



**KANDUNGAN PROTEIN TERLARUT DAGING IKAN  
PATIN (*Pangasius djambal*) AKIBAT VARIASI PAKAN  
TAMBAHAN**

**SKRIPSI**

Oleh

**NOVITA RAHMAWATI  
NIM 081810301044**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**



**KANDUNGAN PROTEIN TERLARUT DAGING IKAN  
PATIN (*Pangasius djambal*) AKIBAT VARIASI PAKAN  
TAMBAHAN**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh :  
**Novita Rahmawati**  
**NIM 081810301044**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Orang tuaku tercinta, Ibu Karmi Ita Lestari dan Bapak Suparto yang telah memberikan doa, dukungan, keikhlasan dan pengorbanan sehingga saya bisa meraih semua ini;
2. adikku tersayang, Arif Augusta Maulidi yang telah membantu serta mendukung selama ini;
3. guru-guru SDN Sukowiryo 1, SMPN 3 Bondowoso, SMAN 1 Bondowoso, serta dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA UNEJ yang telah memberikan ilmu dan bimbingan dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTTO

*Life is short. There is no time to leave important words unsaid*

**(Paulo Coelho)\***

*“Dia mengetahui apa yang masuk ke dalam bumi dan apa yang keluar dari padanya dan apa yang turun dari langit dan apa yang naik kepadanya. Dan Dia bersama kamu dimana saja kamu berada. Dan Allah Maha Melihat apa yang kamu kerjakan”*

**(QS. Al Hadiid: 4)\*\***

---

\* <http://elib.unikom.ac.id>

\*\* Departemen Agama Republik Indoneswia. 1998. Al-Qur'an dan Terjemahan. Semarang : PT. Karya Toha Putra

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Novita Rahmawati

NIM : 081810301044

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul : *KANDUNGAN PROTEIN TERLARUT DAGING IKAN PATIN (Pangasius djambal) AKIBAT VARIASI PAKAN TAMBAHAN* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Mei 2013

Yang menyatakan,

Novita Rahmawati  
NIM. 081810301044

**SKRIPSI**

**KANDUNGAN PROTEIN TERLARUT DAGING IKAN PATIN (*Pangasius djambal*) AKIBAT VARIASI PAKAN TAMBAHAN**

Oleh :

**Novita Rahmawati**  
**NIM 081810301044**

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Ika Oktavianawati, S.Si, M.Sc

Dosen Pembimbing Anggota : drh. Wuryanti Handayani, M.Si

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “*Kandungan Protein Terlarut Daging Ikan Patin (Pangasius djambal) Akibat Variasi Pakan Tambahan*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada :

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Ika Oktavianawati, S.Si, M.Sc  
NIP. 198010012003122001

drh. Wuryanti Handayani, M.Si  
NIP. 196008221985032002

Penguji I,

Penguji II,

Ir. Neran, M.Kes  
NIP. 194808071974121003

I Nyoman Adi Winata, S.Si, M.Si  
NIP. 197105011998021002

Mengesahkan

Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA, Ph.D  
NIP. 196101081986021001

## RINGKASAN

**Kandungan Protein Terlarut Daging Ikan Patin (*Pangasius djambal*) Akibat Variasi Pakan Tambahan;** Novita Rahmawati, 081810301044; 2013: 45 halaman; Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Indonesia kaya akan potensi ikan, baik perikanan tangkap maupun budidaya. Salah satu ikan yang dibudidaya adalah ikan patin. Peningkatan hasil budidaya ikan patin diharapkan menjadi alternatif sumber protein hewani. Menurut Hustiany (2005), kandungan protein daging ikan patin sebesar 10,76%. Kandungan protein pada ikan bervariasi, salah satu faktor yang mempengaruhinya adalah pakan. *Azolla pinnata* dan probiotik dapat dijadikan sebagai suplemen pakan ikan. Menurut Cho *et al* (1982), *A. pinnata* memiliki kadar protein sebesar 24-30% sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pakan ikan, sedangkan probiotik dapat membuat pencernaan ikan lebih baik serta mampu meningkatkan pertumbuhan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan investigasi mengenai kandungan protein pada ikan patin yang diberi tiga macam perlakuan dengan pakan yang berbeda-beda. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk (1) mengetahui pengaruh pakan tambahan probiotik dan *A. pinnata* terhadap kadar protein terlarut dalam daging ikan patin dan (2) mengetahui jenis protein terlarut yang terdapat dalam daging ikan patin berdasarkan berat molekulnya dengan pakan tambahan probiotik dan *A. pinnata*.

Penelitian ini diawali dengan tahap pemeliharaan ikan yang diberi tiga variasi pakan. Kolam pertama, ikan diberi pakan pelet saja (kontrol) sebanyak 300 gram, kolam kedua ikan diberi pakan pelet yang ditambah suplemen probiotik dan kolam ketiga ikan diberi pakan pelet dan *A. pinnata* dengan perbandingan 3:1. Masing-masing kolam berisi 500 ekor ikan. Teknik pengambilan sampel dilakukan secara acak, yaitu dengan mengambil 5% dari jumlah populasi (25 ekor). Setelah itu, ikan difillet dan dipersiapkan untuk proses ekstraksi protein. Ekstraksi protein yang



dilakukan ada dua macam, yaitu protein larut air dan larut dalam larutan garam 4%. Setelah itu ekstrak diisolasi dengan menggunakan kolom kromatografi filtrasi gel sephadex G-25. 2 mL ekstrak dimasukkan ke dalam kolom. Penampungan fraksi dilakukan setiap 5 mL sejak ekstrak dielusi oleh eluen sampai sampel tidak menunjukkan serapan ketika diukur kadar proteinnya dengan metode *Bradford*. Masing-masing fraksi diukur kadar proteinnya dengan metode *Bradford*. Isolat yang dihasilkan dianalisa jenis proteinnya berdasarkan berat molekul dengan menggunakan metode SDS-PAGE.

Berdasarkan data hasil penelitian, kandungan protein daging ikan larut air yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik memiliki kadar tertinggi yaitu sebesar 3,404 gram, dan ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) memiliki kadar sebesar 2,680 gram sedangkan ikan yang diberi pakan pelet dan pakan tambahan *A. pinnata* memiliki kadar protein sebesar 1,704 gram. Untuk kadar protein daging ikan larut dalam larutan garam 4% tertinggi pada ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik yaitu sebesar 2,605 gram. Ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) memiliki kadar sebesar 2,192 gram sedangkan ikan yang diberi pakan pelet dan pakan tambahan *A. pinnata* memiliki kadar protein sebesar 2,117 gram. Setelah diukur kadarnya, dilakukan analisa jenis protein dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Berdasarkan elektroforegram, untuk jenis protein larut air, ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) memiliki 8 jenis protein dengan kisaran 39,29-124,38 kDa, 12 jenis protein dengan kisaran 15,03-133,05 kDa pada ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik, dan ikan yang diberi pakan tambahan *Azolla pinnata* memiliki 10 jenis protein dengan kisaran 32,10-79,42 kDa. Untuk jenis protein larut dalam larutan garam 4%, ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) memiliki 8 jenis dengan kisaran 24,15-127,61 kDa, ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik memiliki 11 jenis dengan kisaran 17,25-129,47 kDa, dan 18 jenis protein dengan kisaran 13,36-119,55 kDa yang terkandung pada ikan yang diberi pakan tambahan *Azolla pinnata*.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul *Kandungan Protein Terlarut Daging Ikan Patin (Pangasius djambal) Akibat Variasi Pakan Tambahan*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Unej, Prof. Kusno DEA, Ph.D atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan tugas akhir ini;
2. Bapak Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Jember;
3. Ibu Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc. selaku dosen pembimbing utama dan Ibu drh. Wuryanti Handayani, M.Si. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam penulisan tugas akhir ini;
4. Bapak Ir. Neran, M.Kes. dan Bapak I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si. sebagai dosen penguji yang banyak memberikan masukan, dan waktunya selama penulisan tugas akhir ini;
5. ibu, bapak dan adik tercinta atas dukungan, perhatian dan kerja kerasnya;
6. laskar patin (Meirinda Hermiastuti, Alviona Noer Isnani dan Dodik Andinata) atas bantuan dan kerja samanya;
7. Imam Efendi, Amd. Kep atas perhatian dan dukungannya;

8. jeng-jeng jawa 2 (Fitri, Lisa, Ucik, Deny dan Faiz) atas dukungan, kritik dan saran dalam penyelesaian tugas akhir ini;
9. teman-teman *Sugar Group* yang telah banyak membantu demi terselesainya skripsi ini;
10. teman-teman kimia 2008 dan semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penulisan skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Mei 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>HALAMAN PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Batasan Masalah</b> .....	3
<b>1.4 Tujuan</b> .....	3
<b>1.5 Manfaat</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Ikan Patin</b> .....	5
<b>2.2 Kebutuhan Nutrisi Pakan</b> .....	6
<b>2.3 Protein</b> .....	8
2.3.1 Berdasarkan struktur molekulnya .....	9
2.3.2 Berdasarkan bentuknya.....	10
2.3.3 Berdasarkan fungsinya.....	11

2.4	<b>Ekstraksi Protein</b> .....	12
2.5	<b>Analisis Protein</b> .....	13
2.6	<b>Kromatografi Kolom</b> .....	14
2.7	<b>Elektroforesis</b> .....	16
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....		20
3.1	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	21
3.2	<b>Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	20
3.2.1	Alat .....	20
3.2.2	Bahan .....	20
3.3	<b>Rancangan Penelitian</b> .....	21
3.3.1	Diagram Alir Penelitian .....	21
3.4	<b>Prosedur Penelitian</b> .....	22
3.4.1	Pemeliharaan ikan dan perlakuan pakan tambahan .....	22
3.4.2	Pengambilan sampel .....	22
3.4.3	Preparasi sampel .....	22
3.4.4	Ekstraksi protein .....	22
3.4.5	Isolasi protein .....	23
3.4.6	Analisa kadar protein .....	23
3.4.7	Analisa protein dengan SDS-PAGE .....	23
3.5	<b>Pengolahan Data</b> .....	24
3.5.1	Penimbangan berat bada ikan .....	24
3.5.2	Analisa protein .....	25
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....		26
4.1	<b>Pemeliharaan Ikan dan Perlakuan Pakan Tambahan</b> .....	26
4.2	<b>Pengambilan dan Preparasi Sampel</b> .....	27
4.3	<b>Ekstraksi Protein</b> .....	28
4.4	<b>Isolasi Protein</b> .....	29
4.5	<b>Analisa Kadar Protein</b> .....	30
4.4	<b>Analisa Protein dengan SDS-PAGE</b> .....	33

<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	41
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	41
<b>5.2 Saran</b> .....	41
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	42
<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimia ikan patin per 100 gram daging ikan .....	6
2.2 Hasil analisa kimia bahan baku pakan ikan .....	7
2.3 Ukuran protein minimum yang dapat dipisahkan oleh matiks gel.....	15
2.4 Hubungan antara konsentrasi dengan pori-pori .....	17

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Ikan patin .....	5
2.2 Sintesis protein.....	9
2.3 <i>Commasie Brilliant Blue</i> (CBB).....	14
2.4 Kromatografi kolom .....	16
2.5 Proses elektroforesis .....	19
2.6 Elektroforegram.....	19
3.1 Diagram alir penelitian .....	21
4.1 Konsentrasi protein ikan patin ( <i>Pangasius djambal</i> ) larut air .....	30
4.2 Konsentrasi protein ikan patin ( <i>P. djambal</i> ) larut garam 4% .....	31
4.3 Elektroforegram ekstrak protein ikan patin ( <i>P. djambal</i> ).....	34
4.4 Reaksi polimerisasi akrilamida dan bis-akrilamida.....	34
4.5 Elektroforegram isolat protein daging ikan patin ( <i>P. djambal</i> ) larut air	36
4.6 Elektroforegram isolat protein daging ikan patin ( <i>P. djambal</i> ) larut garam 4 % .....	40



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Pembuatan Larutan .....	46
B. Berat Badan Ikan.....	48
C Kurva Standar BSA.....	49
D Kadar Protein Ikan Patin.....	50
D.1 Absorbansi protein larut air.....	50
D.2 Kadar protein larut air .....	51
D.3 Absorbansi protein larut dalam larutan garam 4%.....	52
D.4 Kadar protein larut dalam larutan garam 4% .....	53
D.5 Kadar protein daging ikan patin.....	54
E Berat Molekul Protein.....	56
E.1 Berat molekul relatif protein marker .....	56
E.2 Persamaan log berat molekul marker protein.....	57
E.3 Berat molekul relatif protein ikan (pelet) berdasarkan nilai $R_f$ yang berbeda dengan persamaan log berat molekul = $-1,001x + 2,117$ .....	59
E.4 Berat molekul relatif protein ikan (pelet + probiotik) berdasarkan nilai $R_f$ yang berbeda dengan persamaan log berat molekul = $-1,0792x + 2,1367$ ....	60
E.5 Berat molekul relatif protein ikan (pelet + <i>Azolla pinnata</i> ) berdasarkan nilai $R_f$ yang berbeda dengan persamaan log berat molekul = $-1,1422x + 2,1415$	61
F Surat Keterangan Identifikasi.....	63
F.1 Surat keterangan identifikasi <i>A. pinnata</i> .....	63
F.2 Surat keterangan identifikasi ikan patin ( <i>Pangasius djambal</i> ).....	64

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia kaya akan potensi ikan, baik perikanan tangkap maupun perikanan budidaya. Salah satu ikan yang telah dibudidaya secara luas di Indonesia adalah ikan patin. Ikan patin merupakan salah satu spesies ikan budidaya air tawar. Jenis ikan ini biasanya dimanfaatkan sebagai ikan konsumsi. Oleh karena itu, banyak pengusaha yang membudidaya ikan patin.

Peningkatan jumlah ikan patin hasil budidaya diharapkan dapat menjadi alternatif sumber protein hewani. Sebagai zat pembangun, protein berfungsi sebagai bahan pembentuk jaringan-jaringan baru dalam tubuh, mengatur keseimbangan cairan dalam jaringan dan pembuluh darah. Selain itu, protein merupakan konstituen penting dalam makanan, dimana protein menjadi sumber energi sekaligus mengandung asam-amino esensial seperti lisin, triptofan, metionin, leusin, isoleusin dan valin. Protein juga merupakan komponen utama dalam berbagai makanan alami dan penentu tekstur, misalnya keempukan daging atau ikan.

Menurut Hustiany (2005), kandungan protein pada daging ikan patin sebesar 10,76 %. Jenis-jenis protein yang terdapat pada daging ikan yaitu albumin, mioglobin dan aktin (Xiong, 2000). Albumin, mioglobin dan G-aktin termasuk dalam jenis protein miofibrillar (globulin) yang jika dikonsumsi berfungsi untuk kontraksi otot, membantu proses penyembuhan luka-luka, pembangun tulang, dan kulit.

Kandungan protein pada ikan bervariasi tergantung dengan beberapa faktor, diantaranya ukuran ikan, suhu air, tingkat pemberian pakan dan kualitas protein pakan. Pakan yang memiliki nutrisi lengkap dan seimbang sesuai dengan kebutuhan nutrisi ikan, dibutuhkan untuk mendapatkan efisiensi pakan serta pertumbuhan hewan budidaya secara optimal. Faktor pakan merupakan hal yang penting bagi ikan yang dibudidaya karena ikan dibatasi ruang gerak dan pasokan pakan. *Azolla pinnata* dan

probiotik dapat dijadikan sebagai suplemen pakan ikan. Menurut Cho *et al* (1982), *A. pinnata* memiliki kadar protein sebesar 24-30% sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pakan ikan, sedangkan probiotik dapat membuat ikan menjadi lebih baik dalam mencerna nutrisi yang terkandung dalam pakan serta mampu meningkatkan pertumbuhan.

