

PENGUKURAN PROTEIN TERLARUT AIR CUCIAN GELEMBUNG RENANG DAN KULIT IKAN TUNA MENGGUNAKAN METODE BRADFORD

MEASUREMENT OF PROTEINS DISSOLLED FROM SWIMBLADDER AND TUNA SKIN WASHING WATER USING BRADFORD METHOD

Sugeng Hadinoto¹⁾ dan Ikbal Syukroni²⁾

¹⁾Balai Riset dan Standardisasi Industri Ambon
Jl. Kebun Cengkeh Ambon

²⁾Sekolah Pascasarjana, Departemen Teknologi Hasil Perairan IPB
Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB, Darmaga, Bogor
Email : sugenghadin15@gmail.com

Diajukan: 23/05/2019; Diperbaiki: 15/10/2019; Diterima: 31/10/2019; Diterbitkan: 02/12/2019

ABSTRAK

Salah satu tahapan pada ekstraksi kolagen menggunakan bahan baku gelembung renang dan kulit ikan tuna adalah proses pretreatment, yaitu tahapan eliminasi substansi non-kolagen (*deproteinase*) menggunakan NaOH. Untuk melanjutkan proses ekstraksi bahan baku tersebut harus dinetralisasi hingga pH netral. Pada proses netralisasi inilah diduga adanya protein terlarut yang ikut terbuang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui protein terlarut dari air cucian gelembung renang dan kulit ikan tuna pada proses netralisasi pada proses ekstraksi kolagen. Pengukuran kadar protein terlarut air cucian gelembung renang dan kulit ikan tuna menggunakan metode Bradford. Penelitian ini dilakukan melalui 4 tahap yaitu pembuatan BSA sebagai protein standar, pembuatan reagen Bradford, pembuatan kurva standar, dan pengukuran kadar protein yang diperoleh dari perhitungan nilai absorbansi yang dimasukkan kedalam persamaan linier. Kadar protein yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu 0,272 mg/mL dan 0,270 mg/mL pada proses netralisasi I dan II gelembung renang ikan tuna menggunakan NaOH 0,1 M dan ekstraksi asam asetat 0,2 M; 0,060 mg/mL dan 0,033 mg/mL pada proses netralisasi I dan II kulit ikan tuna menggunakan NaOH 0,2 M dan ekstraksi asam asetat 0,1 M; 0,149 mg/mL dan 0,048 mg/mL pada proses netralisasi I dan II kulit ikan tuna menggunakan NaOH 0,2 M dan ekstraksi asam asetat 0,05 M.

Kata kunci: ekstraksi kolagen, metode Bradford, protein terlarut

ABSTRACT

One of the stages in the collagen extraction using the raw material from swimbladder and tuna skin is pretreatment process, namely the stages of elimination of non-collagen (deproteinase) substances using NaOH. To continue the extraction process the raw material must be neutralized to neutral pH. In the neutralization process it is suspected that there is a dissolved protein that is also wasted. The purpose of this study was to determine the dissolved protein from swimbladder and tuna skin in the neutralization process at the collagen extraction stage. Measurements of dissolved protein levels of swimming bubble bath water and tuna skin using the Bradford method. This research was conducted through 4 stages, namely making BSA as a standard protein, making Bradford reagents, making standard curves, and measuring protein content obtained from the calculation of absorbance values included in the linier equation. Protein levels obtained from the results of the study were 0.272 mg / mL and 0.270 mg / mL in the neutralization process I and II swimbladder of tuna using 0.1 M NaOH and extraction of acetic acid 0.2 M; 0.060 mg / mL and 0.033 mg / mL in the neutralization process I and II tuna skin using 0.2 M NaOH and acetic acid extraction 0.1 M; 0.149 mg / mL and 0.048 mg / mL in the neutralization process I and II tuna skin using 0.2 M NaOH and acetic acid extraction 0.05 M.

