

DETEKSI PROTEIN SPESIFIK UNTUK MEMBEDAKAN DAGING BABI DENGAN BERBAGAI MACAM DAGING SPESIES LAIN

Fikri Ardhani, Sigit Eko Prabowo, Afifah Nurul Hidayati, dan Siti Isrina Oktavia Salasia¹

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi protein spesifik daging babi dan mengembangkan antibodi spesifik sebagai bahan deteksi untuk membedakan daging babi dengan daging spesies lain. Isolasi protein daging dilakukan dengan cara sentrifugasi, presipitasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jenuh, dan dialisis dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Protein daging dianalisis dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Protein spesifik diimunisasikan pada mencit galur Balb/c, dan antibodi yang terbentuk diuji dengan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Untuk membedakan daging babi dengan daging spesies lain dilakukan uji aglutinasi dan *immunoblotting* dengan metode *dot blot*. Hasil penelitian dapat diidentifikasi protein spesifik daging babi dengan berat molekul sekitar 17.000 Da, yang tidak ditemukan pada protein daging spesies lain. Hasil uji aglutinasi dan *dot blot* memperlihatkan bahwa reaksi antigen daging babi dengan antibodi spesifik lebih kuat dibandingkan dengan reaksi antigen daging spesies lain.

(Kata kunci: Protein spesifik, Daging babi, Antibodi, Aglutinasi, *Dot blot*)

Buletin Peternakan 31 (1): 22 - 29, 2007

¹Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

DETECTION OF A SPECIFIC PROTEIN TO DIFFERENTIATE BETWEEN PIG MEAT TO OTHER ANIMAL MEATS

ABSTRACT

The aims of the research were to identify a specific protein of pig meat and to develop antibody against this protein as a substance to differentiate pig meat to other animal meats. The proteins of pig meat were prepared by centrifugation of raw meat, precipitation of the protein with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and dialysed in *Phosphate Buffer Saline* (PBS). The meat proteins were analysed by using *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Elektrophoresis* (SDS-PAGE). The specific protein are immunized to balb/c mice, and titer antibodies of the mice were measured by *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). To differentiate the pig meat to other animal meats agglutination test and immunoblotting by using dot-blot method were used. The results showed that the specific protein of pig meat could be indentified with a molecular weight of about 17.0000 Da. This protein could not be found in the other animal meats. Agglutination and dot-blot tests showed that reactions of the specific protein of pig meat against the specific antibody were stronger than the other proteins.

(Key words: Specific protein, Pig meat, Antibody, Agglutination, Dot-blot)

Pendahuluan

Pencampuran daging sapi dengan daging babi yang terjadi saat ini sangat meresahkan masyarakat. Pencampuran ini disinyalir dilakukan oleh oknum pedagang pasar dengan tujuan untuk memperoleh keuntungan yang besar. Hal ini dibuktikan oleh adanya kasus pencampuran daging yang terjadi di Jakarta, Yogyakarta, dan daerah-daerah lainnya. Beredarnya daging babi yang dijual sebagai daging sapi tersebut dilakukan karena bentuk dan bau daging babi setelah dicampur dan dilumuri dengan darah sapi sangat mirip dengan daging sapi (Anonimus, 2002).

Deteksi adanya kandungan daging babi pada saat ini telah dikembangkan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), namun hasilnya baru diperoleh setelah tiga hari. Selain itu, teknik ini memerlukan biaya yang tinggi dan hanya dapat dilakukan di laboratorium tertentu (Anonimus, 2001). Untuk mengatasi permasalahan tersebut perlu dilakukan usaha-usaha untuk membedakan daging babi dengan daging spesies lain dengan cara yang lebih

mudah dan cepat.

