BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Desain penelitian ini merupakan penelitian eksperimental.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Muhammadiyah Semarang dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta pada tanggal 14 – 21 Mei 2018.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perendaman larutan jeruk nipis *(Citrus aurantifolia)* 10 %, 15 %, dan 20 % selama 5, 10, dan 15 menit.

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah profil protein ikan bandeng *(Chanos-chanos).*

3.4. Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah ikan bandeng yang direndam dengan larutan jeruk nipis konsentrasi 10 % v/v, 15 % v/v dan 20 % v/v selama 5 menit, 10 menit, dan 15 menit. Masing-masing perlakuan sampel dilakukan pengulangan dengan perhitungan rumus.

http://repository.unimus.ac.id

a. Menurut jumlah replikasi (Hanifah, 2006)

(t-1) (r-1) ≥ 15

(9-1) (r-1) ≥15

8 (r-1) ≥15

8r-8 ≥ 15

8r ≥ 15+8

8r ≥ 23

r ≥ 2,875 ~ 3

Keterangan :

t : Perlakuan

r : Replikasi

15 : Faktor nilai derajat kebebasan

Maka banyaknya pengulangan adalah 3 kali

b. Menurut jumlah unit percobaan

N = t x r

= 9 x 3

= 27

Keterangan :

N : Jumlah unit percobaan

t : Perlakuan

r : Replikasi

http://repository.unimus.ac.id

3.5. Definisi Operasional

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dapat didefenisikan sebagai berikut :

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Pengertian
Ikan bandeng	Ikan bandeng adalah salah satu jenis ikan yang hidup di air payau yang memiliki sisik berwarna perak diseluruh permukaan tubuhnya, mempunyai bentuk kepala kecil dibandingkan lebar dan panjang badannya.
Larutan jeruk nipis	Larutan jeruk nipis adalah hasil perasan jeruk nipis yang mengandung asam sitrat dan asam askorbat (Vitamin C). Memiliki ciri-ciri buah berbentuk agak bulat dengan ujungnya sedikit menguncup dan berdiameter 3-6 cm dengan kulit yang cukup tebal, berwarna hijau kekuningan.
Profil protein ikan bandeng	Profil sub-sub unit protein (asam amino) yang menyusun protein ikan bandeng yang diperoleh dengan cara elektorforesis dalam satuan kDa.

3.6. Alat dan Bahan

3.6.1. Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu sarung tangan, pisau, labu ukur, pipet volume, *beaker glass*, timbangan analitik, pot, cawan mortir, *vortex,* tabung *centrifuge, centrifuge, micrtube, blue tip, yellow tip, white tip,* mikropippet, spektrofotometer, chamber elektroforesis, power supply, waterbath, rotator, box plastik, tempat buang cairan biologis, plastik *press* dan kaca *press.*

3.6.2. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu ikan bandeng, jeruk nipis dibuat dalam bentuk larutan, H_2O steril, polyakrilamid 30 %, TEMED, APS 10 %, SDS 10 %, 1,5 M Tris pH 8,8 dan 6,8, staining 0,1 %, *Coomasie Brilliant*

http://repository.unimus.ac.id

Blue (CBB) R-250, destaining, asam asetat glasial 10 %, butanol, alkohol 70 %, running buffer 1x, biorad assay, PBS pH 7,4, sampel buffer, dan marker protein.

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Persiapan dan preparasi sampel ikan bandeng

Langkah awal yaitu pemilihan bahan ikan bandeng. Disiapkan 1 ekor ikan bandeng segar (mata jernih, daging ikan bila ditekan terasa segar). Selanjutnya sisik ikan dibersihkan, insang dan isi perut dibuang lalu dicuci dengan air mengalir agar ikan benar-benr bersih. Ikan yang telah dicuci ditiriskan dalam wadah keranjang plastik. Penirisan ikan dengan cara meletakkan ikan dengan posisi perut menghadap ke bawah agar tidak ada sisa air cucian menggenang di rongga perut.