Protein dapat digolongkan menjadi beberapa macam, diantaranya yaitu berdasarkan kelarutan, struktur dan fungsinya. Analisa protein yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah berdasarkan kelarutannya. Berdasarkan kelarutannya, protein dibedakan menjadi tiga macam yaitu protein larut dalam air, larut dalam larutan garam dan tidak larut dalam air serta larutan garam. Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi pelarut. Ekstrak protein yang diperoleh selanjutnya diisolasi dengan kromatografi, misalnya menggunakan matrik gel filtrasi Sephadex G-25. Penentuan kadar protein dalam suatu sampel dapat menggunakan beberapa metode, diantaranya yaitu *Bradford*, Biuret, Kjeldhal, titrasi formol dan Lowry. *Bradford* merupakan metode yang paling umum digunakan karena mudah dan akurat dalam menentukan kadar protein. Metode ini menganalisis jumlah protein terlarut dalam sampel. Profil protein dari suatu sampel dapat dilihat menggunakan metode *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Metode ini, selain menentukan kemungkinan jenis protein dapat juga menunjukkan berat molekul protein tersebut.

Berdasarkan literatur di atas, maka dalam penelitian ini akan dilakukan investigasi mengenai kandungan protein pada ikan patin. Ikan patin yang digunakan diberi tiga macam perlakuan dengan pakan yang berbeda-beda yaitu 100 % pelet dan pelet yang diberi suplemen probiotik serta *A. pinnata*. Kandungan protein yang akan dianalisa meliputi kadar protein dengan menggunakan metode *Bradford* dan kemungkinan jenis protein serta berat molekulnya berdasarkan elektroforegram SDS-PAGE.

## 1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah:

- a. Bagaimana pengaruh pakan tambahan probiotik dan *A. pinnata* terhadap kadar protein terlarut dalam daging ikan patin?
- b. Ada berapa jenis protein terlarut yang terdapat dalam daging ikan patin berdasarkan berat molekulnya dengan pakan tambahan probiotik dan *A. pinnata*?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Sampel yang digunakan yaitu ikan patin (*Pangasius djambal*)
- b. Pakan tambahan yang digunakan adalah probiotik dan *A. pinnata*
- c. Pelet yang digunakan adalah pelet 781-3, probiotik “Raja Lele” dan *A. pinnata* yang dibudidaya sendiri.
- d. Sampel yang akan dianalisa adalah daging bagian badan ikan patin.
- e. Protein yang diamati adalah protein yang larut dalam air dan larutan garam (4%).
- f. Kadar protein dianalisis menggunakan metode *Bradford*.
- g. Jenis protein yang dianalisa berdasarkan berat molekulnya ditentukan oleh marker protein yang tersedia yaitu sebesar 14,4; 18,4; 25,0; 35,0; 45,0; 66,2 dan 116 KDa.

## 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

- a. Mengetahui pengaruh pakan tambahan probiotik dan *A. pinnata* terhadap kadar protein terlarut dalam daging ikan patin
- b. Mengetahui jenis-jenis protein terlarut yang terdapat dalam daging ikan patin berdasarkan berat molekulnya dengan pakan tambahan probiotik dan *A. pinnata*.

### **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang kadar protein terlarut dan jenis protein berdasarkan berat molekulnya pada daging ikan patin yang diberi tambahan probiotik dan *A. pinnata*.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Patin

Ikan patin merupakan ikan berkumis yang hidup di air tawar dan terdapat di seluruh Asia Selatan serta Asia Tenggara. Mempunyai ciri kulit halus, memiliki dua pasang sungut yang relatif pendek, jari-jari sirip punggung dan sirip dada sempurna dengan tujuh jari-jari bercabang, sirip dubur panjang dan bersambung dengan sirip ekor. Sirip ekor ikan patin bercagak dalam dengan mulut yang agak mengarah ke depan (Whitten, 1996) seperti yang tertera pada Gambar 2.1. Klasifikasi dan identifikasi ikan patin menurut Saanin (1984) adalah :

Phyllum	: Chordata
Sub phyllum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Sub kelas	: Teleostei
Ordo	: Ostariophysi
Sub ordo	: Siluroidae
Famili	: Pangasidae
Genus	: Pangasius
Spesies	: <i>Pangasius djambal</i>



Gambar 2.1 Ikan Patin (Sumber: Anonim, 2012)

Ikan patin merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang cukup dikenal di Indonesia, serta memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Ikan patin banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam pembuatan pempek, nugget, dan produk olahan perikanan lainnya. Daging ikan patin memiliki kandungan kalori dan protein yang cukup tinggi seperti tertera pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimia ikan patin per 100 gr daging ikan

Komposisi kimia	Persentase (%)
Air	82,22
Protein	14,53
Lemak	1,09
Abu	0,74

Sumber : Subagja (2009)

## 2.2 Kebutuhan Nutrisi Ikan Patin

Komposisi kimia tubuh ikan dipengaruhi oleh pakan dan lingkungan. Komposisi kimia tubuh organisme akuatik berhubungan erat dengan kualitas daging komoditi tersebut. Untuk meningkatkan kualitas daging, salah satu cara yang dilakukan adalah aplikasi pakan dengan nutrisi seimbang. Protein merupakan salah satu zat makanan yang dibutuhkan ikan dan perlu dipenuhi untuk mencapai pertumbuhan yang optimal. Menurut Sukmawati (2006), kebutuhan energi ikan dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain spesies ikan, umur atau ukuran ikan, aktivitas ikan, suhu dan jenis pakan. Jenis pakan yang dapat diberikan pada ikan yaitu 100 % pelet dan pelet yang diberi suplemen probiotik serta paku air (*Azolla pinnata*).

Pelet merupakan salah satu jenis pakan ikan. Setiap ikan membutuhkan nilai gizi berbeda, kebutuhan protein, lemak dan serat. Makanan yang memiliki keseimbangan protein, lemak dan serat untuk kebutuhan ikan tertentu akan membuat ikan cepat besar, tetapi apabila nutrisi kurang, pertumbuhan ikan akan sangat lambat sehingga berakibat biaya dan waktu panen yang cukup lama. Kandungan kimia pelet

ikan tergantung dari bahan dasar pembuatan pelet. Menurut Sriharti (1992), dalam penyusunan ramuan pakan ikan perlu diperhatikan pula kualitas dan keanekaragaman bahan baku. Komposisi dengan bahan baku yang beranekaragam lebih baik daripada komposisi yang sedikit ragam bahan baku. Contoh kandungan gizi bahan pembuat makanan ikan dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Hasil analisa kimia bahan baku pakan ikan

No	Bahan baku	Kandungan gizi (%)					
		Protein	Lemak	Karbohidrat	Serat	Abu	Air
1	Tepung ikan	62,67	4,19	5,71	0,11	17,55	9,77
2	Tepung daging ayam	61,56	27,3	-	-	2,34	8,80
3	Bungkil kacang tanah	47,90	10,90	25,00	3,60	4,80	7,80
4	Dedak gandum	11,99	1,48	64,75	3,79	0,64	17,35
5	Tepung kedelai	39,60	14,30	29,50	2,80	5,40	8,40

Sumber : Sriharti (1992)

Probiotik adalah makanan tambahan (suplemen) berupa sel-sel mikroorganisme hidup yang menguntungkan bagi hewan inang yang mengkonsumsinya melalui penyeimbangan flora mikroorganisme intestinal dalam saluran pencernaan. Menurut Irianto (2007), pemberian organisme probiotik dalam akuakultur dapat diberikan melalui pakan, air maupun perantara pakan. Pemberian probiotik dalam pakan berpengaruh terhadap kecepatan fermentasi pakan dalam saluran pencernaan, sehingga akan sangat membantu proses penyerapan makanan dalam pencernaan ikan. Probiotik yang digunakan pada penelitian ini mengandung *lactobacillus*, *acetobacter*, dan ragi.

Pemberian suplemen pakan yang mengandung bakteri probiotik, diharapkan mampu meningkatkan efisiensi pakan karena probiotik merupakan mikroba hidup yang berpengaruh terhadap kesehatan melalui perbaikan keseimbangan mikroflora



intestinal. Terciptanya keseimbangan mikroflora intestinal dapat membuat ikan menjadi lebih baik dalam mencerna nutrisi yang terkandung dalam pakan serta selanjutnya mampu meningkatkan pertumbuhan (Kompang, 2000).

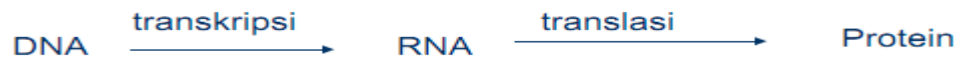
*A. pinnata* adalah sejenis pakis air berukuran kecil yang hidup bebas mengambang secara horizontal di permukaan air tawar. Menurut Khan (1998), satu rumpun *A. pinnata* memiliki ukuran sebesar 2,5 cm x 1 cm. *A. pinnata* memiliki ukuran daun yang kecil serta membentuk 2 atau 3 barisan yang menyirip, bervariasi dan saling tumpang tindih. *A. pinnata* mempunyai kemampuan mengikat nitrogen dari udara sehingga mempunyai kandungan protein yang tinggi. Oleh karena itu, *A. pinnata* dapat digunakan sebagai pakan sumber protein untuk ikan, itik dan ayam. Menurut Cho *et al* (1982), *A. pinnata* dapat digunakan sebagai salah satu sumber protein nabati penyusun ransum ikan, karena mengandung protein yang cukup tinggi. Kandungan protein kasar *A. pinnata* sebesar 24-30%, kalsium 0,4-1%, fosfor 2-4,5%, lemak 3-3,3%, serat kasar 9,1-12,7%, pati 6,5% dan tidak mengandung senyawa beracun. Oleh karena itu, *A. pinnata* dapat dijadikan alternatif pakan ikan.

### 2.3 Protein

Protein merupakan senyawa organik kompleks tersusun atas asam amino yang mengandung unsur C (karbon), H (hidrogen), O (oksigen) dan N (nitrogen). Protein termasuk komponen kedua terbesar setelah air pada sebagian besar jaringan tubuh. Senyawa ini adalah salah satu komponen penyusun bahan pangan yang mempunyai peranan sangat besar dalam menentukan mutu produk pangan. Protein dapat bersumber dari hewan (protein hewani) dan tumbuhan (protein nabati).

Sintesis protein adalah proses pembentukan protein dari monomer peptida yang diatur susunannya oleh kode genetik. Sintesis protein dimulai dari anak inti sel, sitoplasma dan ribosom. Sintesis protein terdiri dari 2 tahap yaitu transkripsi dan translasi. Transkripsi adalah proses penerjemahan informasi genetik dalam bentuk urutan basa menjadi protein sedangkan translasi adalah proses penerjemahan urutan nukleotida atau kodon yang ada pada molekul mRNA menjadi rangkaian asam-asam

amino yang menyusun suatu polipeptida atau protein. Mekanisme sintesis protein dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Sintesis protein

Penggolongan protein dibedakan menjadi beberapa macam, antara lain yaitu :

### 2.3.1 Berdasarkan struktur molekulnya

Struktur protein terdiri dari empat macam, yaitu :

#### 1. Struktur primer (struktur utama)

Struktur ini terdiri dari asam amino-asam amino yang dihubungkan satu sama lain secara kovalen melalui ikatan peptida.

#### 2. Struktur sekunder

Protein sudah mengalami interaksi intermolekul, melalui rantai samping asam amino. Ikatan yang membentuk struktur ini, didominasi oleh ikatan hidrogen antar rantai samping yang membentuk pola tertentu tergantung pada orientasi ikatan hidrogennya. Ada dua jenis struktur sekunder yaitu  $\alpha$ -heliks dan  $\beta$ -sheet.

#### 3. Struktur tersier

Terbentuk karena adanya pelipatan membentuk struktur yang kompleks. Pelipatan distabilkan oleh ikatan hidrogen, ikatan disulfida, interaksi ionik, ikatan hidrofobik dan ikatan hidrofilik.

#### 4. Struktur kuartener

Terbentuk dari beberapa bentuk tersier dengan kata lain multi subunit. Interaksi intermolekul antar subunit protein ini membentuk struktur keempat/kuartener.

### 2.3.2 Berdasarkan bentuknya

#### 1. Protein globular

Terdiri dari polipeptida yang bergabung satu sama lain (berlipat rapat) membentuk bulat padat. Misalnya aktin, miosin, tropomiosin, albumin, dan mioglobin. Protein ini dapat larut dalam garam (protein miofibrillar) dan air (protein sarkoplasma).

Protein miofibrillar adalah protein-protein yang terdapat pada benang-benang daging (miofibril dan miofilamen). Yang termasuk golongan protein ini adalah tipe golongan protein globulin misalnya myosin, aktin dan tropomyosin (Xiong 2000). Suzuki (1981) menyatakan protein miofibrillar bersifat sedikit larut dalam air pada pH netral tetapi larut dalam larutan garam kuat. Protein miofibrillar adalah protein yang membentuk miofibril yang terdiri dari protein struktural (aktin, myosin dan aktomiosin) dan protein regulasi (troponin, tropomyosin dan aktinin). Protein miofibrillar merupakan bagian terbesar dari protein ikan yaitu sekitar 66-77% dari total protein ikan dan bila dibandingkan dengan daging mamalia dan unggas, daging ikan mengandung protein miofibril yang terbanyak. Miofibril sangat berperan dalam penggumpalan dan pembentukan gel pada daging ikan yang diolah.

Protein sarkoplasma sebagai protein terbesar kedua mengandung bermacam-macam protein yang larut dalam air yang disebut miogen. Protein ini meliputi sebagian besar enzim yang terlibat dengan metabolisme energi, seperti glikolisis. Protein sarkoplasma mempunyai sifat fisika kimia, sebagai contoh sebagian besar protein sarkoplasma memiliki berat molekul relatif rendah, pH isoelektrik tinggi, dan struktur bulat. Karakteristik fisik ini yang bertanggung jawab untuk daya larut yang tinggi di dalam air (Nakai, 1999). Kandungan protein sarkoplasma dalam daging ikan tergantung pada jenis ikan, biasanya terdapat dalam jumlah sekitar 10 % dari total protein ikan. Hadiwiyoto (1993) menyatakan bahwa protein yang tergolong protein sarkoplasma adalah protein albumin, mioalbumin dan mioprotein. Salah satu

jenis protein sarkoplasma yang paling utama dalam kaitan dengan mutu daging adalah mioglobin. Protein tersebut bertanggung jawab untuk memberi warna merah dalam daging segar (Pearson, 1989).

## 2. Protein serabut (*fibrous protein*)

Terdiri dari peptida berantai panjang dan berupa serat-serat yang tersusun memanjang, dan memberikan peran struktural atau pelindung. Protein ini tidak larut dalam air, asam, basa, maupun etanol (protein stroma). Contoh protein stroma yaitu kolagen dan elastin yang merupakan protein yang terdapat pada bagian luar sel otot. Daging merah ikan pada umumnya mengandung lebih banyak protein stroma, tetapi lebih sedikit mengandung protein sarkoplasma jika dibandingkan dengan daging putih ikan. Daging merah ini terdapat di sepanjang tubuh bagian samping di bawah kulit, sedangkan daging putih terdapat pada hampir seluruh tubuh (Suzuki, 1981). Kolagen adalah salah satu jenis protein jaringan pengikat yang dominan baik dalam jumlahnya maupun peranannya, struktur kolagen menyerupai benang-benang jala. Kolagen tidak larut dalam air maupun larutan garam tetapi larut dalam alkali dan jika dipanaskan maka strukturnya akan berubah menjadi peptida-peptida dengan berat molekul yang lebih rendah (Hadiwiyoto, 1993).

### 2.3.3 Berdasarkan fungsinya

Winarno (1984), mengatakan bahwa protein mempunyai berbagai fungsi bagi tubuh, yaitu :

#### 1. Sebagai enzim

Hampir semua reaksi biologis dipercepat atau dibantu oleh suatu senyawa makromolekul spesifik yang disebut enzim, misalnya tripsin.