Menurut Stolle (2001a), daging babi mempunyai protein spesifik yang tidak terdapat pada daging hewan lain. Protein spesifik tersebut dapat dipisahkan dengan teknik elektroforesis (SDS-PAGE) dan diisolasi dengan cara memotong pita protein spesifik dari gel elektroforesis. Protein ini dapat dikembangkan untuk mendapatkan antibodi spesifik yang dapat digunakan sebagai sarana diagnostik untuk membedakan daging babi dengan daging spesies lain.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi protein spesifik daging babi yang tidak ditemukan pada daging spesies lain, sehingga dapat dikembangkan sarana diagnostik untuk membedakan daging babi dengan daging spesies lain seperti sapi, kambing, domba, dan ayam melalui reaksi antigen-antibodi.

Materi dan Metode

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan, Laboratorium Bioteknologi Pusat Antar

Universitas (PAU), dan Laboratorium Ilmu Hayati Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Mencit Balb/c betina berumur 8 minggu digunakan untuk memproduksi antibodi spesifik terhadap protein spesifik daging babi.

Isolasi protein daging dilakukan dengan cara sentrifugasi, presipitasi dengan ammonium sulfat jenuh dan dialisis dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,2 pada suhu 4°C selama 2 hari (Natalia, 1996). Protein hasil presipitasi dipisahkan dengan teknik SDS-PAGE 10% dan 15% menurut metode Laemmli (1970) dan Stolle (2001b). Sampel protein masing-masing sebanyak 15 µl dengan protein standar (*Prestained SDS-PAGE standards, Catalog 161-0318*) yang digunakan sebanyak 5 µl, dimasukkan ke dalam sumuran. Pita protein spesifik pada gel elektroforesis dipotong dan dikeluarkan proteinnya dengan metode elektroelusi (Widayanti, 1999).

Larutan antigen hasil elektroelusi sebagai protein spesifik disuntikkan pada 5 ekor mencit Balb/c. Antigen sebanyak 10 µg dilarutkan dalam PBS dan diemulsikan dengan *Freund's complete adjuvant* (1:1) dan disuntikkan ke mencit secara intraperitoneal. Imunisasi diulang 14 hari kemudian dengan menggunakan *Freund's incomplete adjuvant*. Penyuntikan selanjutnya dilakukan dengan interval 14 hari selama 4 kali. Setelah penyuntikan terakhir, 1 minggu kemudian mencit diambil darahnya melalui *plexus retroorbitalis*, darah dibiarkan dalam temperatur kamar selama 30 menit, serum dipisahkan untuk dilihat titer antibodinya dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Mencit dengan titer antibodi yang sudah cukup tinggi diambil darahnya, serum dipanen dan digunakan sebagai antibodi spesifik untuk deteksi protein daging selanjutnya.

Uji aglutinasi dilakukan berdasar metode yang dikerjakan oleh Salasia (1994). Antigen dicampur dengan serum di atas gelas objek masing-masing 1 tetes. Apabila terjadi aglutinasi (gumpalan) berarti antigen tersebut

mengandung protein spesifik dari daging babi. Kriteria analisis reaksi aglutinasi ditentukan berdasarkan banyak sedikitnya jumlah aglutinat yang terbentuk, reaksi kuat diberi tanda positif dua (++), reaksi lemah diberi tanda positif satu (+), dan negatif (-) bila tidak terbentuk gumpalan.

Antigen dan antibodi spesifik direaksikan dengan metode *dot blot* (Salasia, 1994). Larutan 2 µl antigen diteteskan pada membran nitroselulosa sampai kering, kemudian diblokir dengan BSA 1% dalam 0,5% Tween 20 (dalam TBS) selama pada suhu 4°C. Membran dicuci dengan 0,05% Tween dalam TBS selama 10 menit, diulang 3 kali. Membran selanjutnya dipotong-potong (sesuai jumlah sumuran yang dipergunakan), setiap potongan dimasukkan ke dalam larutan antibodi poliklonal dalam PBS (1:50) dan digoyang selama 1 jam, diikuti dengan 4 kali pencucian. Membran kemudian diinkubasi ke dalam larutan konjugat 1:3000 (*alkaline phosphatase*) selama 1-2 jam, dan dicuci 2 kali dengan 0,05% Tween dalam TBS dan 2 kali pencucian dengan TBS tanpa Tween. Membran selanjutnya diwarnai dengan substrat, 33 µl BCIP dan 66 µl NBT dalam 10 ml buffer substrat pH 9,5. Reaksi dihentikan dengan memasukkan membran nitroselulosa ke dalam aquades apabila sudah terjadi perubahan warna. Membran nitroselulosa dikeringkan pada suhu kamar dan dianalisis berdasarkan intensitas timbulnya warna biru.