3.7.2. Preparasi larutan jeruk nipis

Buah jeruk nipis dibersihkan dengan air mengalir, selanjutnya dipotong menjadi dua bagian lalu diperas hingga larutan terpisah dengan kulit buah (100% v/v). Larutan jeruk nipis disaring. Selanjutnya larutan jeruk nipis dibuat konsentrasi 10 % v/v , 15 % v/v dan 20 % v/v dihitung dengan rumus pengenceran. Untuk konsentrasi 10 % v/v dipipet 50 ml larutan jeruk nipis 100 % dimasukkan ke labu ukur 500 ml, ditambahkan aquades steril sampai tanda batas, dihomogenkan. Dilakukan prosedur yang sama untuk pembuatan larutan jeruk nipis konsentrasi 15 % v/v dipipet 75 ml larutan jeruk nipis 100 % dimasukkan ke labu ukur 500 ml, ditambahkan aquades steril sampai tanda batas, lalu dihomogenkan, begitupula dengan konsentrasi 20 % v/v dipipet 100 ml larutan

http://repository.unimus.ac.id

jeruk nipis 100 % dimasukkan ke labu ukur 500 ml, ditambahkan aquades steril sampai tanda batas, dihomogenkan.

3.7.3. Perendaman sampel dengan jeruk nipis

Ikan bandeng yang telah dibersihkan masing-masing ditimbang 10 gram kemudian direndam dalam 40 ml larutan jeruk nipis masing-masing konsentrasi 10 %, 15 %, 20 % serta lama perendaman 5 menit, 10 menit, dan 15 menit tiap konsentrasi.

3.7.4. Pembuatan kurva standar kadar protein

Tabel 4. Campuran BSA (Bovine Serum Albumin) untuk Kurva Standar

Konsentrasi BSA µg/µl	PBS (µl)	BSA (µl)	*Biorad* (µl)
0	800	0	200
0,5	799,5	0,5	200
1,0	799,0	1,0	200
2,0	798,0	2,0	200
3,0	797,0	3,0	200
4,0	796,0	4,0	200
5,0	795,0	5,0	200
6,0	794,0	6,0	200
7,0	793,0	7,0	200
8,0	792,0	8,0	200
9,0	791,0	9,0	200
10	790,0	10	200

Prosedur pembuatan kurva standar protein antara lain :

Mikrotube disiapkan 12 buah lalu didisi dengan PBS dan BSA sesuai tabel 4 diatas lalu dihomogenkan. Ditambahkan *biorad assay* 200 *µl* lalu dihomogenkan. Selanjutnya diinkubasi selama 10 menit lalu dipindahkan ke kuvet. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 595 nm mnggunakan spektrofotometer.

http://repository.unimus.ac.id

Digambarkan kurva standar kadar protein yang diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi pada sumbu *y* dan kadar protein dari masing-masing larutan standar pada sumbu *x*. Dihitung persamaan garis linear kurva standar *y=ax + b* dan diperkirakan Nilai *r*. Semakin teliti mengerjakannya, maka Nilai r yang didapatkan akan mendekati +1 atau 1.

Rumus yang digunakan untuk menghitung persamaan garis linear kurva standar penetapan kadar protein antara lain:

$y = ax + b$ $x = \frac{y-b}{a}$

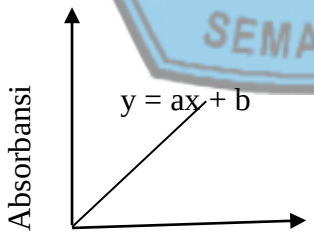
Keterangan:

x = Konsentrasi protein (µg/µl)

y = Absorbansi

a = Konstanta

b = Lereng/Slope



Konsentrasi protein

3.7.5. Pengukuran konsentrasi protein ikan

Sampel ikan bandeng yang telah direndam dengan jeruk nipis dipotong-potong kecil dihaluskan dalam cawan mortir, ditambahkan PBS 1x kemudian dihomogenkan, dimasukkan sampel kedalam mikrotube sebanyak 1500 µl,

http://repository.unimus.ac.id

kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4^{o}C, sampel yang telah disentrifus kemudian diambil supernatannya, supernatan tersebut adalah protein.