## 2. Zat pengatur pergerakan

Protein merupakan komponen utama daging. Gerakan otot terjadi karena adanya dua molekul protein yang saling bergesekan, misalnya aktin dan miosin.

## 3. Pertahanan tubuh (imunitas)

Pertahanan tubuh biasanya dalam bentuk antibodi yaitu suatu protein khusus yang dapat mengenal atau mengikat benda-benda asing yang masuk ke dalam tubuh, seperti virus, bakteri, dan sel-sel lain. Protein dapat membedakan benda yang menjadi anggota tubuh dan benda-benda asing.

## 4. Alat pengangkut dan alat penyimpan

Banyak molekul dengan berat molekul kecil serta beberapa ion dapat diangkut atau dipindahkan oleh protein-protein tertentu. Misalnya hemoglobin mengangkut oksigen dalam eritrosit.

## 5. Penunjang mekanis

Kekuatan dan daya tahan robek kulit dan tulang disebabkan oleh kolagen.

## 6. Media perambatan impuls (saraf)

Protein yang mempunyai fungsi ini biasanya berbentuk reseptor, misalnya rodopsin yaitu suatu protein yang bertindak sebagai reseptor/penerima warna atau cahaya pada sel-sel mata.

## 7. Pengendalian pertumbuhan (hormon)

Protein ini bekerja sebagai reseptor (dalam bakteri) yang dapat mempengaruhi fungsi bagian-bagian DNA yang mengatur sifat dan karakter bahan. Contohnya yaitu hormon insulin dan paratiroid.

### **2.4 Ekstraksi Protein**

Ekstraksi protein dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya yaitu ekstraksi pelarut, sonikasi, dan superkritikal karbon dioksida. Metode ekstraksi yang umum digunakan adalah berdasarkan kelarutan protein karena penggolongan protein

hasil ekstraksi lebih spesifik. Menurut Novax *et al.* (1977), ekstraksi miosin, aktin, dan tropomiosin dapat dilakukan dengan menggunakan larutan garam netral yang berkekuatan ion tinggi, pada suhu rendah (0°C). Dyer *et al.* (1949) dan Hamoir (1995) menyatakan bahwa larutan garam (NaCl, KCl, dan LiCl) pada konsentrasi 0,5-1,0 M, pH 7,0-7,5 sangat baik untuk ekstraksi. Efektifitas ekstraksi ditentukan oleh kelarutan protein di dalam larutan pengeksrak (pelarut). Menurut Novax *et al.* (1977), kelarutan protein dipengaruhi oleh sumber protein, kekuatan ion, pH larutan dan lama ekstraksi.

Pemilihan pelarut pada umumnya memiliki kriteria sebagai berikut :

1. Selektifitas

Pelarut hanya melarutkan ekstrak yang diinginkan, bukan komponen-komponen lain dari bahan ekstraksi.

2. Titik didih

Pelarut harus memiliki titik didih yang lebih rendah dari ekstrak.

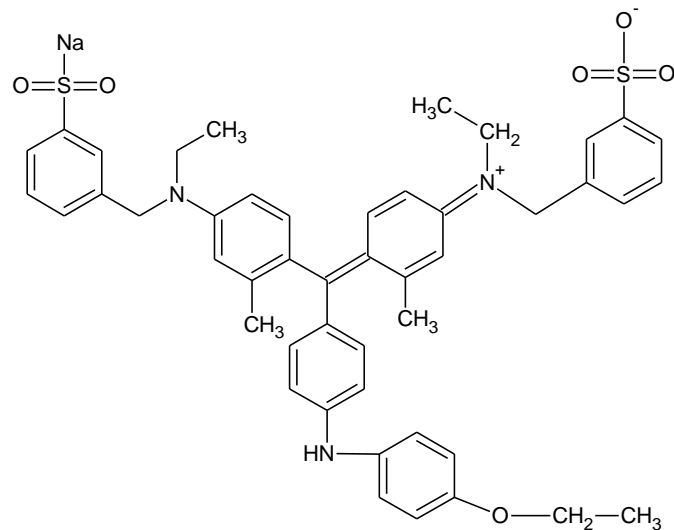
3. Kriteria yang lain

Pelarut sebisa mungkin murah, tersedia dalam jumlah besar, tidak korosif dan tidak membentuk emulsi.

## 2.5 Analisis protein

Keistimewaan dari protein adalah strukturnya yang mengandung N (15,30-18%), C (52,40%), H (6,90-7,30%), O (21-23,50%), dan S (0,8-2%). Dengan demikian maka salah satu cara terpenting yang cukup spesifik untuk menentukan jumlah protein secara kuantitatif adalah dengan penentuan kandungan protein yang ada dalam bahan makanan (Sudarmadji, 1989). Berbagai metode yang digunakan untuk menganalisa kandungan protein, diantaranya yaitu Kjeldahl, *Bradford*, *Biuret* dan *Lowry*. Dari keempat metode tersebut, *Bradford* merupakan metode yang paling cepat dan banyak digunakan.

Metode *Bradford* adalah suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total secara kolorimetri dalam larutan. Uji ini menggunakan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) yang ditunjukkan oleh Gambar 2.3. CBB berikatan dengan protein dalam larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna biru, karena pewarna tersebut diprotonasi oleh gugus amino dari lisin dan triptophan selanjutnya mengikat pada daerah hidrofobik protein sehingga mengubah warnanya menjadi biru. Dengan adanya perubahan warna tersebut, larutan dapat diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 465-595 nm. Metode *Bradford* menggunakan *Bovine Serum Albumine* (BSA) sebagai larutan standar.



Gambar 2.3 *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) (Sumber: Anonim, 2012)

## 2.6 Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan suatu komponen dengan campuran dimana komponen yang akan dipisahkan terdistribusi diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat sehingga zat terlarut terpisah. Berdasarkan fase geraknya, kromatografi

cairan dibagi menjadi tiga yaitu kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis dan kromatografi cair tekanan tinggi.

Menurut Hagel (1998), kromatografi filtrasi gel merupakan suatu bentuk kromatografi kolom yang teknik pemisahannya berdasarkan pada ukuran atau bentuk dari partikel analit. Pemisahan tersebut dilakukan menggunakan matriks yang berpori. Masing-masing molekul memiliki tingkatan yang berbeda untuk melewati pori tersebut (molekul yang lebih kecil memiliki kemampuan lebih tinggi untuk melewati pori tersebut dibandingkan dengan molekul yang lebih besar), sehingga menyebabkan pemisahan analit. Batasan pemisahan dari sebuah ukuran yang dipisahkan merupakan indikasi bobot molekul. Ukuran protein yang dapat dipisahkan oleh beberapa matriks gel dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Ukuran protein minimum yang dapat dipisahkan oleh matriks gel

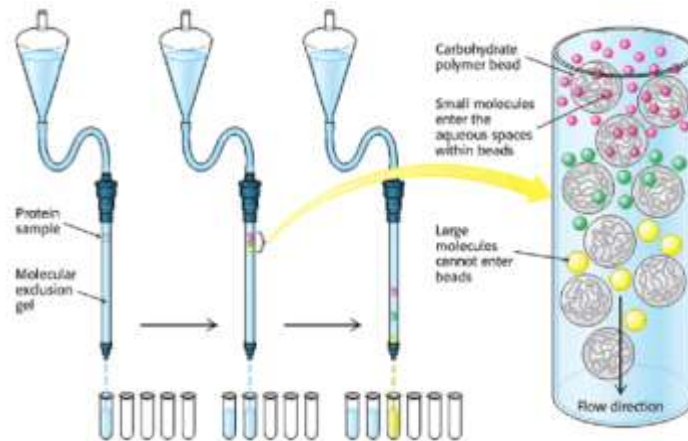
Tipe gel	Batas elusi	
	Mr	Radius (Å)
Sephadex G-10	700	7
Bio Gel P-2	1800	10
Sephadex G-25	5000	14
Bio Gel P6DG	6000	15
Sephadex G-50	30000	25

Sumber : Hagel (1998).

Pemisahan molekul yang terjadi yaitu molekul yang memiliki ukuran besar akan terelusi oleh fase gerak dari kolom kromatografi dan akan keluar paling awal melalui ruang antar matriks dengan laju alir yang tinggi. Molekul berukuran kecil akan terelusi ke dalam fase diam oleh fase gerak dengan laju alir yang rendah, sehingga akan keluar dari kolom paling akhir (Wilson & Walker, 1994). Ilustrasi



pemisahan protein yang terjadi pada kromatografi kolom ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Kromatografi kolom (Sumber : Berg, 1975)

## 2.7 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dengan demikian elektroforesis dapat digunakan untuk pemisahan makromolekul (misalnya protein dan asam nukleat). Posisi molekul yang terpisahkan pada gel dapat dideteksi dengan menggunakan pewarna. Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan, selain itu media penyangga tersebut dapat digunakan sebagai tempat bermigrasinya molekul-molekul. Media penyangga bermacam-macam tergantung pada tujuan dan bahan yang akan dianalisa. Media penyangga yang sering digunakan dalam elektroforesis antara lain kertas, selulose, asetat dan gel. Gel poliakrilamida dan agarosa merupakan matriks penyangga yang banyak digunakan untuk pemisahan protein dan asam nukleat. Umumnya analisis elektroforesis protein menggunakan gel poliakrilamida yang

sesuai antara konsentrasi akrilamida dengan pori-pori. Hubungan antara konsentrasi dengan pori-pori dapat dilihat pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Hubungan antara konsentrasi dengan pori-pori

% gel	Ukuran pori (nm)
5	3,6
10	2,6
20	1,8
30	1,3

Sumber : Laemmli (1970)

Menurut Soedarmadji (1996) terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi kecepatan migrasi dari molekul protein yaitu :

1. Ukuran molekul protein

Migrasi molekul protein berukuran besar lebih lambat daripada migrasi molekul berukuran kecil.

2. Konsentrasi gel

Migrasi molekul protein pada gel berkonsentrasi rendah lebih cepat daripada migrasi molekul protein yang sama pada gel yang berkonsentrasi tinggi.

3. Buffer (penyangga)

Buffer dapat berperan sebagai penstabil medium pendukung dan dapat mempengaruhi kecepatan gerak senyawa karena ion sebagai pembawa protein yang bermuatan.

- Kekuatan ion yang tinggi dalam buffer akan meningkatkan panas sehingga aliran listrik menjadi maksimal. Hal ini dapat mempercepat gerakan molekul protein.
- Kekuatan ion rendah dalam buffer akan menurunkan panas sehingga aliran listrik akan sangat minimal dan migrasi molekul protein sangat lambat.

4. Medium penyangga

Medium penyangga ideal untuk elektroforesis adalah bahan kimia inert yang bersifat relatif stabil, mudah ditangani dan mempunyai daya serap yang baik, sebagai migrasi elektron atau penyaringan berdasarkan ukuran molekul seperti gel poliakrilamida. Jika ukuran pori dari medium hampir sama dengan molekul, maka molekul yang lebih kecil akan berpindah lebih bebas di dalam medan listrik, sedangkan molekul yang lebih besar akan dibatasi dalam migrasinya. Besarnya pori-pori dapat diatur dengan mengubah konsentrasi penyusun gel poliakrilamida.

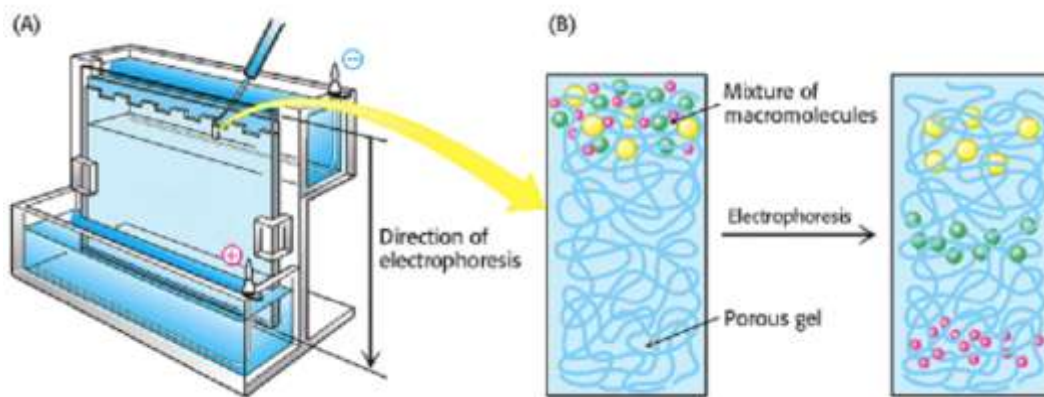
5. Kekuatan voltase

- Voltase yang dipakai rendah (100-500 V), kecepatan migrasi molekul sebanding dengan tingginya voltase yang digunakan.
- Voltase yang dipakai tinggi (500-10000 V), mobilitas molekul meningkat secara lebih tajam dan digunakan untuk memisahkan senyawa dengan berat molekul rendah serta jenis arus yang dipakai selalu harus searah.

6. Temperatur medium disaat proses elektroforesis berlangsung

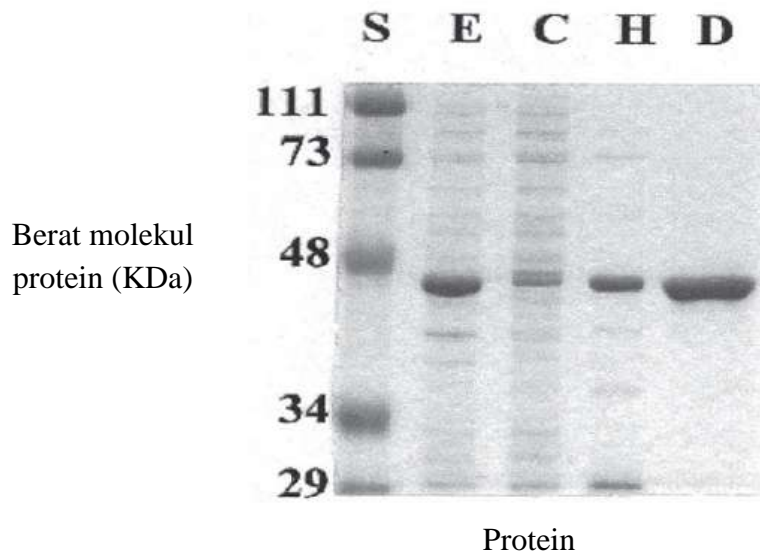
Jika temperaturnya tinggi akan mempercepat proses migrasinya protein dan sebaliknya jika temperatur rendah maka akan mengurangi kekuatan bermigrasinya protein.

Saat elektroforesis berlangsung seperti yang terlihat pada Gambar 2.5, protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju elektroda positif sampai pada jarak tertentu pada gel poliakrilamida tergantung pada berat molekulnya. Semakin rendah berat molekulnya maka semakin jauh pula protein bergerak atau mobilitasnya tinggi. Sebaliknya protein dengan berat molekul lebih besar akan bergerak pada jarak yang lebih pendek atau mobilitasnya rendah (Sumitro *et al.*, 1996).



Gambar 2.5 Proses elektroforesis (Sumber : Berg, 1975)

Hasil elektroforesis akan didapatkan pita-pita protein yang terpisahkan berdasarkan berat molekulnya seperti yang tertera pada Gambar 2.6. Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Soedarmadji, 1996).



Gambar 2.6 Elektroforegram (Sumber : Murray, dkk, 2003)

## **BAB III. METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia dan Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada bulan November 2012 sampai Maret 2013.

### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.2.1 Alat**

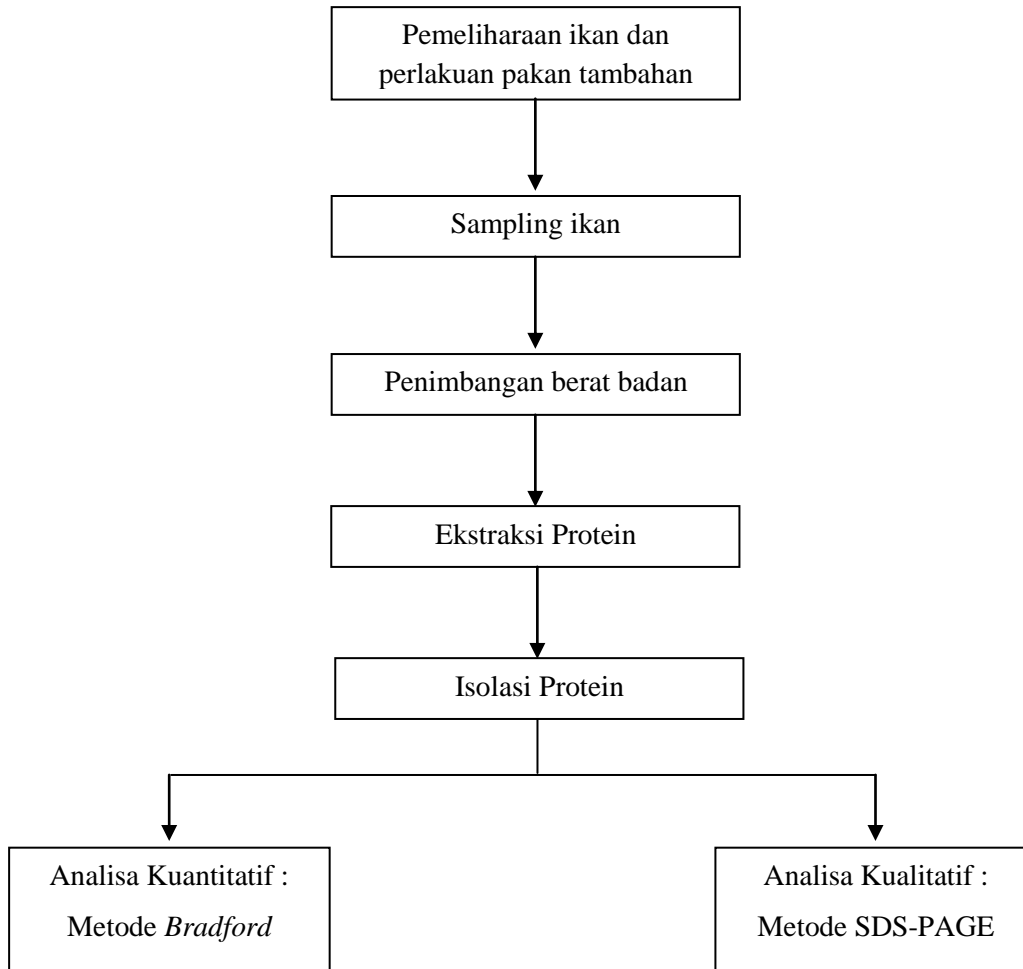
Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi : pisau, blender, spektrofotometer UV, buret, kantong plastik, satu *set alat* elektroforesis, mikropipet, neraca analitik, beaker glass 100 mL dan 250 mL, labu ukur 10 mL, 50 mL dan 100 mL, pipet Mohr 10 mL dan botol semprot.

#### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi : ikan patin (*Pangasius djambal*), aquades, es, NaCl 4%, gel Sphadex G-25, buffer Tris HCl 0,05 M, larutan BSA, reagen *Bradford*, larutan akrilamida, SDS (*Sodium Dodecil Sulfate*), TEMED (*tetra ethylene diamine*), APS (*Ammonium Persulfat*), CBB (*Coomassie Brilliant Blue*), dan marker protein SDS-PAGE.

### 3.3 Rancangan Penelitian

#### 3.3.1 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Pemeliharaan ikan dan perlakuan pakan tambahan**

Tiga kolam masing-masing berukuran 3 x 5 x 1 m<sup>3</sup> memiliki padat tebar 500 ekor / 15m<sup>3</sup>. Masing-masing kolam diberi perlakuan pakan yang berbeda. Kolam pertama, ikan hanya diberi pakan pelet saja dengan komposisi 300 gram setiap kali makan, sedangkan untuk kolam yang kedua, ikan diberi pakan pelet dan ditambah suplemen probiotik. Kolam ketiga, ikan diberi pakan pelet dengan pakan tambahan *Azolla pinnata* yang memiliki perbandingan 3:1. Pemberian pakan dilakukan setiap dua kali sehari yaitu siang dan sore hari.

#### **3.4.2 Pengambilan Sampel**

Penelitian ini menggunakan metode survei dengan tehnik pengambilan sampel acak. Jumlah ikan patin (*P. djambal*) diambil sebanyak 5% dari populasi ikan yaitu 25 ekor sebanyak tiga kali pengulangan (Singh, 2006).

#### **3.4.3 Preparasi Sampel**

Ikan patin (*P. djambal*) segar dibersihkan, dibuang kepala, ekor dan bagian dalam perut. Selanjutnya dipisahkan daging dari tulang belakang dan kulit. Kemudian daging dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam tas plastik yang steril.

#### **3.4.4 Ekstraksi Protein**

##### **1. Protein Larut dalam Air (Miller dan Groniger, 1976)**

20 gram fillet ditambah dengan 400 mL air destilat pada pH 7 setelah itu diaduk selama 30 menit dan diblender. Campuran hasil blender lalu disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Supernatan yang dihasilkan disimpan pada suhu 3°C sebelum digunakan.

##### **2. Protein Larut dalam Garam (Dyer *et al.*, 1949)**

20 gram fillet ditambah dengan 400 mL NaCl 4% dan diblender selama 3 menit. Campuran hasil blender lalu disentrifugasi dengan kecepatan

8000 rpm, selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan disimpan pada suhu 3°C sebelum digunakan.

#### **3.4.5 Isolasi Protein**

Kolom kromatografi fitrasi gel Sephadex G-25 dielusi dengan mengalirkan 0,05 M buffer Tris HCl pH 7. Sebelum digunakan untuk mengelusi ekstrak, eluen yang telah melewati kolom, dianalisa kadar proteinnya dengan metode *Bradford*. Jika tidak muncul serapan, maka dimasukkan ekstrak protein. Ekstrak protein dimasukkan dengan pipet secara perlahan ke dalam kolom tepat di atas permukaan gel sebanyak 2 mL. Ekstrak protein dibiarkan mengalir perlahan sampai seluruh ekstrak berada di bawah permukaan gel. Kolom diisi dengan pengelusi 0,05 M buffer Tris HCl pH 7,0. Penampungan fraksi dilakukan setiap 5 mL secara terus menerus sejak ekstrak dielusi oleh eluen sampai sampel tidak menunjukkan serapan ketika diukur kadar proteinnya dengan menggunakan metode *Bradford*.

#### **3.4.6 Analisa Kadar protein (*Bradford*, 1976)**

Sampel diambil sebanyak 10 µL, kemudian ditambahkan dengan 40 µL akuades. Setelah itu, sampel ditambah dengan 950 µL reagen *Bradford* dan divortex. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 595 nm. Standar protein yang digunakan adalah albumin serum sapi (BSA) pada kisaran 0,1-1,0 mg/mL.

#### **3.4.7 Analisa protein dengan SDS-PAGE (*Laemmli*, 1970)**

Metode elektroforesis menggunakan SDS-PAGE. Gel terdiri dari dua lapis yaitu *separating gel* (gel sebagai media pemisah protein) dan *stacking gel* (gel pengumpul sampel). Dalam *separating gel* komposisi yang dipakai adalah akrilamid 30 %, Tris HCl 1,5M pH 8,8, ddH<sub>2</sub>O, SDS 10 %, APS 10%, TEMED Sedangkan dalam *stacking gel* akrilamida 30 %, Tris HCl 1,5M pH 6,8, ddH<sub>2</sub>O, SDS 10 %, APS 10%, TEMED. Larutan *separating gel* yang telah dibuat, dituang ke dalam *plate*



pembentuk gel menggunakan pipet sampai tiga perempat tinggi *plate*. Perlahan dituang akuades di atas larutan gel agar permukaan gel tidak bergelombang, dibiarkan memadat selama 20 menit. Setelah memadat, akuades dibuang dan segera dituangkan *stacking gel* ke dalam *plate* pembentuk gel. Perlahan diselipkan sisir pembentuk sumur sampel ke dalam *stacking gel* segera setelah dituang. Setelah gel memadat sekitar 20 menit, sisir diangkat.

Sampel protein dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit, sebagai bahan warna adalah *reducing sample buffer* (RSB) dengan perbandingan 2:1 (sampel protein:RSB). Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel menggunakan mikropipet, kemudian dielektroforesis dengan arus 40-80 Volt selama 3 jam. Selanjutnya gel diangkat dari chamber, pewarnaan dilakukan dengan merendam dalam *staining solution* selama 1 jam sambil digoyang-goyang. Setelah itu, pewarnaan dihentikan dengan *destaining solution* dan kemudian diamati pita-pita yang muncul.

### 3.5 Pengolahan Data

#### 3.5.1 Penimbangan berat badan ikan

No.	Tanggal	Berat Badan Ikan (gram)		
		Pellet	Pellet + Probiotik	Pellet + <i>Azolla pinnata</i>
1	Bulan I	0,05	0,05	0,05
2	Bulan III			
3	Bulan IV			
4	Bulan V			
5	Bulan VII			

### 3.5.2 Analisa protein

No.	Analisa	Ikan Patin ( <i>Pangasius djambal</i> )		
		Pellet	Pellet + Probiotik	Pellet+ <i>Azolla pinnata</i>
1	Protein larut dalam air			
	a. Kadar Protein			
	b. Macam-macam protein berdasarkan berat molekulnya			
2	Protein larut dalam larutan garam 4%			
	a. Kadar Protein			
	b. Macam-macam protein berdasarkan berat molekulnya			

## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pemeliharaan Ikan dan Perlakuan Pakan Tambahan

Ikan patin (*Pangasius djambal*) yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil budidaya sendiri. Pemeliharaan ikan ditempatkan pada tiga kolam, dimana masing-masing kolam diisi dengan satu variasi pakan. Pemeliharaan ikan patin (*P. djambal*), pada penelitian ini menggunakan kolam terpal. Pemilihan kolam terpal sebagai tempat pemeliharaan ikan untuk mengurangi gangguan dari luar, misalnya fitoplankton yang dapat mempengaruhi proses analisa protein. Jadi pemeliharaan ikan patin pada kolam terpal diharapkan ikan hanya mengkonsumsi pakan yang diberikan.

Ukuran kolam yang digunakan adalah  $3 \times 5 \times 1 \text{ m}^3$ . Padat penebaran benih masing-masing kolam sebanyak 33-34 ekor/ $\text{m}^3$ . Sebelum penebaran benih, dilakukan aklimatisasi (penyesuaian kondisi lingkungan) agar benih tidak stres. Proses aklimatisasi ini dilakukan dengan cara menambahkan sedikit demi sedikit air kolam pemeliharaan ke kolam terpal agar kualitas airnya sama. Penebaran benih ikan dilakukan pada pagi hari saat kondisi perairan tidak terlalu panas.

Pakan merupakan salah satu faktor yang sangat mempengaruhi laju pertumbuhan ikan. Pakan yang digunakan pada penelitian ini berupa pelet komersial, kemudian untuk pakan tambahannya yaitu *Azolla pinnata* dan suplemen probiotik. Kandungan gizi pada pelet komersial yang digunakan yaitu protein 31-33%, lemak 4%, serat kasar 5%, abu 13% dan air 12%. Frekuensi pemberian pakan dilakukan dua kali sehari yaitu pagi dan sore hari. Takaran pakannya yaitu 300 gram pelet untuk satu kali pemberian pakan sedangkan ikan yang diberi suplemen probiotik, 5 ml konsentrat probiotik diencerkan menjadi 250 ml kemudian disemprotkan pada 2000 gram pelet. Takaran pakan untuk ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata* yaitu memiliki perbandingan 3:1 (pelet : *A. pinnata*).

Pemberian pakan tambahan dilakukan setelah ikan berumur dua bulan. Berdasarkan data hasil pengamatan berat badan ketika berumur 7 bulan, ikan yang diberi suplemen probiotik memiliki kenaikan berat badan lebih signifikan daripada ikan yang diberi pakan pelet maupun yang diberi pakan tambahan *A. pinnata*. Berat badan ikan yang diberi suplemen probiotik rata-rata sebesar 348,33 gram, sedangkan ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) dan ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata* berturut-turut memiliki berat badan 316,67 gram dan 303,33 gram (Lampiran B). Hal tersebut dapat membuktikan bahwa dengan pemberian pakan tambahan probiotik dapat meningkatkan nafsu makan dan memacu pertumbuhan secara maksimal sehingga menambah berat badan ikan. Tetapi ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol), memiliki berat badan yang lebih besar dari pada ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata*. Penyebabnya karena *A. pinnata* memiliki serat kasar yang tinggi. Nilai nutrisi pakan berserat tinggi ditentukan oleh isi sel dan penyusun utama dinding sel yaitu lignin, selulosa dan hemiselulosa (Christiyanto, 2005). Adanya lignin yang berlebihan pada sistem pencernaan akan menurunkan pencernaan bahan pakan sehingga ikan mengalami kenyang semu. Gangguan metabolisme yang diakibatkan lignin adalah penurunan daya pencernaan dan penurunan bobot badan (Widodo, 2003).

#### **4.2 Pengambilan dan Preparasi Sampel**

Pengambilan sampel pada pemeliharaan di kolam terpal dilakukan dengan cara menguras kolam hingga air yang tersisa hanya setengah dari volume awal. Ikan kemudian digiring pada salah satu sisi dengan menggunakan jaring. Setelah itu, pengambilan sampel dilakukan secara acak. Pemilihan tehnik pengambilan sampel secara acak karena sampel yang digunakan lebih homogen sehingga dapat mewakili populasi. Umur sampel ikan yang digunakan adalah 7 bulan. Setelah sampel diambil kemudian langsung dibersihkan dan dipisahkan antara kepala, badan, ekor, kulit serta tulang ikan. Badan ikan yang sudah bersih (*fillet*) ditimbang dan disesuaikan dengan jumlah sampel untuk proses ekstraksi agar penggunaan sampel lebih efisien.

### 4.3 Ekstraksi Protein

Ekstraksi protein pada penelitian ini dilakukan dengan dua cara berdasarkan kelarutannya, yaitu ekstraksi protein larut air dan larut dalam larutan garam. Dyer *et al* (1949) menyatakan bahwa, kondisi optimum untuk ekstraksi protein miofibril (miosin) adalah pada konsentrasi garam NaCl 3-5% dengan pH sekitar netral (7,0-7,5), sedangkan pada penelitian ini, menggunakan konsentrasi NaCl 4%. Efektifitas ekstraksi dapat ditentukan oleh kelarutan protein di dalam larutan pengestrak. Menurut Novax *et al.* (1977), kelarutan protein dipengaruhi oleh sumber protein, kekuatan ion, pH larutan dan lama ekstraksi.

Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, yaitu sampel dihaluskan dengan blender kemudian larutan disentrifugasi. Penghalusan sampel dengan menggunakan blender bertujuan untuk memecah dinding sel sehingga protein terekstrak. Proses penghalusan sampel dilakukan selama tiga menit karena jika terlalu lama akan menyebabkan perubahan fisik protein yang disebabkan oleh aktifitas biologis, misalnya dipengaruhi panas dari blender. Setelah dihaluskan, sampel disentrifugasi untuk memisahkan protein kasar yang terdapat pada supernatan dengan senyawa lain yang terdapat pada pelet.