Keywords: Bradford method, collagen extraction, dissolved protein

PENDAHULUAN

Protein merupakan biopolimer yang tersusun dari sejumlah asam amino tertentu yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Protein berperan penting dalam struktur dan fungsi sel.

Analisis protein dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif digunakan untuk mengetahui keberadaan protein dalam suatu bahan, sedangkan analisis kuantitatif digunakan untuk mengetahui kadar protein yang terkandung dalam suatu bahan.

Analisis biokimia protein didasarkan pada akurasi kadar protein.

Salah satu tahapan pada proses ekstraksi kolagen larut asam adalah pretreatment, yaitu tahapan eliminasi substansi non-kolagen (*deproteinase*) dari bahan baku menggunakan NaOH. Setelah proses perendaman selesai selanjutnya gelembung renang dan kulit ikan tuna dinetralkan residu NaOH menggunakan air bersih mengalir. Menurut Zhou dan Regenstein (2005) larutan basa digunakan pada proses pra-perlakuan berfungsi melarutkan protein non kolagen. Selain itu, lemak yang terikat pada serat kolagen mengalami saponifikasi sehingga lemak akan hilang pada proses pra-perlakuan tersebut. Pada proses netralisasi inilah diduga adanya protein terlarut yang ikut terbuang. Sehingga perlu dilakukan pengukuran protein terlarut pada air cucian tersebut.

Terdapat berbagai metode yang dapat digunakan untuk mengukur kadar protein terlarut diantaranya adalah *Biuret*, *Bradford*, *Lawry*, *Bicinchoninic acid*, dan *Derivat Amin* (Noble dan Bailey 2009). Namun metode Bradford merupakan metode yang paling banyak digunakan karena metode ini lebih cepat dan akurat dalam menentukan kadar protein. Metode Bradford mempunyai sensitivitas empat kali dibanding metode Lowry disamping itu metode lowry sulit menentukan nilai kuantitatif protein dalam larutan standar.

Metode Bradford merupakan metode kolorimetri *dye-binding* yang dipopulerkan oleh Marion M Bradford. Metode ini digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam larutan menggunakan prosedur spektroskopi yang cepat dan akurat (Bradford 1976). Metode Bradford didasarkan pada interaksi asam amino dengan *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB G-250) dalam kondisi asam. Metode Bradford merupakan metode yang lebih sederhana, inkubasi lebih cepat, lebih murah, kompatibel dengan agen pereduksi, dan lebih sensitif terhadap protein dibandingkan dengan metode Lawry (Cheng *et al.* 2016; Erns dan Zor 2010).

Metode Bradford memiliki 2 tipe pengujian yaitu *microassay* dan *assay*. *Microassay* digunakan untuk deteksi 1-10 µg protein, sedangkan *assay* digunakan untuk deteksi 10-100 µg protein (Krueger 1994). Kekurangan metode Bradford adalah tidak kompatibel dengan senyawa interferensi atau surfaktan (misalnya *sodium dodecyl sulfate* yang digunakan untuk melisis sel). Adanya surfaktan pada sampel menyebabkan kesetimbangan bergeser dan meningkatkan nilai absorbansi (Lozzi *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2016). Selain itu reagen CBB G250 bersifat

asam, sehingga hanya beberapa protein yang dapat diuji dengan menggunakan reagen tersebut. CBB G-250 hanya bisa berikatan dengan asam amino basa (lisin, histidin, dan arginin) dan asam amino aromatik (triptofan, fenilalanin, dan tirosin) (Lozzi *et al.* 2008).

