>Thyroxine-binding globulin</u>	TBG	54,000	1-2
Inter- α -trypsin inhibitor	I α I	~160,000	20-70
<u>Transcortin</u>	TC	55,700	~7
<u>Haptoglobin</u>	Hp		
<u>Type 1-1</u>	–	86,000	100-220
<u>Type 2-1</u>	–	~200,000	160-300
<u>Type 2-2</u>	–	~400,000	120-260

Protein	Symbol	Molecular Weight (Da)	Amount in Normal Serum (plasma) (mg/100ml)
<u>β-Globulins</u>			
Hemopexin	Hpx	60,000	50-115
Transferrin	Tf	79,500	200-320
<u>β₂-Microglobulin</u>	β ₂ m	11,730	Trace
<u>β₂-Glycoprotein I</u>	β ₂ I	~48,000	15-30
<u>β₂-Glycoprotein II</u>	GGG	63,000	12-30
(C3 proactivator)	C3PA	–	–
<u>β₂-Glycoprotein III</u>	β ₂ III	35,000	5-15
<u>C-Reactive Protein</u>	CRP	105,000	<1
<u>Fibronectin</u>	Fn	440,000	25-40
<u>Low-molecular weight proteins</u>			
<u>Lysozyme</u>		14,000	0.5-1.5
Basic protein B1	B1	11,000	–
Basic protein B2	B2	8,800	<1
0.6 S γ ₂ -Globulin	–	5,100	<1
2 S γ ₂ -Globulin	–	14,000	0.1
Post γ-globulin	Py	13,260	–
<u>Complement components</u>			
	C		
<u>C1q Component</u>	C1q	400,000	10-25
<u>C1r Component</u>	C1r	166,000	-
<u>C1s Component</u>	C1s	83,000	1-2
<u>C2 Component</u>	C2	102,000	2-3
<u>C3 Component</u>	C3	185,000	55-120
<u>C4 Component</u>	C4	200,000	20-50
<u>C5 Component</u>	C5	185,000	4-15
<u>C6 Component</u>	C6	105,000	7
<u>C7 Component</u>	C7	92,500	6
<u>C8 Component</u>	C8	163,000	8
<u>C9 Component</u>	C9	71,000	23
<u>Other complement factors</u>			
	C1-INA		
<u>C1 Esterase inhibitor</u>	C1-INA	104,000	15-35
Factor B	B	90,000	–
Factor D	D	24,000	–
Factor H	H	155,000	–
C4 Binding Protein	C4bp	540,000	–
Properdin	P	220,000	2-3
<u>Coagulation proteins</u>			
<u>Antithrombin III</u>	ATIII	58,000	(20-40)
<u>Prothrombin</u>	FII	72,000	(5-10)

Protein	Symbol	Molecular Weight (Da)	Amount in Normal Serum (plasma) (mg/100ml)
<u>Antihemophilic factor (Factor VIII)</u>	AHF, FVIII	(100,000) _n	(1-2)
<u>Plasminogen</u>	Pmg	92,000	(6-25)
<u>Fibrin-stabilizing factor (Factor XIII)</u>	FXIII	320,000	(1-4)
<u>Fibrinogen</u>	F1	340,000	200-450
Immunoglobulins	Ig		
<u>Immunoglobulin G</u>	IgG	150,000	800-1800
<u>Immunoglobulin A</u>	IgA	(160,000) _n	90-450
<u>Immunoglobulin M</u>	IgM	950,000	60-250
<u>Immunoglobulin D</u>	IgD	175,000	<15
<u>Immunoglobulin E</u>	IgE	190,000	<0.06
<u>κ Bence Jones protein</u>	κBJP	23,000	Trace
<u>γ Bence Jones protein</u>	γBJP	23,000	Trace

Sumber : Putnam, (1954)



Lampiran 13. Hasil Pengukuran Elektroforegram Endapan dengan Densitometer

IN CHART 200-91527

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	38.4	28539.460	U	8.0
2	39.3	23868.532	U	6.7
3	44.4	12187.190	U	3.4
4	57.1	9888.993	U	2.8
5	62.1	72847.070	U	20.3
6	68.5	24000.107	U	6.7
7	71.5	11930.010	U	3.3
8	81.5	9267.420	U	2.6
9	85.5	9301.625	U	2.6
10	88.9	9672.371	U	2.7
11	91.9	25678.970	U	7.2
12	96.3	22371.080	U	6.2
13	101.5	37977.312	U	10.6
14	102.3	26862.922	U	7.5
15	103.1	34237.638	U	9.5
TOTAL		358630.700		

⊕ SHII



Lampiran 14. Hasil Pengukuran Elektroforegram Supernatan dengan Densitometer

IN CHART 200-91527	NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
	1	39.4	19424.300	U	4.4
	2	42.0	9260.320	U	2.1
	3	45.2	5236.600	U	1.2
	4	47.3	17276.849	U	3.9
	5	53.5	19431.801	U	4.4
	6	54.5	12301.897	U	2.8
	7	56	21563.213	U	4.9
	8	61	66575.652	U	15.2
	9	66.5	34401.150	U	7.8
	10	74.6	20989.210	U	4.8
	11	77.5	4723.640	U	1.1
	12	85.1	37640.832	U	8.6
	13	86.6	20071.131	U	4.6
	14	101.6	5606.010	U	1.3
	15	102.8	20111.089	U	4.6
	16	104.6	21970.230	U	5.0
	17	106.2	24621.306	U	5.6
	18	122.9	4622.570	U	1.1
	19	129.5	41098.270	U	9.4
	20	131.2	31511.013	U	7.2
	TOTAL		438437.083		

SHIMADZU CORP

Lampiran 8. Perlakuan Terbaik Metode De Garmo

Perlakuan	Albumin Endapan			Albumin Supernatan			Protein Endapan			Protein Supernatan			Total BV
	<i>BV</i>	1		<i>BV</i>	0,25		<i>BV</i>	1		<i>BV</i>	0,25		2,5
	<i>BN</i>	0,4		<i>BN</i>	0,1		<i>BN</i>	0,4		<i>BN</i>	0,1		Total
	<i>Np</i>	<i>Ne</i>	<i>NP</i>	<i>Np</i>	<i>Ne</i>	<i>NP</i>	<i>Np</i>	<i>Ne</i>	<i>NP</i>	<i>Np</i>	<i>Ne</i>	<i>NP</i>	NP
A1	0,303	0	0	0,193	0,893	0,09	0,750	0,931	0,372	1,713	0,018	0,002	0,463
A2	0,403	0,291	0,117	0,277	0	0	0,743	0,862	0,345	1,720	0	0	0,461
A3	0,583	0,816	0,326	0,213	0,679	0,068	0,690	0,310	0,124	1,433	0,761	0,076	0,594
A4	0,647	1	0,4	0,210	0,714	0,071	0,757	1,000	0,4	1,360	0,956	0,096	0,967
A5	0,567	0,767	0,307	0,183	1	0,1	0,660	0,000	0	1,343	1	0,1	0,507