Protein dapat berinteraksi dengan air karena keduanya sama-sama bersifat polar. Molekul air yang terikat pada protein menyebabkan gaya tarik menarik sehingga protein akan mudah larut dalam air. Sedangkan larutan garam dalam protein akan mengalami interaksi ionik. Kelarutan protein meningkat pada kenaikan konsentrasi garam (*salting in*). Kenaikan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Tetapi pada proses *salting in*, konsentrasi garam tidak jenuh atau konsentrasinya rendah sehingga protein menjadi bermuatan dan larut dalam larutan garam. Pada penelitian ini digunakan larutan garam dengan konsentrasi 4% karena jika konsentrasinya terlalu tinggi akan menyebabkan *salting out* sehingga kelarutan protein menurun. *Salting out* disebabkan karena molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak yang akhirnya menyebabkan penarikan

selubung air yang mengelilingi permukaan protein, sehingga menyebabkan protein saling berinteraksi, beragregasi dan kemudian mengendap.

#### 4.4 Isolasi Protein

Isolasi protein pada penelitian ini menggunakan kolom kromatografi filtrasi gel. Prinsip pemisahan kolom kromatografi filtrasi gel berdasarkan perbedaan ukuran molekul. Molekul yang memiliki ukuran yang lebih besar akan keluar terlebih dahulu dibandingkan dengan molekul dengan ukuran kecil. Hal tersebut dapat terjadi karena molekul yang berukuran kecil terjatuh dahulu di dalam pori fase diam sehingga keluar paling akhir. Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah gel sephadex G-25 dengan kemampuan memisahkan molekul protein sampai 5 kDa. Sephadex dapat tahan terhadap asam lemak dan stabil pada kisaran pH 1-10. Panjang kolom yang digunakan pada penelitian ini sebesar 9 cm dengan diameter sebesar 1,2 cm. Fase gerak yang digunakan adalah buffer tris HCl pH 7.

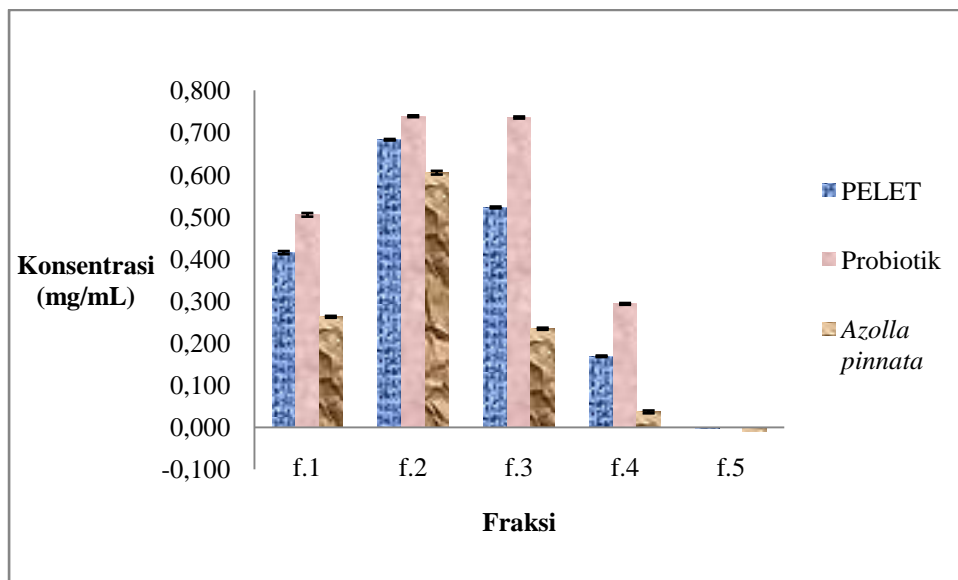
Sebelum digunakan, gel sephadex dicuci terlebih dahulu untuk menghilangkan zat-zat sisa penggunaan sebelumnya. Proses pencucian sephadex dilakukan dengan cara menambahkan 0,1 M NaOH. Penambahan NaOH pada proses pencucian tersebut bertujuan untuk membunuh bakteri dan jamur yang tidak tahan pada suasana basa. Setelah itu gel sephadex dinetralkan hingga pH 7 dengan penambahan akuades. Kemudian gel sephadex dicuci lagi dengan 0,1 M HCl dan dinetralkan kembali dengan akuades. Setelah sephadex dicuci kemudian dimasukkan ke dalam kolom sampai volumenya 10 mL dan dielusi dengan buffer tris HCl pH 7. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam kolom sebanyak 2 mL dan dielusi lagi dengan buffer tris HCl pH 7.

Hasil dari pemisahan protein menggunakan kolom kromatografi filtrasi gel didapatkan 4 fraksi untuk protein larut air dan 3 fraksi untuk protein larut dalam larutan garam 4%. Hal tersebut terjadi karena pada fraksi ke 5 untuk protein larut air dan fraksi ke 4 untuk protein larut dalam larutan garam 4%, tidak menunjukkan serapan ketika diukur kadar proteinnya dengan metode *bradford* sehingga elusi

dihentikan seperti yang tertera pada Gambar 4.1 dan Gambar 4.2. Masing-masing fraksi menampung 5 mL isolat. Selanjutnya fraksi yang diperoleh dianalisa kadar dan jenis proteinnya.

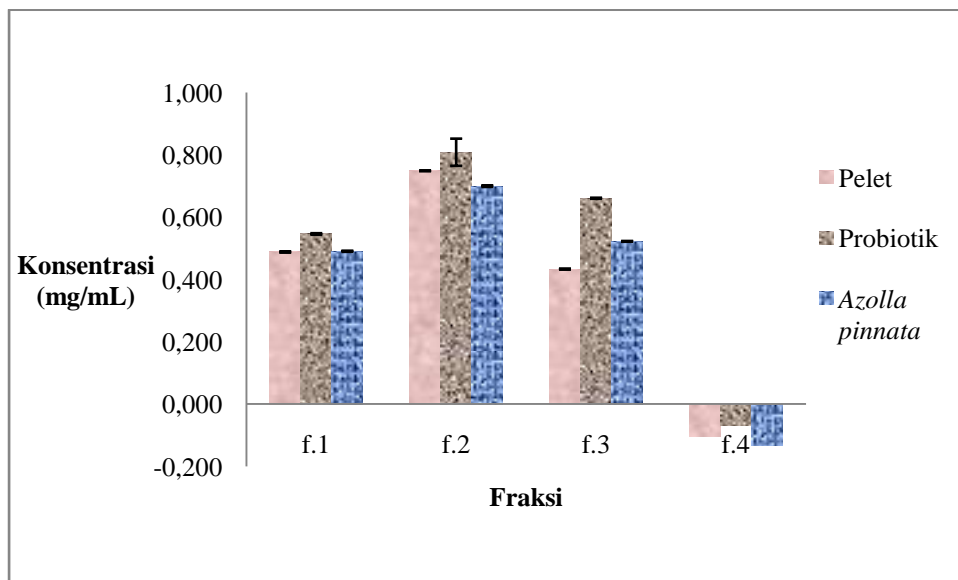
#### 4.5 Analisa Kadar protein

Jenis pakan ikan yang digunakan pada penelitian ini yaitu pelet, pelet yang ditambah suplemen probiotik dan pelet yang diberi pakan tambahan *A. pinnata*. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui pengaruh pakan tambahan yang mengandung protein tinggi (*A. pinnata*) dan membantu proses pencernaan makanan (probiotik). Handajani (2007) menyatakan protein yang berkualitas tinggi adalah protein yang memiliki nilai kecernaan tinggi dan dapat menyediakan semua asam amino esensial yang dibutuhkan ternak. Nilai kecernaan suatu protein akan memberikan gambaran tentang persentase makanan yang dapat dicerna. Nilai kecernaan protein ransum berhubungan dengan besar kecilnya serat kasar pada pakan. Pakan yang memiliki serat kasar tinggi akan menghambat kecernaan protein dan penyerapan asam-asam amino esensial sehingga terjadi defisiensi asam amino.



Gambar 4.1 Konsentrasi Protein Ikan Patin (*P. djambal*) Larut Air

Berdasarkan Gambar 4.1, ikan yang memiliki kadar protein larut air tertinggi terletak pada fraksi ke 2 untuk semua variasi pakan. Ikan yang diberi suplemen probiotik pada pelet memiliki kadar protein sebesar 0,738 mg/mL, untuk ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) memiliki kadar protein sebesar 0,682 mg/mL sedangkan kadar protein yang paling rendah terdapat pada ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata* yaitu sebesar 0,604 mg/mL (Lampiran D.2). Sedangkan untuk kadar protein daging ikan patin yang terbesar terkandung pada ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik, yaitu sebesar 3,404 gram protein dalam 20 gram sampel atau 17,023%, ikan yang diberi pakan pelet (kontrol) memiliki kandungan protein daging sebesar 2,680 gram atau 13,4% dan ikan yang diberi pakan pelet dan *A. pinnata* memiliki kadar protein daging sebesar 1,704 gram atau 8,52% (Lampiran D.5). Menurut Hustiany (2005), kandungan protein pada daging ikan patin sebesar 10,76 %, jadi kandungan protein yang didapatkan pada penelitian ini hampir sesuai dengan literatur.



Gambar 4.2 Konsentrasi Protein Ikan Patin Larut (*P. djambal*) Garam 4%



Berdasarkan Gambar 4.2 kandungan protein larut dalam larutan garam 4% tertinggi terdapat pada ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik yaitu sebesar 0,808 mg/mL. Sebaliknya kadar protein larut dalam larutan garam 4% paling rendah terkandung pada ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata* yaitu sebesar 0,700 mg/mL. Untuk kandungan protein larut dalam larutan garam 4% pada ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) sebesar 0,749 mg/mL (Lampiran D.4). Sedangkan untuk kadar protein daging ikan patin yang terbesar terkandung pada ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik, yaitu sebesar 2,605 gram protein dalam 20 gram sampel atau 13,027%, ikan yang diberi pakan pelet (kontrol) memiliki kandungan protein daging sebesar 2,192 gram atau 10,962% dan ikan yang diberi pakan pelet dan *A. pinnata* memiliki kadar protein daging sebesar 2,117 gram atau 10,585% (Lampiran D.5).

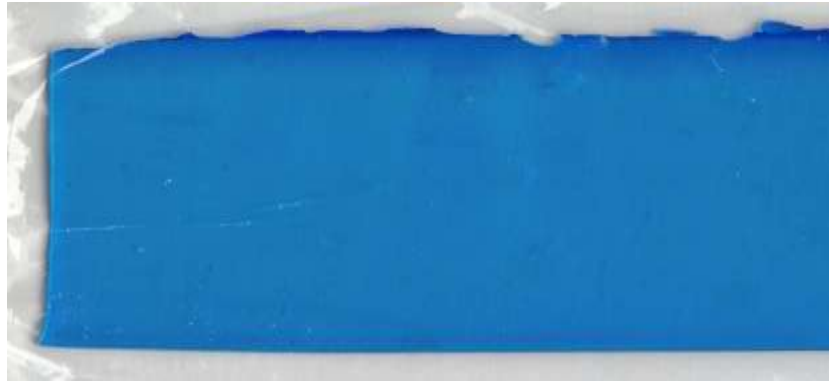
Kecernaan protein masing-masing bahan pakan berbeda-beda. Bahan pakan yang berasal dari produk hewani secara umum lebih mudah dicerna dibandingkan produk nabati (Kamaruddin, 2008). Konsentrasi protein tertinggi, baik larut air maupun larut dalam larutan garam 4% sama-sama terkandung pada ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik. Peningkatan kandungan protein pada ikan yang diberi pakan probiotik disebabkan karena adanya mikroba proteolitik yang terkandung pada probiotik. Mikroba proteolitik yang terkandung pada probiotik adalah *Lactobacillus*, *Acetobacter*, dan ragi. Mikroba proteolitik tersebut menghasilkan enzim protease yang menghidrolisis protein menjadi senyawa polipeptida, oligopeptida dan asam-asam amino. Asam-asam amino tersebut digunakan untuk sintesis protein oleh mikroba (Schiegel dan Schmidt, 1994). Mikroba sendiri merupakan sumber protein sel tunggal (Halama, 1990), sehingga secara tidak langsung dapat meningkatkan kadar protein pada ikan patin (*P. djambal*). Selain itu mikroba *Lactobacillus* menghasilkan bakteriosin yang dapat menghalangi pertumbuhan mikroba patogen dalam usus ikan. Bakteri *Lactobacillus* merupakan mikroorganisme fermentasi. Bahan pakan yang difermentasi mempunyai nilai nutrisi yang baik karena mikrobanya mampu memecah komponen yang kompleks menjadi

zat-zat yang lebih sederhana sehingga mudah dicerna, meningkatkan kualitas bahan asalnya (pelet) dan menurunkan kandungan serat kasar yang pada akhirnya meningkatkan nilai pencernaan. Ransum yang memiliki nilai pencernaan tinggi, menyebabkan protein yang diserap menjadi tinggi.

Kandungan protein pada ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata* cenderung paling rendah jika dibandingkan dengan ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol). Hal tersebut dapat terjadi karena *A. pinnata* memiliki kandungan serat kasar yang tinggi yaitu sekitar 9,1-12,7% (Cho *et al*, 1982). Tingginya serat kasar menyebabkan nilai pencernaan yang rendah. Penggunaan serat kasar yang tinggi, selain dapat menurunkan komponen yang mudah dicerna juga menyebabkan penurunan aktivitas enzim-enzim pemecah zat-zat makanan sehingga protein yang diserap juga rendah.

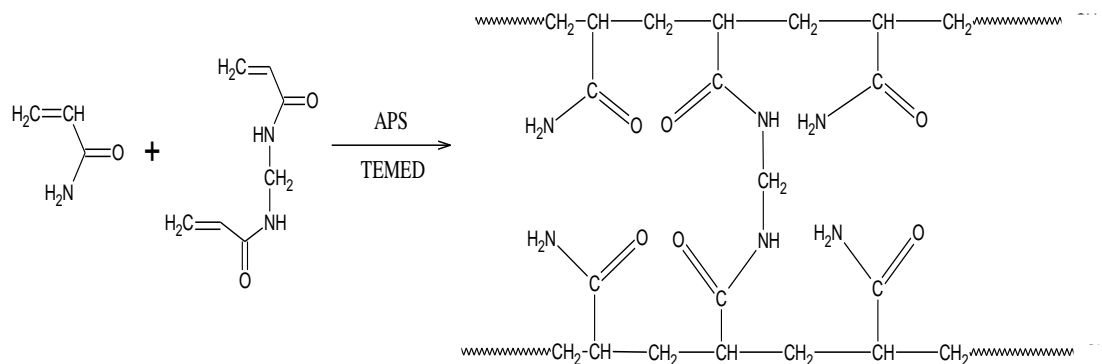
#### **4.7 Analisa protein dengan SDS-PAGE**

Analisa protein secara kualitatif pada daging ikan patin (*P. djambal*), dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Pemilihan metode ini bertujuan untuk menentukan jenis protein berdasarkan berat molekulnya. Prinsip pemisahannya yaitu berdasarkan perbedaan muatan, bentuk dan ukuran molekul. Secara umum, molekul yang berukuran besar akan memiliki mobilitas yang rendah jika dibandingkan dengan molekul dengan ukuran kecil. Sampel yang akan dianalisa jenis proteinnya merupakan sampel yang sudah dipisahkan melalui metode kolom kromatografi gel sephadex G-25 agar isolat yang dihasilkan murni protein. Jika sampel yang digunakan berupa ekstrak protein, maka hasil pemisahan pada elektroforegram tidak akan terlihat jelas seperti pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Elektroforegram Ekstrak Protein Ikan Patin (*P. djambal*)

Gel yang digunakan sebagai matriks penyangga pada penelitian ini adalah gel akrilamida 12,5 %. Pori pada gel ditentukan oleh panjang ikatan dan derajat *cross linking*, sedangkan panjang ikatan dipengaruhi oleh konsentrasi akrilamida pada reaksi polimerisasi. Jadi jika konsentrasi akrilamida besar maka mengakibatkan semakin kecilnya ukuran pori. Jika ukuran pori terlalu kecil mengakibatkan mobilitas terlalu pelan. Gambar 4.4 menunjukkan reaksi polimerisasi akrilamida dan bis-akrilamida pada pembentukan gel poliakrilamida.