Diukur konsentrasi protein menggunakan spektrofotometer, pembuatan blanko 1000 µl menggunakan 800 µl akuades ditambah 200 µl reagen *biorad assay*. Pembuatan 1000 µl sampel menggunakan 2 µl sampel ditambah 798 µl akuades dan 200 µl reagen *biorad assay*. Inkubasi selama 10 menit, lalu dibaca absorbansi pada spektrofotometer dengan λ 595 nm.

3.7.6. Analisis profil protein ikan bandeng metode SDS-PAGE

a. Persiapan sampel

Dibuat stok sepaasi sampel sebanyak 125 µl dengan perbandingan 1:4 (25 µl buffer dan 100 µl sampel) dipipet dan dimasukkan ke dalam microtube. Selanjutnya dipanaskan sampel pada air mendidih selama 2 menit, lalu diangkat sampel dan diletakkan pada es batu.

b. Persiapan *separating gel* dan *stacking gel*

Separating gel 12 % dibuat dengan cara masukkan ke dalam labu erlenmeyer 6 ml Polyacrylamida 30%; 3 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 5,26 ml aquabidest steril; 180 mL SDS 10%; 180 µl APS 10%; 20 µl TEMED. Kemudian larutan dihomogenkan. *Stacking gel* 5 % dibuat dengan cara masukkan ke dalam erlenmeyer 833 µl Polyacrilamida 30%; 630 µl 1,0 M Tris pH 6,8; 3,017 ml aquabidest steril; 250 µl SDS 10%; 20 µl TEMED; 250 µl APS 10%. Selanjutnya separasi protein menggunakan SDS-PAGE menurut metode Laemmli (1970) disiapkan glassplate, sisir dan spaser yang telah

http://repository.unimus.ac.id

dibersihkan menggunakan detergen dan alkohol 70 % untuk pencetak gel. Setelah alat pencetak gel disiapkan, masukkan *separating gel* yang telah dibuat kedalam alat pencetak gel, tunggu hingga polimerisasi. Selanjutnya masukkan *stacking gel* diatas *separating gel* dengan cepat, masukkan sisir diatasnya. Tunggu hingga terjadi polimerisasi. Angkat sisir dari atas *stacking gel* secara perlahan.

c. Proses elektroforesis SDS-PAGE

Plate yang sudah berisi gel dimasukkan ke dalam *chamber elektroforesis*, dimasukkan running buffer kedalamnya sampai bagian atas dan bawah gel terendam, dimasukkan sampel pada sumuran yang telah disediakan 6 µl, dialiri dengan tegangan 100 volt, setelah *bromophenol blue* mencapai dasar *stacking gel* ditambah tegangan menjadi 200 volt. Aliran listrik dimatikan setelah *bromophenol blue* mencapai dasar *separating gel*. Keluarkan gel dari alat pencetak secara perlahan.

d. Pewarnaan Gel dengan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB)