CBB G-250 berwarna merah dan akan berwarna biru ketika berikatan dengan protein (kompleks pewarna-protein). Jumlah ikatan antara pewarna dengan protein dapat diukur pada panjang gelombang 595 nm. Kelompok asam sulfonat anion pada pewarna akan berpasangan dengan bagian kation pada asam amino lisin, arginin, histidin. Selain itu, pewarna juga dapat berikatan dengan asam amino nonopolar pada bagian hidrofobik (Sapan *et al.* 1999; Georgiou *et al.* 2008). Kadar protein ditentukan dengan persamaan linier yang dihasilkan dari pembuatan kurva standar. Kurva standar yang dihasilkan harus linier dan nilai R^2 yang dihasilkan mendekati 1, artinya korelasi antara nilai absorbansi dengan kadar protein berbanding lurus. Pembuatan kurva standar menggunakan protein standar. Protein standar yang digunakan adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA). Keuntungan menggunakan BSA adalah murah, mudah didapat, dan mudah larut. Selain itu BSA relatif stabil sehingga dapat digunakan untuk estimasi kadar protein.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui protein terlarut dari air cucian gelembung renang dan kulit ikan tuna pada proses netralisasi pada tahapan ekstraksi kolagen.

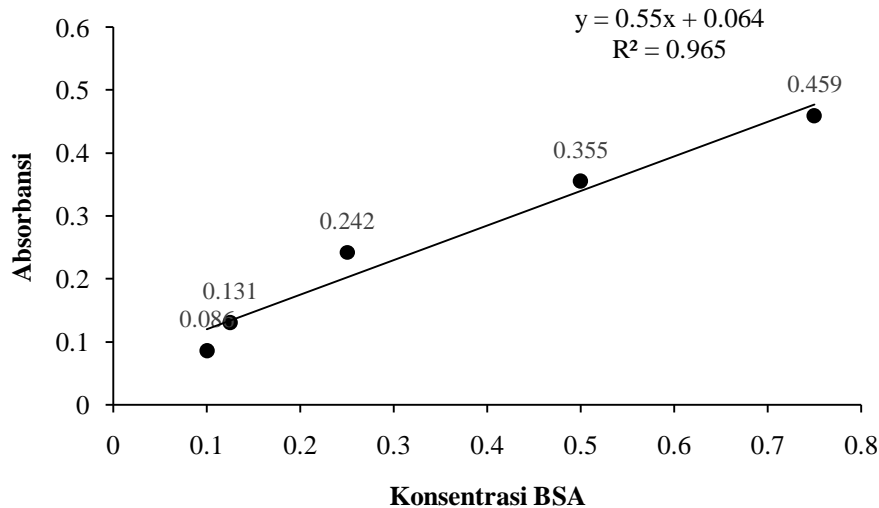
METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu protein BSA (*Bovine Serum Albumin*), aquades, reagen bradford (komposisi 0,025 g *coomassie brilliant blue G-250*, 12,5 mL etanol pa 95%, 25 mL asam ortofosfat dan aquades), dan sampel air cucian gelembung renang dan kulit ikan yang dimanfaatkan untuk ekstraksi kolagen menggunakan asam asetat yang diberi kode GR0.2, KL0.1, KL0.05. Alat yang digunakan antara lain tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, mikropipet, kuvet, vorteks, neraca analitik, dan spektrofotometri

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui 4 tahap yaitu pembuatan BSA sebagai protein standar, pembuatan reagen Bradford, pembuatan kurva standar, dan pengukuran kadar protein yang diperoleh dari perhitungan nilai absorbansi yang dimasukkan kedalam persamaan linier.



Gambar 1. Kurva Standar BSA

Pembuatan BSA

BSA ditimbang sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan kedalam aquades sebanyak 20 mL lalu dihomogenkan. Selanjutnya sebanyak 4,5 mL BSA digunakan untuk pengujian kadar protein.

Pembuatan Reagen Bradford

Reagen Bradford dibuat dengan komposisi bahan yaitu 0,025 gr CBB G-250, 12,5 mL etanol pa 95%, dan 25 mL asam ortofosfat. Semua bahan tersebut dicampurkan kemudian ditambah aquades hingga volume akhir mencapai 250 mL lalu disaring dengan kertas saring. 250 mL reagen Bradford tersebut merupakan stok pekat untuk 5 kali pengenceran. Reagen Bradford dibuat pekat untuk menghindari terjadinya oksidasi. Pembuatan reagen Bradford dengan 5 kali pengenceran adalah sebanyak 40 mL stok reagen Bradford diambil kemudian dimasukkan kedalam gelas ukur lalu ditambahkan aquades hingga volume akhir mencapai 200 mL.