Gambar 4.4 Reaksi polimerisasi akrilamida dan bis-akrilamida

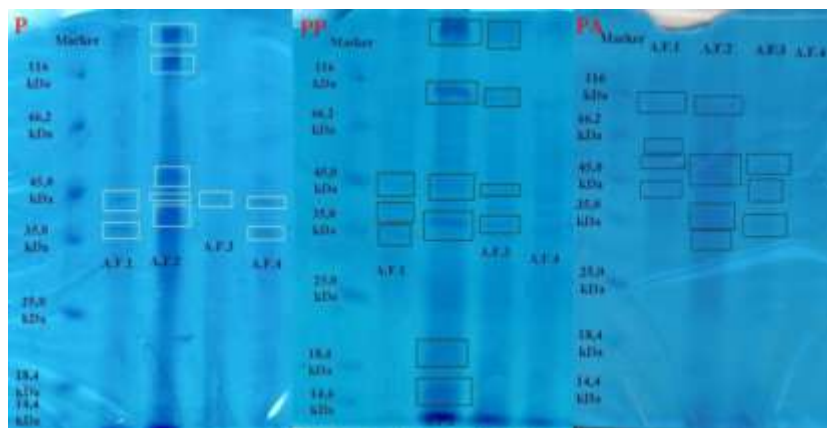
Sebelum sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel, protein didenaturasi dengan penambahan RSB (*reducing sample buffer*) yang mengandung SDS (*Sodium Dodecil Sulfate*) dan pemanasan pada suhu 100°C selama tiga menit untuk membuat protein tersebut berbentuk lurus dan bermuatan negatif. Jadi mengakibatkan protein bergerak dari katoda menuju anoda. Setelah *running* selesai, gel diwarnai (*staining*) dengan larutan CBB (*Coomassie Brilliant Blue*). CBB akan berikatan dengan peptida pada sampel dalam suasana asam. Gugus sulfonat pada CBB dijadikan gugus pelarut zat warna karena didalam air gugus sulfonat tersebut akan mengion sehingga terbentuk anion zat warna yang selanjutnya memudahkan terbentuknya ikatan dengan protein. Setelah proses *staining*, gel didestaining untuk memperjelas pita protein yang terikat dengan molekul CBB.

Perkiraan berat molekul masing-masing protein diketahui berdasarkan perbandingan jarak mobilitas protein sampel dengan marker protein (Lampiran E). Berat molekul relatif protein sampel dapat ditentukan melalui data *Rf* (*retention factor*) dan log berat molekul yang diplotkan pada grafik sehingga didapatkan persamaan log berat molekul. Persamaan log berat molekul untuk ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) adalah  $-1,001 \times Rf + 2,117$  (Lampiran E.2), sedangkan untuk ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik, memiliki persamaan log berat molekul =  $-1,079 \times Rf + 2,136$  (Lampiran E.2) dan untuk ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata*, persamaan log berat molekulnya yaitu  $-1,142 \times Rf + 2,141$  (Lampiran E.2). Adanya perbedaan pada persamaan log berat molekul elektroforegram disebabkan karena masing-masing variasi pakan, dilakukan satu kali *running* SDS-PAGE. Jadi *Rf* yang dihasilkan berbeda-beda sehingga perhitungannya juga berbeda.

Hasil analisis protein dengan menggunakan metode SDS-PAGE menunjukkan bahwa tidak semua fraksi yang dihasilkan ketika proses isolasi muncul pita protein pada elektroforegram. Protein yang larut air dapat dianalisa hingga fraksi 4, namun untuk protein yang larut pada larutan garam 4% hanya dianalisa sampai fraksi 3. Fraksi yang memiliki konsentrasi protein tertinggi dan terlihat lebih jelas pita

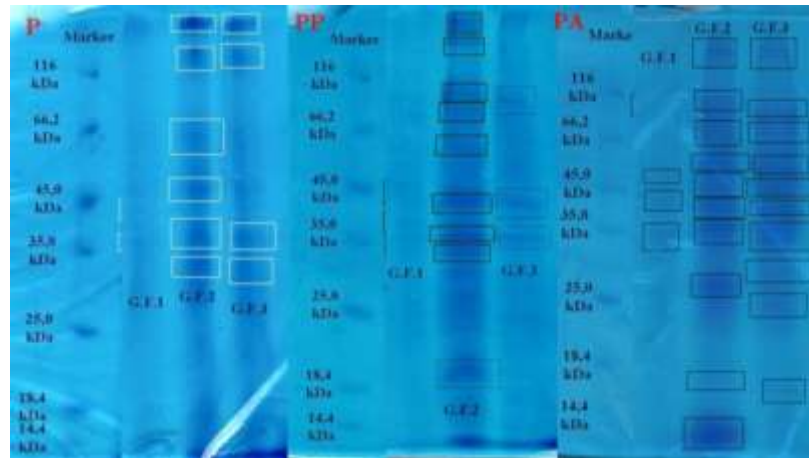
proteinnya yaitu terdapat pada fraksi 2. Hal tersebut dapat terjadi karena kadar protein pada fraksi-fraksi tertentu terlalu kecil, sehingga pita yang muncul tidak terlihat jelas. Oleh karena itu, untuk memunculkan pita-pita protein harus dilakukan metode presipitasi pada isolat.

Berdasarkan semua data elektroforegram yang diperoleh pada Gambar 4.5, tidak semua fraksi protein terpisah berdasarkan besar molekulnya. Misalnya pada fraksi 1 terdapat protein yang berat molekulnya lebih kecil daripada fraksi 2. Hal tersebut dapat terjadi karena sebagian besar fraksi pertama yang keluar adalah eluen. Selain itu pada beberapa fraksi 2 dan 3 masih memiliki jenis protein yang hampir sama, karena masing-masing fraksi menampung 5 mL isolat dan kemungkinan untuk fraksi 3 masih ada jenis protein fraksi 2. Tetapi meskipun demikian pita protein pada fraksi 2 terlihat lebih jelas daripada fraksi 3 karena konsentrasinya yang lebih rendah.



(A)

Gambar 4.5 Elektroforegram Isolat Protein Daging Ikan Patin (*P. djambal*). P. menunjukkan pelet, PP menunjukkan pelet ditambah suplemen probiotik dan PA merupakan pelet dan *A. pinnata*. A Merupakan Protein Larut Air dan F Menunjukkan Fraksi.



(G)

Gambar 4.6 Elektroforegram Isolat Protein Daging Ikan Patin (*P. djambal*). P. menunjukkan pelet, PP menunjukkan pelet ditambah suplemen probiotik dan PA merupakan pelet dan *A. pinnata*. G Menunjukkan Protein Larut dalam Larutan Garam 4% dan F Menunjukkan Fraksi.

Protein yang terkandung pada ikan patin dengan pakan pelet saja (kontrol) memiliki beberapa jenis protein berdasarkan berat molekulnya. Protein larut air fraksi 1 memiliki jenis protein dengan berat molekul 47 kDa dan 40,31 kDa sedangkan untuk fraksi 2 terdapat jenis protein dengan berat molekul 124,38; 109,43; 54,81; 50,75 dan 47 kDa. Jenis protein berdasarkan berat molekul pada fraksi 3 hanya ada satu yaitu 47 kDa, sedangkan pada fraksi 4 terdapat dua jenis protein yang memiliki berat molekul sebesar 47 kDa dan 39 kDa. Untuk protein larut dalam larutan garam 4%, pita elektroforegram pada fraksi 1 tidak tampak karena konsentrasinya terlalu kecil. Sedangkan untuk fraksi 2 dan 3 masing-masing memiliki jenis protein yang berat molekulnya 127,61; 112,27; 74,53; 53,42; 41,35 kDa dan 127,61; 112,27; 53,42; 41,35 kDa (Lampiran E.3).

Protein yang diberi pakan pelet dan suplemen probiotik memiliki jenis protein larut air dengan berat molekul 49,25; 44,1 dan 37,37 kDa untuk fraksi 1. Fraksi 2 memiliki jenis-jenis protein yang berat molekulnya 133,05; 87,94; 50,63; 39,49; 19,26 dan 15,03 kDa. Fraksi 3 terdapat jenis-jenis protein dengan berat molekul sebesar 119,14; 87,94; 46,61 dan 39,49 kDa, sedangkan untuk fraksi 4 tidak muncul pita protein yang disebabkan oleh konsentrasi proteinnya terlalu kecil. Protein larut garam fraksi 1 tidak muncul pita protein yang disebabkan karena konsentrasinya yang terlalu rendah, sedangkan untuk fraksi 2, jenis-jenis proteinnya memiliki berat molekul sebesar 129,47; 112,74; 87,94; 78,74; 74,52; 49,25; 38,42; 34,4 dan 17,25 kDa. Untuk protein pada fraksi 3 memiliki berat molekul sebesar 83,21; 46,61 dan 38,42 kDa (Lampiran E.4).

Jenis-jenis protein yang terdapat pada ikan dengan pakan pelet dan *Azolla pinnata* berbeda. Protein larut air fraksi 1 memiliki 4 jenis protein yang memiliki berat molekul sebesar 79,42; 59,3; 55,93 dan 41,76 kDa. Protein pada fraksi 2 memiliki berat molekul sebesar 79,42; 55,93; 40,56 dan 32,1 kD sedangkan untuk fraksi 3 protein yang diisolasi memiliki berat molekul sebesar 54,32; 43,0 dan 37,15 kDa, tetapi pada fraksi 4 tidak tampak pita protein. Hal tersebut disebabkan oleh kecilnya konsentrasi protein yang diisolasi. Protein larut garam fraksi 1 memiliki 3 jenis protein dengan berat molekul sebesar 52,76; 48,33 dan 38,26 kDa sedangkan pada fraksi 3 dan 4 memiliki protein dengan berat molekul berturut-turut sebesar 119,55; 86,7; 66,65; 57,59; 49,76; 46,94; 41,76; 28,56; 24,0; 13,36 kDa dan 119,55; 81,77; 72,75; 57,59; 49,76; 46,94; 41,76; 32,1; 26,17; 15,46 kDa (Lampiran E.5).

Jenis-jenis protein berdasarkan berat molekul yang didapatkan, sebagian besar berbeda antar variasi pakan, hal tersebut disebabkan oleh pakan tambahan yang memberikan kontribusi protein yang berbeda-beda. Namun ada beberapa protein memiliki berat molekul yang hampir sama. Misalnya untuk protein larut air, ikan yang mengkonsumsi pelet saja (kontrol) memiliki protein dengan berat molekul sebesar 39,29 kDa pada fraksi 4, dan ikan yang diberi suplemen probiotik pada pakannya memiliki berat molekul 39,49 kDa pada fraksi 3 sedangkan ikan yang

diberi pakan tambahan *A. pinnata* memiliki berat molekul sebesar 37.15 kDa pada fraksi 3. Untuk protein larut dalam larutan garam 4% juga memiliki berat molekul yang hampir sama antar variasi pakan. Ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) memiliki protein dengan berat molekul sebesar 74,53 kDa, untuk ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik memiliki protein yang berat molekulnya sebesar 74,52 kDa sedangkan ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata* memiliki protein dengan berat molekul sebesar 72,75 kDa. Perbedaan berat molekul tersebut tidak terlalu jauh, jadi kemungkinan jenis proteinnya sama.

Berdasarkan beberapa literatur, protein ikan patin (*P. djambal*) memiliki kandungan jenis protein mioglobin, G-aktin dan albumin (Xiong, 2000). G-aktin yang jika dikonsumsi berfungsi untuk kontraksi otot, membantu proses penyembuhan luka-luka, pembangun tulang, dan kulit. Protein mioglobin, G-aktin dan albumin masing-masing memiliki berat molekul sekitar 17; 43 dan 64,5 kDa. Jadi pada penelitian ini untuk beberapa jenis protein yang terdapat pada ikan patin dapat terekstrak yang didasarkan pada kemiripan berat molekul literatur dan hasil penelitian, misalnya berat molekul protein aktin menurut literatur sebesar 43 kDa. Faktanya, pada ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol), ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik dan ikan yang diberi pakan tambahan *A. pinnata* masing-masing didapatkan protein larut garam sebesar 45,81; 46,61 dan 46,94 kDa, pita protein mioglobin menunjukkan berat molekul sebesar 17,25 kDa pada ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik dan 15,46 kDa pada ikan yang diberi pakan pelet dengan pakan tambahan *A. pinnata*, sedangkan protein albumin ditemukan pada elektroforegram protein ikan yang diberi pakan pelet dan pakan tambahan *A. pinnata* yang memiliki berat molekul sebesar 64,73 kDa. Selain itu, berdasarkan literatur enzim katalase, enzim *glutamate dehydrogenase* dan enzim *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase* masing-masing memiliki berat molekul sebesar 118 kDa; 53 dan 36 kDa, sedangkan pada penelitian ini ditemukan protein yang memiliki berat molekul yang hampir sama dengan berat molekul enzim katalase, *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase* dan enzim *glutamate dehydrogenase*. Misalnya pada



elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet (kontrol) muncul pita dengan berat molekul sebesar 112,27 kDa, elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik memiliki berat molekul sebesar 112,74 kDa, sedangkan elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet dan pakan tambahan *A. pinnata* memiliki berat molekul sebesar 119,55 kDa, jadi dimungkinkan protein tersebut merupakan enzim katalase. Untuk elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet (kontrol) muncul pita dengan berat molekul sebesar 53,42 kDa, elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik memiliki berat molekul sebesar 50,63 kDa, sedangkan elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet dan pakan tambahan *A. pinnata* memiliki berat molekul sebesar 54,32 kDa, jadi dimungkinkan protein tersebut merupakan enzim *glutamate dehydrogenase* yang memiliki berat molekul sebesar 53 kDa. Elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet (kontrol) muncul pita dengan berat molekul sebesar 39,29 kDa, elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik memiliki berat molekul sebesar 39,49 kDa, sedangkan elektroforegram ikan yang diberi pakan pelet dan pakan tambahan *A. pinnata* memiliki berat molekul sebesar 37,15 kDa, jadi dimungkinkan protein tersebut merupakan enzim *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase* yang memiliki berat molekul sebesar 36 kDa.

## BAB V. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Suplemen probiotik yang ditambahkan pada pelet menambah kadar protein terlarut ikan, sebaliknya pakan tambahan *Azolla pinnata* menurunkan kadar protein terlarut yang terkandung pada daging ikan.
2. Protein larut air pada ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) memiliki 8 jenis dengan kisaran 39,29-124,38 kDa, 12 jenis protein dengan kisaran 15,03-133,05 kDa pada ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik, dan ikan yang diberi pakan tambahan *Azolla pinnata* memiliki 10 jenis protein dengan kisaran 32,10-79,42 kDa. Untuk jenis protein larut dalam larutan garam 4%, ikan yang diberi pakan pelet saja (kontrol) memiliki 8 jenis dengan kisaran 24,15-127,61 kDa, ikan yang diberi pakan pelet dengan suplemen probiotik memiliki 11 jenis dengan kisaran 17,25-129,47 kDa, dan 18 jenis protein dengan kisaran 13,36-119,55 kDa yang terkandung pada ikan yang diberi pakan tambahan *Azolla pinnata*.