Hasil dan Pembahasan

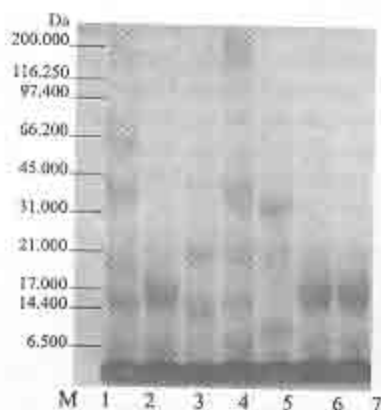
Protein daging dipisahkan secara kualitatif dengan teknik elektroforesis *Sodium Doedecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Elektrophoresis* (SDS-PAGE) 10% dan 15%. Pola protein yang terbentuk kemudian diidentifikasi fraksi-fraksi pita berdasarkan berat molekulnya. Teknik elektroforesis dapat digunakan untuk memisahkan protein sebagai bahan antigen untuk imunisasi sehingga dapat menghasilkan respon antibodi yang kuat dengan mempertahankan afinitas yang tinggi terhadap protein natif (Burgess, 1995).

Hasil elektroforesis protein daging babi, sapi, kambing, domba, dan ayam dengan menggunakan SDS-PAGE 10 % dapat dilihat pada gambar 1. Dari gambar tersebut terlihat bahwa protein daging babi (baris 2, 6, dan 7) mempunyai fraksi protein spesifik dengan berat molekul di antara 14.400-21.500 Da, yang tidak terlihat pada fraksi protein daging sapi (baris 1), kambing (baris 3), domba (5), dan ayam (baris 5). Perbedaan protein antara daging babi dan sapi diperkirakan terdapat pada fraksi sekitar 17.000 Da (Stolle, 2001a). Dalam penelitian ini terlihat bahwa daging babi mempunyai protein spesifik yang berbeda dengan sapi yang terlihat di antara fraksi dengan berat molekul 14.400-21.500 Da. Protein spesifik ini berada di sekitar 17.000 Da.

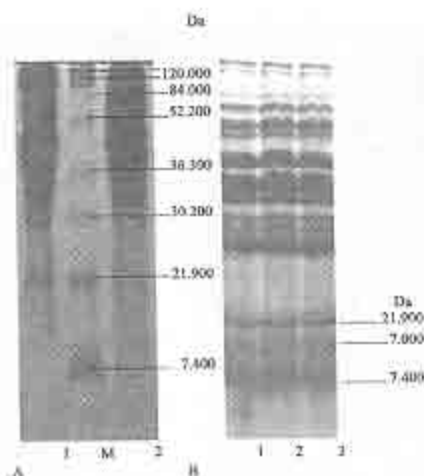
Untuk memperjelas pemisahan pita protein spesifik daging babi dilakukan elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE 15% (Putro, 1995). Pada elektroforesis ini protein terpisah menjadi 21 pita protein dengan berat molekul dari 7.400 Da sampai dengan 205.000 Da (Gambar 2A dan 2B).

Berat molekul protein dugaan baik pada SDS-PAGE 10% maupun 15% ditentukan berdasar perhitungan *retardation factor* (RF) sampel (Widayanti, 1999). Nilai RF tersebut diplotkan ke garis pada grafik dan titik potongnya dihubungkan pada skala berat molekul sehingga dapat dibaca berat molekul dugaan pada skala berat molekul standar yang menjadi acuan awal penghitungan, nilai RF sampel kemudian dimasukkan pada persamaan garis. Dengan menggunakan bantuan protein standar, melalui persamaan garis yang terbentuk diketahui bahwa protein spesifik daging babi yang dimaksud mempunyai berat molekul sekitar 17.000 Da. Berat molekul protein spesifik yang membedakan daging babi dengan sapi dalam penelitian ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Stolle (2001a) berada di sekitar 17.000 Da.