Pembuatan Kurva Standar

Standar protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah BSA dengan konsentrasi masing-masing 0,1; 0,125; 0,25; 0,5 dan 0,75 ml. Selanjutnya diambil 60 µL dari setiap tabung kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi lain yang bersih. Setelah itu masing-masing tabung ditambahkan 3 mL reagen Bradford kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks lalu didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit agar terjadi reaksi antara reagen dengan protein. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 595 nm. Melalui pembuatan kurva standar akan dihasilkan persamaan regresi $Y=ax+b$ yang

digunakan untuk menentukan kadar protein terlarut.

Pengukuran Protein

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah air cucian gelembung renang dan kulit ikan tuna yang dimanfaatkan untuk ekstraksi kolagen menggunakan asam asetat. Masing-masing sampel diambil sebanyak 60 µL kemudian masing-masing ditambahkan 3 mL reagen Bradford lalu divorteks kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi pada masing-masing sampel disubstitusikan kedalam rumus persamaan regresi sehingga akan didapatkan kadar protein terlarutnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai absorbansi pada larutan protein standar BSA yang diperoleh dari pembacaan spektrofotometri dapat dilihat pada Tabel 1. Nilai-nilai absorbansi yang terdapat pada Tabel 1 tersebut selanjutnya dapat digunakan untuk membuat kurva standar. Kurva standar yang dibuat dari protein standar BSA dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Nilai Absorbansi Protein Standar

Konsentrasi BSA (ml)	Nilai Absorbansi
0,1	0,086
0,125	0,131
0,25	0,242
0,5	0,355
0,75	0,459

Tabel 2. Nilai Absorbansi dan Kadar Protein Terlarut Pada Air Cucian Gelembung Renang dan Kulit Ikan Tuna

Sampel	Nilai Absorbansi Sampel 595 nm	Protein terlarut pada netralisasi I (mg/mL)	Nilai Absorbansi Sampel 595 nm	Protein terlarut pada netralisasi II (mg/mL)
GR02	0,215	0,272	0,214	0,270
KL01	0,098	0,060	0,083	0,033
KL005	0,147	0,149	0,091	0,048

Keterangan : GR02 = Gelembung renang dengan hidrolisis NaOH 0,1 M; ekstraksi asam asetat 0,2 M
 KL01 = Kulit ikan tuna dengan hidrolisis NaOH 0,2 M; ekstraksi asam asetat 0,1 M
 KL005 = Kulit ikan tuna dengan hidrolisis NaOH 0,2 M; ekstraksi asam asetat 0,05 M

Dari nilai absorbansi standar BSA diperoleh kurva standar dengan persamaan regresi $y=0,55x + 0,064$. Persamaan tersebut selanjutnya akan digunakan untuk menentukan kadar protein sampel (x), yaitu dengan cara substitusi nilai absorbansi dari masing-masing protein sampel ke dalam persamaan regresi sebagai Y. nilai absorbansi protein pada sampel dan hasil pengukuran protein terlarut pada air cucian gelembung renang dan kulit ikan tuna dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 dapat dilihat bahwa kadar protein berdasarkan substitusi persamaan regresi diperoleh hasil pada sampel air cucian gelembung renang ikan tuna menggunakan NaOH 0,1 M dan ekstraksi asam asetat 0,2 M diperoleh kadar protein 0,272 mg/mL pada proses netralisasi I dan 0,270 mg/mL pada proses netralisasi II. Pada air cucian kulit ikan tuna menggunakan NaOH 0,2 M dan ekstraksi asam asetat 0,1 M diperoleh kadar protein 0,060 mg/mL pada proses netralisasi I dan 0,033 mg/mL pada proses netralisasi II, sedangkan pada air cucian kulit ikan tuna menggunakan NaOH 0,2 M dan ekstraksi asam asetat 0,05 M diperoleh kadar protein 0,149 mg/mL pada proses netralisasi I dan 0,048 mg/mL pada proses netralisasi II. Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa kadar protein terlarut netralisasi I dan II mengalami penurunan, hal ini dikarenakan pada proses netralisasi I merupakan pencucian awal sampel sehingga protein yang terlarut akan lebih banyak daripada proses pencucian selanjutnya.