### 5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengekstrak protein yang tidak larut dalam air dan tidak larut dalam larutan garam 4%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2012. *Budidaya Ikan Patin*.  
<http://www.ipitek.net.id/ind/warintek/?mnu=6&ttg=3&doc=3a7.html> [20 April 2012].
- Anonim. 2012. *Coomassie Brilliant Blue G-250 [for Electrophoresis]*.  
<http://www.tcieurope.eu/en/catalog/B3193.html> [20 April 2012].
- Bama P., Vijayalakshimi M., Jayasimman R., Kalaichelvan P.T., Deccaraman M., and Sankaranarayanan S. 2010. Extraction of Collagen From Cat Fish By Pepsin Digestion and Preparation and Characterization of Collagen Chitosan Sheet. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 2, Issue 4.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., dan Stryer L. 1975. *Biochemistry*. Fifth Edition. Germany : W.H. Freeman and Company.
- Bradford, M.M. 1976. A Rappid and Sensitive Methode for Quantitation of Protein Utilization. The principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Cho, C.Y., C.B. Cowey, dan R.Watanabe. 1985. *Finfish Nutrition in Asia*. Ottawa : Methodological approaches researc Centre.
- Christiyanto, M. Agus Subrata. 2005. Perlakuan fisik dan Biologis Pada Limbah Industri Pertanian Terhadap Serat Kasar. *Laporan kegiatan*. Semarang : Pusat Studi Agribisnis dan Agroindustri Universitas Diponegoro.
- Dyer, W.J., H.V. French dan J.M. Snow. 1949. Protein in Fish Muscle I. Extraction of Protein Fractinations in Fresh Fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 7(10) : 38-43.
- Hadiwiyoto. 1993. *Teknologi Hasil Perikanan*. Yogayakarta : Liberty.

- Hagel, L. 1998. *Current Protocols in Protein Science*. New York : John Willey & Sons Inc.
- Hamoir, J. 1995. Contribution to The Study of The Muscle Protein of Fish. Research on The Striated Muscle of The Carp. *Arch. Physical Biochem.* 63, Part 4. Suppl. 152.
- Handajani, S.N. 2007. Kandungan Protein Kecap Manis Tanpa Fermentasi Moromi Hasil Fermentasi *Rhizopus oryzae* dan *R. Oligosporus*. *Jurnal Biodiversitas* 8(2):223-227.
- Hustiany, R. 2005. Karakterisasi Produk Olahan Kerupuk dan Surimi Dari Daging Ikan Patin Hasil Budidaya Sebagai Sumber Protein Hewani. *Jurnal Media Gizi dan Keluarga* 29(2):66-74.
- Irianto, A. 2007. *Potensi Mikroorganisma : Di Atas Langit Ada Langit*. Ringkasan Orasi Ilmiah di Fakultas Biologi Universitas Jenderal Sudirman.
- Khan, M.M. 1998. *A Primer on Azolla Production & Utilization in Agriculture*. Institute of Biological Sciences of the University of the Philippines.
- Khatun, A., M.A. Ali dan J.G. Dingle. 1999. Comparison of the nutritive value for laying hens of diets containing atolls (*Azolla pinnata*) based on formulation using digestible amino acid versus total protein and total amino acid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 81 : 43-56.
- Kompiang, I.P. 2000. Pengaruh Suplementasi Kultur *Bacillus spp.* Melalui Pakan Atau Air Minum Terhadap Kinerja Ayam Petelur. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5(4) : 205-209.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lehninger, A.L. 1975. *Biochemistry*. New York: Worth Publisher, INC.

- Miller, R and HS Groninger. 1976. Functional properties of enzyme modified acylated fish protein derivates. *J. Food Science* 41:268-272.
- Murray, R.K, Granner, D.K, Mayes, P.A, Rodwell, V.W. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. London:The McGraw-Hill Companies.
- Nakai, S. dan Modler H.W. 1999. *Foods Proteins, Processing Aplication*. London:Wiley-VCH.
- Novax, A.F., R.M. Rao dan D.A. Smith. 1977. Fish Protein. Dalam H.D. Graham (ed.). *Food Colloids*. The AVI Publ. Co. Inc., Westport, Connecticut.
- Pearson, W.E. 1989. *The Nutrition of Fish*. Switzerland : F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd.
- Saanin, H. 1984. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan*. Jakarta : Bina Cipta.
- Singh, Y. K. 2006. *Fundamental of Research Methodology and Statistics*. New Delhi: New Age International (P) Limited, Publisher.
- Soedarmadji, S. 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Edisi Pertama. Yogyakarta : Liberty.
- Subagja Y. 2009. *Fortifikasi ikan patin pada snack ekstrusi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan : Institut Pertanian Bogor.
- Sudarmaji, S. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta : Liberty.
- Sukmawati. 2006. *Pertumbuhan dan Sintasan Ikan Bandeng (Chanos chanos Forsskal) pada Berbagai Kadar Karbohidrat-Protein Pakan yang di Inokulasikan dengan Carnobacterium sp*. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin : Makassar.

- Sumitro, S.B., Fatchiyah, Rahayu, Widyarti dan Arumningtyas. 1996. *Kursus Teknik-Teknik Dasar Analisis Protein dan DNA*. Jurusan Biologi FMIPA Malang : Universitas Brawijaya.
- Suzuki, T. 1981. *Fish and Krill Protein*. London : Applied Science Publisher Ltd.
- Sriharti. 1992. Pakan Ikan dalam Laporan Pelaksanaan Pelatihan Kewiraswastaan bagi PNS yang memasuki MPP, Kerjasama LIPI dan Pemda Tingkat I Jawa Barat, Balai Pengembangan Teknologi Tepat Guna, Pusat Penelitian dan Pengembangan Fisika Terapan-LIPI : Subang.
- Weber, H.H. dan K. Meyer. 1933. Colloidal Behavior of Muscle Protein V. Quantitative Relationships Between and Its Significance for The Structure of Striated Rabbit Muscle. *J. Biochem.*, 266:137-152.
- Whitten, T. 1996. Freshwater Biodiversity in Asia with Special Reference to Fish. World Bank Technical Paper No.343, Washington, 59 pp.
- Wilson, K., dan Walker, J.M. 1994. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Ed 4. Cambridge : Cambridge University Pr.
- Winarno, F.G. 1998. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Xiong, Y.L. 2000. Meat Processing. Di dalam Nakai, S. dan H.W. Modler (Eds.). Food Protein. Processing Applications. New York: Wiley VCH.

## LAMPIRAN A. PEMBUATAN LARUTAN

### 1. NaCl 4%

Sebanyak 40 gram NaCl dilarutkan dalam 200 mL akuades. Kemudian ditambah akuades hingga volumenya 1L.

### 2. 0,05 M Buffer Tris HCl pH 7

Sebanyak 0,61 gram tri (hidroksimetil) aminometana dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 100 mL (A). 50 mL larutan A, ditambahkan dengan 48,6 mL 0,05 M HCl.

### 3. Akrilamida 30%

Sebanyak 29,2 gram akrilamida dan 0,8 gram bis-akrilamida dilarutkan dengan akuades steril sampai volume 100 mL.

### 4. Lower Gel Buffer pH 8,8 (Tri(hidroksimetil)aminometana)

Sebanyak 18,165 gram tri (hidroksimetil) aminometana dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 100 mL (A). 50 mL larutan A, ditambahkan dengan 8,1 mL 1,5 M HCl.

### 5. Upper Gel Buffer pH 6,8 (Tri(hidroksimetil)aminometana)

Sebanyak 6,055 gram tri (hidroksimetil) aminometana dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 100 mL (A). 50 mL larutan A, ditambahkan dengan 50,4 mL 0,5 M HCl.

### 6. SDS 10%

Sebanyak 10 gram SDS dilarutkan dalam 60 mL akuades. Setelah homogen, ditambahkan akuades hingga volumenya 100 mL

### 7. APS 10%

Sebanyak 1 gram APS dilarutkan dengan akuades hingga volumenya 10 mL

### 8. Buffer Elektroda SDS-PAGE

Sebanyak 3 gram (hidroksimetil) aminometana ditambah dengan 14,4 glisin dan 1 gram SDS, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volumenya 1000 mL.

**9. Buffer Loading / Loading Dye/ RSB**

Sebanyak 12,5 mL tris-HCl pH 6,8 ditambahkan dengan 20 mL gliserol 10%, 40 mL SDS 10%, 5 mL  $\beta$ -merkaptoetanol dan 2 mL 0,1% *bromophenol blue*, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volumenya 100 mL.

**10. Larutan Staining**

Sebanyak 0,25 gram CBB, ditambahkan dengan 25 ml asam asetat 10% dan 100 mL metanol 40%. Setelah itu, ditambah dengan akuades sampai volume 250 mL.

**11. Larutan Destaining**

Sebanyak 25 ml asam asetat 10% dan 100 mL metanol 40%. Setelah itu, ditambah dengan akuades sampai volume 250 mL.

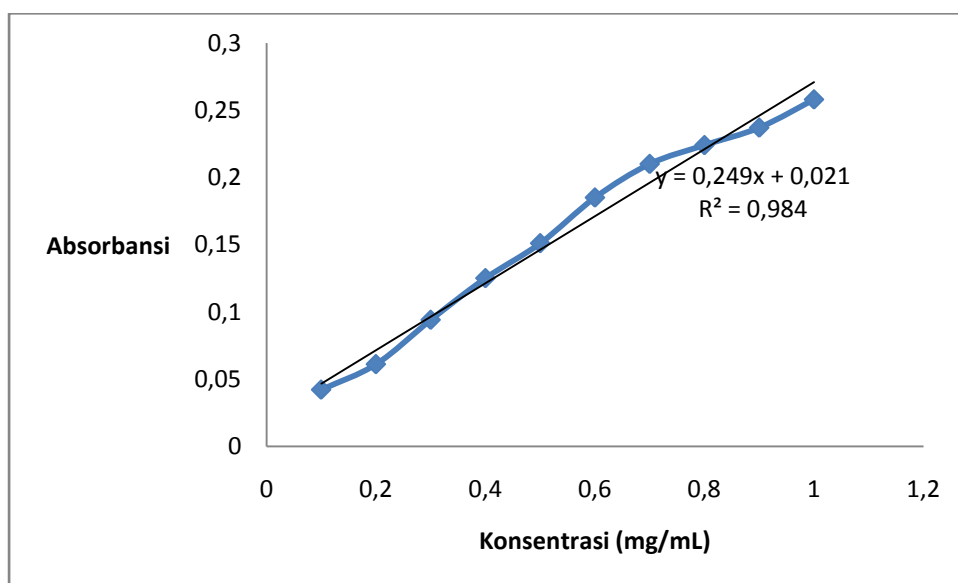


**LAMPIRAN B. BERAT BADAN IKAN**

Waktu	Berat badan (gram)			Rata-rata	Standar Deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
<i>Pelet</i>					
0 bulan	0.05	0.1	0.05	0.07	2.4E-02
2 bulan	110	115	115	113.33	2.36
3 bulan	120	125	125	123.33	2.36
4 bulan	150	145	150	148.33	2.36
5 bulan	215	215	210	213.33	2.36
7 bulan	315	315	320	316.67	2.36
<i>Probiotik</i>					
0 bulan	0.05	0.05	0.05	0.05	6.9E-18
2 bulan	110	110	120	113.33	4.71
3 bulan	130	135	135	133.33	2.36
4 bulan	170	165	170	168.33	2.36
5 bulan	230	235	230	231.67	2.36
7 bulan	350	350	345	348.33	2.36
<i>Azolla pinnata</i>					
0 bulan	0.05	0.05	0.05	0.05	6.9E-18
2 bulan	100	100	105	101.67	2.36
3 bulan	110	120	115	115	4.08
4 bulan	140	145	145	143.33	2.36
5 bulan	200	200	215	205	7.07
7 bulan	300	310	300	303.33	4.71

**LAMPIRAN C. KURVA STANDAR BSA**

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
0.1	0.042
0.2	0.061
0.3	0.094
0.4	0.125
0.5	0.151
0.6	0.185
0.7	0.21
0.8	0.224
0.9	0.237
1	0.258



## LAMPIRAN D. KADAR PROTEIN IKAN PATIN

### D.1 Absorbansi Protein Larut Air

Sampel	Absorbansi			Rata-rata	Standar Deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Pelet					
Fraksi 1	0,124	0,123	0,125	0,124	0,001
Fraksi 2	0,191	0,190	0,191	0,191	0,000
Fraksi 3	0,151	0,151	0,150	0,151	0,000
Fraksi 4	0,063	0,062	0,063	0,063	0,000
Fraksi 5	0,020	0,020	0,021	0,020	0,000
Pelet + Probiotik					
Fraksi 1	0,146	0,146	0,148	0,147	0,001
Fraksi 2	0,205	0,205	0,204	0,205	0,000
Fraksi 3	0,204	0,203	0,205	0,204	0,001
Fraksi 4	0,094	0,093	0,094	0,094	0,000
Fraksi 5	0,021	0,021	0,021	0,021	0,000
Pelet + <i>Azolla pinnata</i>					
Fraksi 1	0,086	0,087	0,086	0,086	0,000
Fraksi 2	0,171	0,170	0,173	0,171	0,001
Fraksi 3	0,079	0,080	0,079	0,079	0,000
Fraksi 4	0,029	0,031	0,030	0,030	0,001
Fraksi 5	0,019	0,019	0,018	0,019	0,000

## D.2 Kadar Protein Larut Air

Sampel	Konsentrasi (mg/mL)			Rata-rata	Standar Deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
<b>Pelet</b>					
Fraksi 1	0,414	0,410	0,419	0,414	0,004
Fraksi 2	0,683	0,680	0,684	0,682	0,002
Fraksi 3	0,522	0,524	0,519	0,522	0,002
Fraksi 4	0,169	0,166	0,170	0,168	0,002
Fraksi 5	-0,003	-0,006	-0,002	-0,004	0,002
Total	1,788	1,780	1,792	1,787	0,005
<b>Pelet + Probiotik</b>					
Fraksi 1	0,502	0,500	0,510	0,504	0,004
Fraksi 2	0,739	0,740	0,735	0,738	0,002
Fraksi 3	0,735	0,732	0,738	0,735	0,002
Fraksi 4	0,293	0,290	0,295	0,293	0,002
Fraksi 5	-0,001	-0,002	-0,001	-0,001	0,000
Total	2,269	2,262	2,278	2,270	0,007
<b>Pelet + <i>Azolla pinnata</i></b>					
Fraksi 1	0,261	0,265	0,260	0,262	0,002
Fraksi 2	0,602	0,600	0,610	0,604	0,004
Fraksi 3	0,233	0,237	0,231	0,234	0,002
Fraksi 4	0,032	0,040	0,037	0,036	0,003
Fraksi 5	-0,010	-0,009	-0,011	-0,010	0,001
Total	1,128	1,142	1,138	1,136	0,006

### D.3 Absorbansi Protein Larut Dalam Larutan Garam 4%

Sampel	Absorbansi			Rata-rata	Standar Deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Pelet					
Fraksi 1	0,142	0,143	0,143	0,143	0,000
Fraksi 2	0,207	0,208	0,208	0,208	0,000
Fraksi 3	0,129	0,128	0,129	0,129	0,000
Fraksi 4	-0,002	-0,004	-0,010	-0,005	0,003
Pelet + Probiotik					
Fraksi 1	0,157	0,158	0,156	0,157	0,001
Fraksi 2	0,215	0,238	0,214	0,222	0,011
Fraksi 3	0,185	0,185	0,186	0,185	0,000
Fraksi 4	0,004	0,006	0,001	0,004	0,002
Pelet + <i>Azolla pinnata</i>					
Fraksi 1	0,143	0,144	0,143	0,143	0,000
Fraksi 2	0,195	0,195	0,196	0,195	0,000
Fraksi 3	0,151	0,151	0,151	0,151	0,000
Fraksi 4	-0,012	-0,010	-0,014	-0,012	0,002

#### D.4 Kadar Protein Larut Dalam Larutan Garam 4%

Sampel	Absorbansi			Rata-rata	Standar Deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Pelet					
Fraksi 1	0,486	0,488	0,491	0,488	0,002
Fraksi 2	0,747	0,750	0,749	0,749	0,001
Fraksi 3	0,434	0,431	0,435	0,433	0,002
Fraksi 4	-0,092	-0,100	-0,124	-0,105	0,014
Total	1,667	1,669	1,675	1,670	0,003
Pelet + Probiotik					
Fraksi 1	0,546	0,549	0,543	0,546	0,002
Fraksi 2	0,779	0,870	0,776	0,808	0,044
Fraksi 3	0,659	0,660	0,663	0,661	0,002
Fraksi 4	-0,068	-0,060	-0,080	-0,069	0,008
Total	1,984	2,079	1,982	2,015	0,045
Pelet + <i>Azolla pinnata</i>					
Fraksi 1	0,490	0,493	0,489	0,491	0,002
Fraksi 2	0,699	0,697	0,703	0,700	0,002
Fraksi 3	0,522	0,522	0,524	0,523	0,001
Fraksi 4	-0,133	-0,124	-0,141	-0,133	0,007
Total	1,711	1,712	1,716	1,713	0,002