Fraksi pita protein spesifik daging babi pada gel dengan SDS-PAGE 15% tampak sangat tipis (Gambar 2A dan 2B), maka pemotongan pita protein dilakukan pada berat molekul sekitar 17.000 Da.



Gambar 1. Analisis protein daging babi dan sapi dengan SDS-PAGE 10%. Protein daging babi (2, 6, 7), sapi (1), kambing (3), domba (4), ayam (5), dan marker protein (M) (*Analyses pig meat and beef proteins by SDS-PAGE 10%. Pig meat protein (2,6,7), goat meat (3), lamb meat (4), chicken meat (5) and protein marker (M)*).



Gambar 2. Analisis protein daging babi (1), sapi (2), dan *marker* protein (M) (A); Protein spesifik babi terlihat jelas dengan berat molekul 17.000 Da (1, 2, dan 3; B), dengan jenis protein yang diketahui Lisosim (21.900 Da) dan Aprotinin (7.400 Da) pada SDS-PAGE 15%. (*Protein analyses of pig meat (1), beef (2), and protein marker (M) (A); pig specific protein can be seen clearly by molecular mass 17.000 Da (1,2, dan 3;B), with type of protein: lysosim (21.900 Da) and Aprotinin(7.400 Da) at SDS-PAGE 15%*).

Untuk mendapatkan protein spesifik babi dalam jumlah yang cukup dilakukan pemisahan dengan SDS-PAGE 15% (Gambar 2B). Berdasarkan pemisahan protein ini diperoleh beberapa pita protein yang cukup tebal pada babi dengan berat molekul sekitar 17.000 Da. Fraksi protein babi dilakukan pemotongan dengan cara elektroelusi (Widayanti, 1999) pada berat molekul 17.000 Da.

Hasil elektroelusi protein babi yang berada di sekitar 17.000 Da diukur konsentrasinya dengan uji Biorad. Kadar protein yang diperoleh sekitar 0,64 µg/ml, protein ini selanjutnya digunakan sebagai antigen untuk imunisasi pada mencit (Dwijjo, 1987; Utomo, 1989). Protein spesifik ini dalam tubuh mencit bertindak sebagai antigen yang diharapkan mampu menimbulkan respon imun pada mencit sehingga dihasilkan antibodi yang mempunyai afinitas spesifik yang sangat tinggi terhadap antigen tersebut (Tizzard, 1977). Jumlah protein yang

diimunisasikan adalah 10 µg/ekor, dengan menggunakan *adjuvant complete* pada imunisasi pertama dan dilanjutkan pada imunisasi berikutnya dengan *adjuvant incomplete*. Adjuvan ini berguna untuk membantu meningkatkan efektifitas terbentuknya imunitas non spesifik pada mencit (Burgess, 1995).

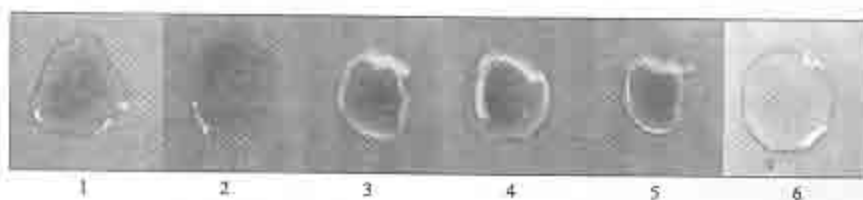
Antibodi spesifik yang timbul pada mencit dimonitor titernya dengan uji ELISA. Metode ini juga bermanfaat untuk mengetahui terbentuk tidaknya ikatan antigen dengan antibodi spesifik dalam tubuh mencit (Burgess, 1995). Hasil ELISA berupa angka-angka yang menunjukkan titer antibodi pada berbagai tingkat pengenceran. Titer antibodi tertinggi dalam penelitian ini terlihat pada pengenceran 25 kali, dengan nilai absorbansi 1,704. Titer yang tertinggi menunjukkan respon imun tubuh mencit terhadap antigen protein spesifik, serum mencit yang mengandung antibodi spesifik terhadap protein spesifik daging babi (17.000 Da) ini

selanjutnya digunakan sebagai bahan uji untuk deteksi protein daging spesies lain.