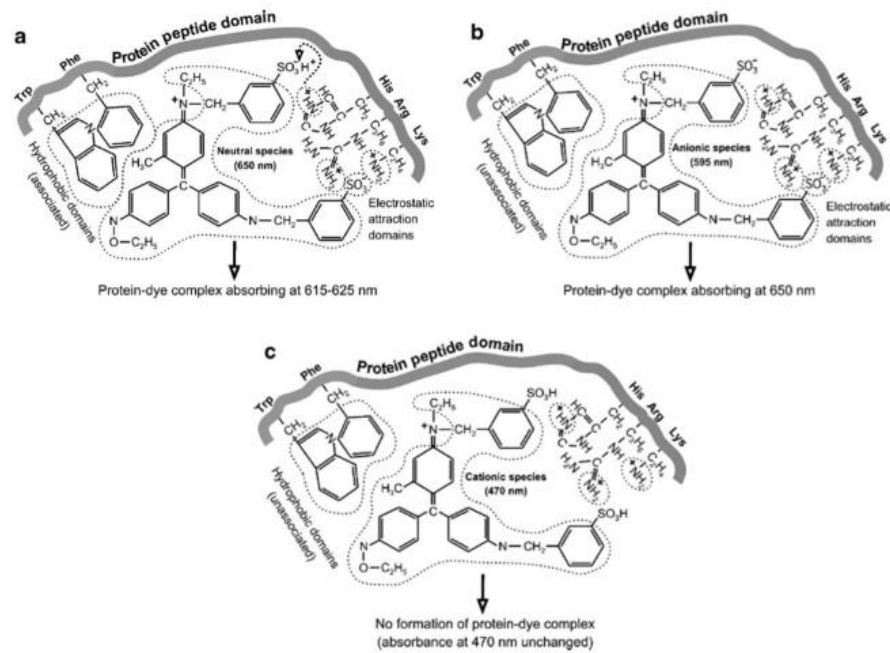
Pada proses netralisasi NaOH kolagen gelembung renang ikan cunang menghasilkan protein terlarut antara 0,06 - 0,18 mg/mL dimana berdasarkan uji DMRT diperoleh perlakuan terbaik yang berbeda nyata yaitu pada interaksi perlakuan konsentrasi larutan NaOH 0,1 M dengan lama perendaman 8 jam (Gadi *et al.*, 2017). Hasil penelitian Sagita (2017) menunjukkan bahwa protein terlarut menunjukkan penurunan seiring bertambahnya waktu perendaman.

Sedangkan Alhana (2015) menerangkan bahwa konsentrasi protein terlarut mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya konsentrasi NaOH.

Nilai absorbansi pada sampel menunjukkan dua kemungkinan, yaitu jumlah protein sebenarnya yang dapat diukur dengan metode Bradford atau jumlah protein sekaligus adanya senyawa interferensi yang menyebabkan meningkatnya absorbansi. Hal tersebut perlu untuk dipastikan yaitu dengan mengetahui kandungan protein sampel yang digunakan.