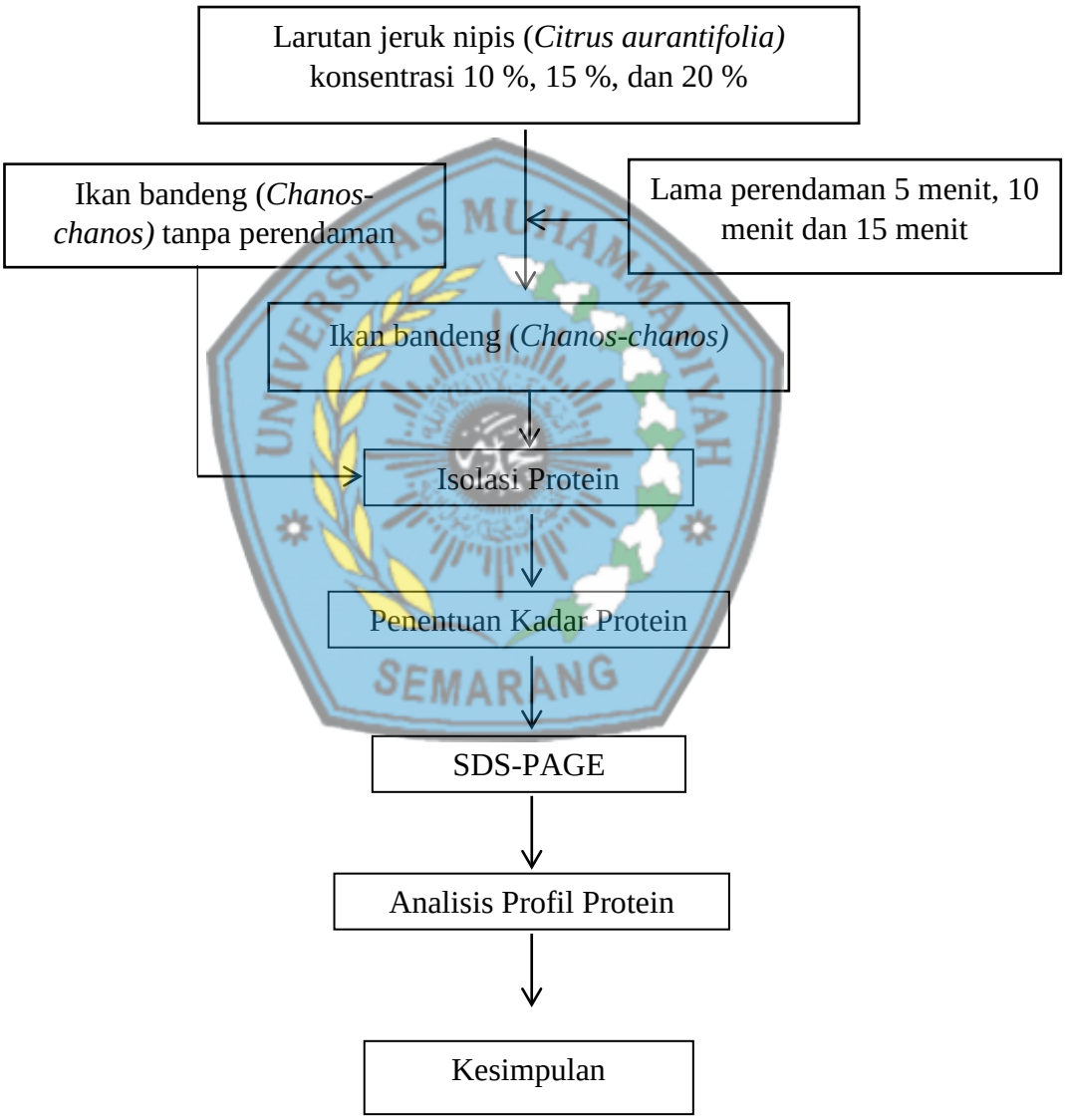
Gel dimasukkan dalam larutan staining, lalu inkubasi sambil digoyang selama kurang lebih 2-3 jam hingga pita protein terwarnai. Selanjutnya untuk menghilangkan warna pada gel yang tidak mengandung protein diberi larutan destaining, larutan destaining diganti 3-4 kali hingga gel tampak bersih. Bila gel sudah jernih, aka pencucian dihentikan dan destaining diganti dengan larutan asam asetat glasial 10 %.

e. Penentuan berat molekul protein

http://repository.unimus.ac.id

Penentuan berat molekul protein yang diinginkan dihitung menggunakan Rf dan diplotkan pada grafik logaritma dari Rf marker protein yang berat molekulnya telah diketahui (Darmawati dkk, 2010).

3.8. Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

3.9. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

http://repository.unimus.ac.id

Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer dan data yang diperolah ditabulasikan kemudian disajikan dalam bentuk narasi deskriptif.

http://repository.unimus.ac.id