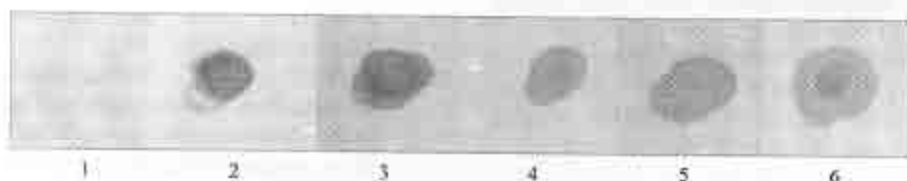
Reaksi positif adanya ikatan antigen dengan antibodi dapat dibuktikan dengan uji aglutinasi (Gambar 3). Antibodi poliklonal lebih efektif dalam melaksanakan beberapa proses imunologi dengan memperlihatkan reaksi presipitasi dan aglutinasi karena antibodi ini bereaksi dengan sejumlah antigen determinan yang berbeda pada antigen. Reaktivitas kompleks inilah yang mengakibatkan terbentuknya kompleks antigen dan antibodi yang besar (Burgess, 1995).

Teknik aglutinasi dilakukan melalui pencampuran antigen dan antibodi dengan pewarna *methylene blue* sebagai indikator. Antigen yang diuji adalah antigen yang

mengandung protein spesifik sedangkan antibodinya adalah serum yang mengandung antibodi spesifik. Dalam penelitian uji antibodi spesifik daging babi terhadap antigen protein babi menunjukkan reaksi aglutinasi yang ditunjukkan dengan terbentuknya aglutinat berupa pasiran yang lebih jelas (++) dibanding reaksi terhadap antigen protein sapi, kambing, domba dan ayam (+), sangat lemah. Terbentuknya pasiran (aglutinat) pada reaksi dengan protein sapi, kambing, domba dan ayam meskipun dengan intensitas yang lemah (+), kemungkinan karena pada pemotongan pita protein pada gel elektroforesis dengan berat molekul 17.000 Da (pita protein spesifik), juga terpotong pita-pita lain yang berdekatan, dimana protein ini juga dimiliki oleh protein daging spesies lain.



Gambar 3. Hasil reaksi uji aglutinasi. Reaksi antara antibodi spesifik dengan protein daging babi menghasilkan aglutinat (++) (1), dan sapi (2), kambing (3), domba (4), dan ayam (5) dengan aglutinat (+), kontrol (6) tidak ada reaksi aglutinasi (-). (*Result of agglutination test reaction. Reaction between specific antibody with pig meat protein resulted agglutinate (++) (1), and beef (2), goat meat (3), lamb meat (4), and chicken meat (5) with agglutinate (+), control (6). No agglutinate reaction (-).*)



Gambar 4. Hasil *immunoblotting* dengan metode *dot blot*. Reaksi antara antibodi spesifik dengan antigen berupa protein lisat daging babi (+++) (2), protein lisat daging sapi (++) (3), protein lisat daging kambing (+) (4), protein lisat daging domba (+) (5), dan protein lisat daging ayam (+) (6), serta kontrol (-) (1). (*Result of immunoblotting by dot blot method. Reaction between specific antibody with antigen is lisat protein of pig meat (+++) (2), Lisat protein of beef (++) (3), lisat protein of goat meat (+) (4), lisat protein lamb meat (+) (5), and lisat protein of chicken meat (+) (6), and control (-) (1).*)