Metode Bradford menggunakan reagen berupa zat warna CBB G-250. Sebelum direaksikan dengan protein, warna reagen Bradford yang dalam kondisi asam karena adanya asam ortofosfat adalah merah. Setelah reagen ditambahkan kedalam tabung berisi protein maka warna yang terlihat adalah biru. Hal tersebut disebabkan adanya ikatan antara pewarna dengan asam amino penyusun protein. CBB G-250 pada kondisi asam (kation) berwarna merah (absorbansi maksimum pada panjang gelombang 470 nm), pada kondisi netral berwarna hijau (absorbansi maksimum pada panjang gelombang 650 nm), dan pada kondisi basa (anion) berwarna biru (absorbansi maksimum pada panjang gelombang 595 nm) (Compton dan Jones 1985; Georgiou *et al.* 2008). Mekanisme CBB G250 berikatan dengan protein dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menjelaskan bahwa saat kondisi netral, CBB G-250 berinteraksi dengan asam amino hidrofobik dan gugus sulfonat anion pada CBB G-250 berikatan dengan bagian kation asam amino histidin, arginin, leusin. Saat kondisi basa (anion), asam amino hidrofobik tidak berinteraksi dengan CBB G-250, sedangkan gugus sulfonat anion pada CBB G-250 berikatan dengan bagian kation asam amino histidin, arginin, leusin. Saat kondisi asam (kation) tidak ada interaksi antara CBB G-250 dengan asam amino (Georgiou *et al.* 2008).



Gambar 2. Reaksi Pewarnaan Protein Oleh CBB G-250
Sumber : Georgiou et al. (2008)

KESIMPULAN

Pada air cucian gelembung renang dan kulit ikan tuna mengandung protein terlarut antara 0,033 mg/mL - 0,272 mg/mL. Proses netralisasi pada ekstraksi kolagen dari gelembung renang dan kulit ikan tuna menyisakan protein terlarut yang cukup banyak dan dapat dimanfaatkan untuk keperluan lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Alhana, 2015. "Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen dan Nanokolagen Dari Daging Teripang Gamma (*Stichopus variegates*)". Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bradford, M.M., 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding". *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Cheng, Y., Wei, H., Sun, R., Tian, Z. and Zheng, X., 2016. "Rapid method for protein quantitation by Bradford assay after elimination of the interference of polysorbate 80". *Analytical Biochemistry* 494, 37-39.
- Compton, S.J. and Jones, C.G., 1985. "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay". *Analytical Biochemistry* 151(2), 369-374.
- Ernst, O. and Zor, T., 2010. "Linearization of the Bradford Protein Assay". *Journal of Visualized Experiment* (38), e1918, doi:10.3791/1918.
- Gadi, D.S., Trilaksani, W. dan Nurhayati, T., 2017. "Histologi, Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Gelembung Renang Ikan Cunang (*Muarenesox talabon*)". *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis* 9(2), 665-683.
- Georgiou, C.D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G. and Papapostolou, I., 2008. "Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: A hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 391-403.
- Krueger, R.A., 1994. "Focus groups: A practical guide for applied research (2nd ed.)". Thousand Oaks, CA: Sage.
- Lozzi, I., Pucci, A. Pantani, O.L., D'acqui, P.L. and Calamai, L., 2008. "Interferences of suspended clay fraction in protein

quantitation by several determination methods". *Analytical Biochemistry* 376, 108-114.

Noble, J.E. and Bailey, M.J., 2009. "Quantitation of protein". *Methods in Enzymology* 463, 73-95.

Sagita, S.N., 2017. "Karakterisasi Kolagen Teripang Gamma (*Stichopus variegates*) yang Diisolasi Dengan Metode Kolagen Larut Asam". Skripsi. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Sapan, C.V., Lundblad, R.L. and Price, N.C., 1999. "Colorimetric protein assay techniques". *Biotechnol Appl Biochem.* 29(2), 99-108.

Zhou, P. and Regenstein, J.M., 2005. "Effects of alkaline and acid pretreatments on alaska pollock skin gelatin extraction". *Journal of Food Science* 70(6), 392-396.