### D.5 Kadar Protein Daging Ikan Patin

Sampel	Kadar Protein Daging Ikan Patin (mg/mL)					
	P.1	P.2	P.3	Rata-rata	Standar Deviasi	Persentase (%)
Larut Dalam Air						
Pelet	<sup>A</sup> 2682,000	2670,000	2688,000	2680,000	7,483	<sup>X</sup> 13,400
Pelet + Probiotik	3403,500	3393,000	3417,000	3404,500	9,823	17,023
Pelet + <i>Azolla pinnata</i>	1692,000	1713,000	1707,000	1704,000	8,832	8,520
Larut Dalam Larutan Garam 4%						
Pelet	<sup>G</sup> 2187,938	2190,563	2198,438	2192,313	4,462	10,962
Pelet + Probiotik	2604,000	2610,563	2601,375	2605,313	3,864	13,027
Pelet + <i>Azolla pinnata</i>	2114,438	2115,750	2121,000	2117,063	2,835	10,585

Perhitungan kadar protein daging ikan patin

Protein larut air

$$\text{Kadar protein daging ikan} = A * B * C$$

Keterangan :

A = Kadar protein total fraksi

$$B = \text{Faktor pengenceran isolat} = \frac{\text{Jumlah volume isolat (20 mL)}}{\text{jumlah sampel ekstrak untuk isolasi (2 mL)}} = 10$$

$$C = \text{Faktor perkalian isolat} = \frac{\text{Jumlah volume ekstrak (300 mL)}}{\text{jumlah sampel ekstrak untuk isolasi (2 mL)}} = 150$$

$$^A\text{Kadar protein daging ikan} = A * B * C$$

$$= 1,788 * 10 * 150$$

$$= 2682,00 \text{ mg}$$

$$^x\% \text{ protein daging dalam sampel} = \frac{\text{Kadar protein daging ikan}}{\text{sampel daging}} * 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ protein daging dalam sampel} &= \frac{2,682 \text{ gram}}{20 \text{ gram}} * 100\% \\ &= 13,4 \% \end{aligned}$$

Protein larut dalam larutan garam 4%

$$\text{Kadar protein daging ikan} = A * B * C$$

Keterangan :

A = Kadar protein total fraksi

$$B = \text{Faktor pengenceran isolat} = \frac{\text{Jumlah volume isolat (15 mL)}}{\text{Jumlah sampel ekstrak untuk isolasi (2 mL)}} = 7,5$$

$$C = \text{Faktor perkalian isolat} = \frac{\text{Jumlah volume ekstrak (350 mL)}}{\text{Jumlah sampel ekstrak untuk isolasi (2 mL)}} = 175$$

$$^G \text{ Kadar protein daging ikan} = A * B * C$$

$$= 1,667 * 7,5 * 175$$

$$= 2187,938 \text{ mg}$$

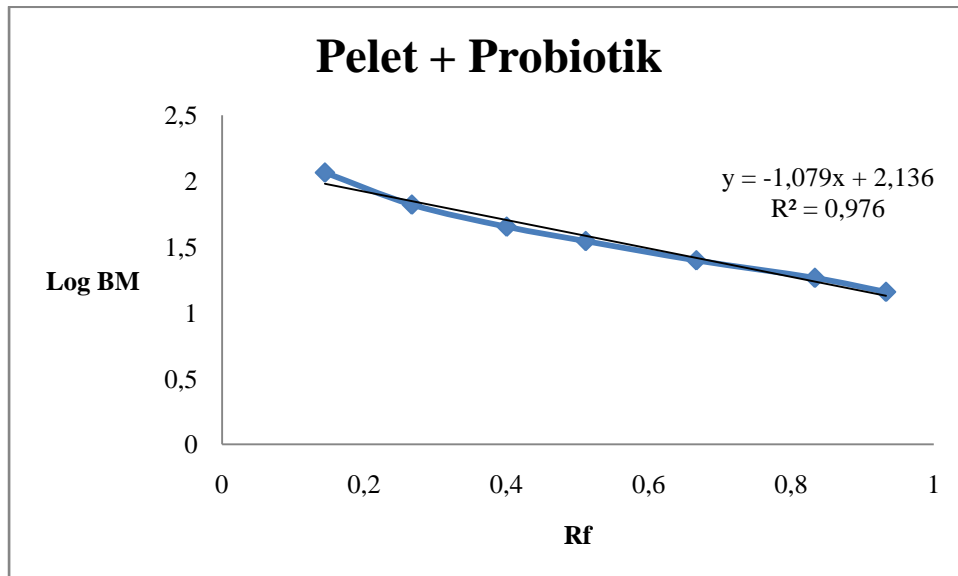
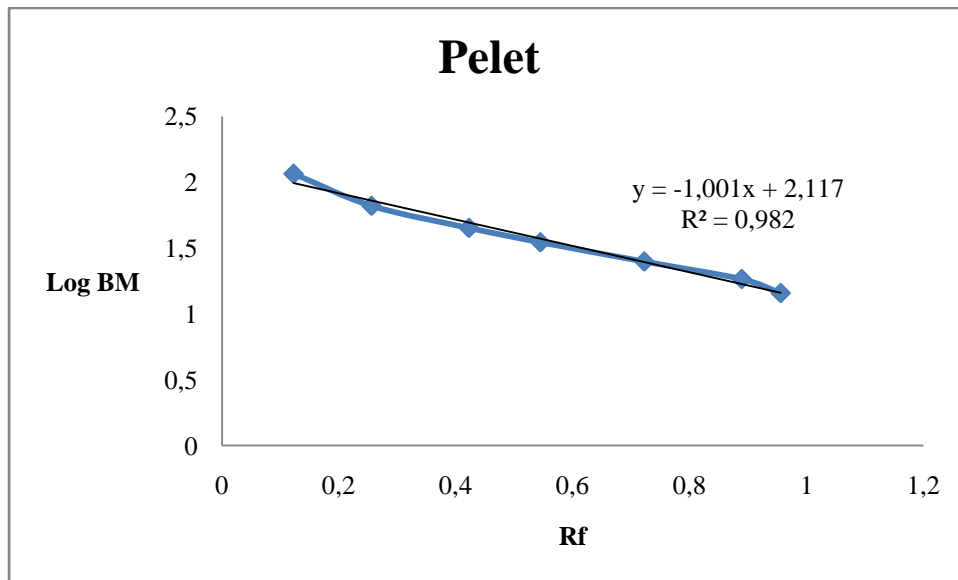


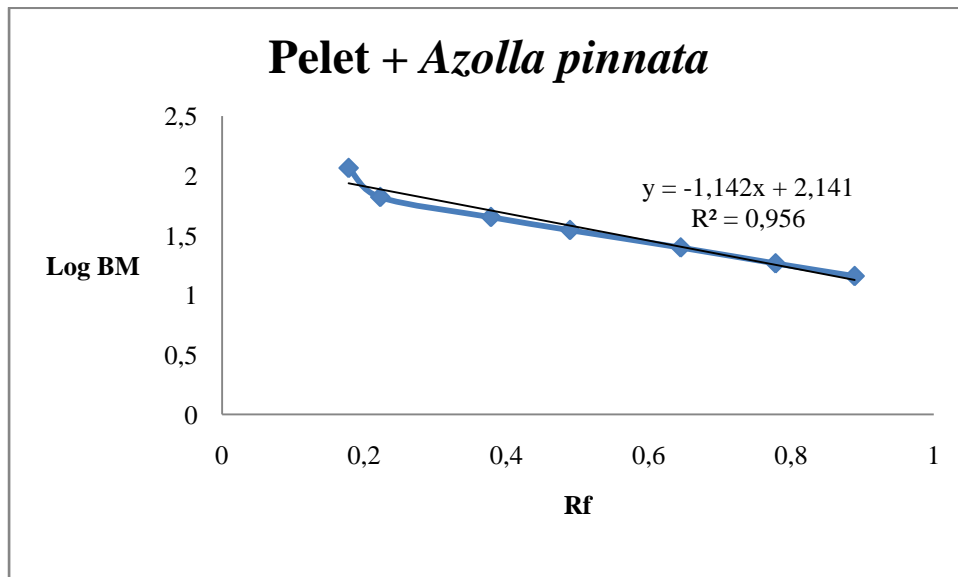
## LAMPIRAN E. BERAT MOLEKUL PROTEIN

### E.1 Berat Molekul Relatif Protein Marker

Berat Molekul Marker (kDa)	Log Berat Molekul	Migrasi (mm)	<i>R<sub>f</sub></i>
<b>A. Pelet</b>			
116	2.06	11	0.12
66.2	1.82	23	0.26
45	1.65	38	0.42
35	1.54	49	0.54
25	1.40	65	0.72
18.4	1.26	80	0.89
14.4	1.16	86	0.96
<b>B. Probiotik</b>			
116	2.06	13	0.14
66.2	1.82	24	0.27
45	1.65	36	0.40
35	1.54	46	0.51
25	1.40	60	0.67
18.4	1.26	75	0.83
14.4	1.16	84	0.93
<b>C. <i>Azolla pinnata</i></b>			
116	2.06	16	0.18
66.2	1.82	20	0.22
45	1.65	34	0.38
35	1.54	44	0.49
25	1.40	58	0.64
18.4	1.26	70	0.78
14.4	1.16	80	0.89

## E.2 Persamaan Log Berat Molekul Marker Protein





**E.3 Berat Molekul Relatif Protein Ikan (Pelet) Berdasarkan Nilai  $R_f$  yang berbeda dengan persamaan log berat molekul =  $-1,001x + 2,117$**

Sampel	Migrasi (mm)	$R_f$	Log Berat Molekul	Berat Molekul
<b>Pelet L.A</b>				
Fraksi 1	40	0.44	1.67	47
	46	0.51	1.61	40.31
Fraksi 2	2	0.02	2.09	124.38
	7	0.08	2.04	109.43
	34	0.38	1.74	54.81
	37	0.41	1.71	50.75
	40	0.44	1.67	47
Fraksi 3	40	0.44	1.67	47
	40	0.44	1.67	47
Fraksi 4	35	0.39	1.73	53.42
	40	0.44	1.67	47
	47	0.52	1.59	39.29
<b>Pelet L.G</b>				
Fraksi 2	1	0.01	2.11	127.61
	6	0.07	2.05	112.27
	22	0.24	1.87	74.53
	31	0.34	1.77	59.18
	35	0.39	1.73	53.42
	41	0.46	1.66	45.81
	45	0.50	1.62	41.35
	66	0.73	1.38	24.15
Fraksi 3	6	0.07	2.05	112.27
	41	0.46	1.66	45.81
	45	0.50	1.62	41.35

**E.4 Berat Molekul Relatif Protein Ikan (Pelet + Probiotik) Berdasarkan Nilai  $R_f$  yang berbeda dengan persamaan log berat molekul =  $-1,0792x + 2,1367$**

Sampel	Migrasi (mm)	$R_f$	Log Berat Molekul	Berat Molekul
<b>Probiotik L.A</b>				
Fraksi 1	37	0.41	1.69	49.25
	41	0.46	1.64	44.1
	47	0.52	1.57	37.37
Fraksi 2	1	0.01	2.12	133.05
	16	0.18	1.94	87.94
	36	0.40	1.70	50.63
	45	0.50	1.60	39.49
	71	0.79	1.28	19.26
	80	0.89	1.18	15.03
Fraksi 3	5	0.06	2.08	119.14
	39	0.43	1.67	46.61
	45	0.50	1.60	39.49
<b>Probiotik L.G</b>				
Fraksi 2	2	0.02	2.11	129.47
	7	0.08	2.05	112.74
	16	0.18	1.94	87.94
	20	0.22	1.90	78.74
	22	0.24	1.87	74.52
	37	0.41	1.69	49.25
	46	0.51	1.58	38.42
	50	0.56	1.54	34.4
Fraksi 3	75	0.83	1.24	17.25
	18	0.20	1.92	83.21
	39	0.43	1.67	46.61
	46	0.51	1.58	38.42

**E.5 Berat Molekul Relatif Protein Ikan (Pelet + *Azolla pinnata*) Berdasarkan Nilai  $R_f$  yang berbeda dengan persamaan log berat molekul =  $-1,1422x + 2,1415$**

Sampel	Migrasi (mm)	$R_f$	Log Berat Molekul	Berat Molekul
<i>Azolla pinnata</i> L.A				
Fraksi 1	19	0.21	1.90	79.42
	29	0.32	1.77	59.3
	31	0.34	1.75	55.93
	41	0.46	1.62	41.76
Fraksi 2	19	0.21	1.90	79.42
	31	0.34	1.75	55.93
	42	0.47	1.61	40.56
	50	0.56	1.51	32.1
Fraksi 3	26	0.29	1.81	64.73
	32	0.36	1.73	54.32
	40	0.44	1.63	43
	45	0.50	1.57	37.15
<i>Azolla pinnata</i> L.G				
Fraksi 1	33	0.37	1.72	52.76
	36	0.40	1.68	48.33
	44	0.49	1.58	38.26
Fraksi 2	5	0.06	2.08	119.55
	16	0.18	1.94	86.7
	25	0.28	1.82	66.65
	30	0.33	1.76	57.59
	35	0.39	1.70	49.76
	37	0.41	1.67	46.94
	41	0.46	1.62	41.76
	54	0.60	1.46	28.56
	60	0.67	1.38	24
	80	0.89	1.13	13.36

## Fraksi 3

5	0.06	2.08	119.55
18	0.20	1.91	81.77
22	0.24	1.86	72.75
30	0.33	1.76	57.59
35	0.39	1.70	49.76
37	0.41	1.67	46.94
41	0.46	1.62	41.76
50	0.56	1.51	32.1
57	0.63	1.42	26.17
75	0.83	1.19	15.46

---

**LAMPIRAN F. SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI****F.1 Surat Keterangan Identifikasi *Azolla pinnata*****HERBARIUM JEMBERIENSE (JR)  
JURUSAN BIOLOGI-FMIPA UNIVERSITAS JEMBER  
JEMBER, INDONESIA****SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh :

Nama/NIM : Meirinda Hermiastuti /081810301047  
Jur./Fak./PT : Kimia/FMIPA/Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut adalah :



1. *Azolla pinnata* R.Br.

( Family – Azollaceae ; Vernacular name – mata lele, kayu apu dadak)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 24 Juli 2012

Ka. Laboratorium,

Dra. Dwi Setyati, MSI  
NIP 196404171991032001



## F.2 Surat Keterangan Identifikasi Ikan Patin (*Pangasius djambal*)



### PEMERINTAH KABUPATEN LUMAJANG DINAS KELAUTAN DAN PERIKANAN

Jln. Jend. A. Yani No. 10 Telp. ( 0334 ) 881720 Fax. (0334) 888980  
L U M A J A N G - 67316

#### SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen hewan yang telah dibeli dari Balai Benih Ikan (BBI) Kabupaten Lumajang :

Nama / NIM : 1. Meirinda Hermiastuti  
2. Alviona Noer Isnani  
3. Dodik Andinata  
4. Novita Rahmawati

Jur. / Fak. / PT : Kimia / FMIPA / Universitas Jember

maka dapat disampaikan bahwa spesimen tersebut adalah :

*Pangasius djambal*

( Family – *Pangasidae* ; Vernacular name – ikan patin )

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 25 Oktober 2012

Kepala  
Balai Benih Ikan - Lumajang

Dedy Wahyu Djatmiko, SPi  
NIP. 19720724 199901 1 001