Reaksi antigen antibodi selanjutnya dilakukan uji *immunoblotting* dengan metode *dot blot*. Pada hasil uji ini tampak bahwa pemberian antibodi poliklonal terhadap protein daging babi menunjukkan intensitas reaksi yang lebih kuat bila dibandingkan dengan protein daging sapi, kambing, domba dan ayam (Gambar 4). Intensitas yang kuat pada spot hasil *dot blot* disebabkan antibodi lebih mengenal epitop (Burgess, 1995) yang terdapat pada protein daging babi daripada sapi dan kemungkinan antibodi kurang mengenal epitop dari protein daging sapi, kambing, domba dan ayam sehingga intensitas yang terbentuk lemah.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa protein spesifik pada babi telah berhasil diisolasi dengan berat molekul sekitar 17.000 Da. Hasil imunisasi mencit Balb/c dengan antigen babi ini diperoleh antibodi dengan nilai absorbansi 1,704 pada pengenceran 25 kali. Hasil uji *dot blot*, memperlihatkan bahwa reaksi antibodi dengan antigen babi memperlihatkan reaksi kuat yang ditunjukkan dengan intensitas warna biru yang kuat (+++), dibandingkan dengan reaksi terhadap antigen sapi yang ditunjukkan warna biru dengan intensitas lemah (++) , sedangkan terhadap antigen kambing, domba, dan ayam ditunjukkan dengan intensitas warna biru yang paling lemah (+). Hasil uji aglutinasi antara antibodi yang dihasilkan terhadap protein spesifik babi (17.000 Da) dengan antigen babi menunjukkan reaksi positif kuat (++), sedangkan terhadap antigen sapi, kambing, domba, dan ayam menunjukkan reaksi lemah (+).

Adanya reaksi lemah antara antibodi spesifik babi dengan antigen sapi, kambing, domba, dan ayam baik pada uji aglutinasi maupun *dot blot* perlu dikembangkan metode deteksi yang lebih spesifik dengan menggunakan antibodi monoklonal.

Daftar Pustaka

- Anonim, 2001, Teknik PCR Menjawab Kehalalan Pangan, Trobos No. 23/th.11/Agustus 2001.
- Anonim, 2002, Jangan Tergur Daging Harga Murah, dalam Surat Kabar Kedaulatan Rakyat terbit 14 April 2002. Hal.7.
- Burgess, G.W., 1995, Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian, Terjemahan Dr. Wayan T. Artama, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Dwijo, B., 1987, Pembuatan Antigen Daging dari Bermacam-macam Hewan Potong. Laporan Penelitian, Proyek DPPFKH-UGM, Yogyakarta.
- Laemmli, V.K., 1970, Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature 227: 680-5.
- Natalia, L., 1996, Evaluasi Respon Antibodi Sapi dan Kerbau terhadap Vaksin *C. Perfringens* tipe A dengan Menggunakan ELISA, Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner vol. 1 no.3, Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan.
- Putro, I.S., 1995, Gambaran Elektroforetik Dengan Immunoblotting *Bacillus anthracis* Isolat Indonesia. Tesis Sarjana S-2, Program Studi Sain Veteriner, Jurusan Ilmu-ilmu Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Salasia, S.I.O., 1994, Untersuchungen β Zu Mutmaßlichen Pathogenitäts Faktoren Von *Streptococcus suis*. Vet. Med. Diss. Justus Liebig, Universität Gie en
- Stolle, A., 2001a, Komunikasi Pribadi pada Seminar Sehari, FKH-UGM, Lakfip, 18 Agustus 2001, Yogyakarta.
- Stolle, A., 2001b, BSE and Human Health, Penyakit Sapi Gila dan Pengaruhnya pada Manusia, Seminar Sehari, FKH-UGM, Lakfip, 18 Agustus 2001, Yogyakarta.

- Tizzard, I.R., 1977, *An Introduction to Veterinary Immunology*, First Edition, WB. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.
- Utomo, W.D.E., 1989. Pembuatan Antigen Daging Kambing untuk Uji Presipitasi. Skripsi Sarjana S-1. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Widayanti, R., 1999, Pembuatan dan Karakterisasi Antibodi Monoklonal terhadap Protein Membran Toxoplasma Gondii Isolat Loka, Tesis Sarjana S-2 Program Studi Sain