

**DETEKSI PROTEIN ALERGEN PREVALBUMIN PADA IKAN TONGKOL
MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI FILTRASI GEL G-50 DAN SDS-PAGE**

**DETECTION OF FISH ALLERGENS PREVALBUMIN USING GEL FILTRATION
CHROMATOGRAPHY G-50 AND SDS-PAGE**

Emma Emawati¹, Idar¹, Dewi Kurnia¹, Shintia Amelia¹
**Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, Jalan Soekarno Hatta No.754, Cipadung Kidul,
Panyileukan, Kota Bandung, Jawa Barat 40614, Indonesia**
Emma.emawati@stfb.ac.id

Reaksi alergi (reaksi hipersensitivitas) adalah reaksi-reaksi dari sistem kekebalan yang terjadi ketika jaringan tubuh yang normal mengalami cedera atau terluka. Bahan pangan yang dikenal mengandung protein alergen diantaranya susu, kacang kedelai, kacang tanah, kerang, telur, udang dan ikan tongkol. Protein alergen yang terdapat pada ikan tongkol adalah Prevalbumin (10-13 kDa). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi protein alergen yang terdapat pada ikan tongkol. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi, pemisahan protein menggunakan kromatografi kolom filtrasi gel G-50 dengan prinsip pemisahan berdasarkan perbedaan bobot molekul. Karakterisasi protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE, dengan prinsip pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), bergerak menuju kutub positif (anode) sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (anode). Berdasarkan hasil pemisahan protein menggunakan kromatografi kolom diperoleh 50 fraksi dan proses karakterisasi menggunakan SDS-PAGE menunjukkan terdapat protein alergen prevalbumin sesuai dengan literatur yaitu 10-13 kDa.

Kata kunci : Kromatografi filtrasi gel, protein prevalbumin, ikan tongkol, SDS-PAGE.

ABSTRACT

Allergic reactions (hypersensitivity reactions) are reactions of the immune system that occur when normal body tissue is injured or injured. Foods known to contain protein allergens include milk, soybeans, peanuts, shellfish, eggs, shrimp and tuna. The allergen protein found in tuna is Prevalbumin (10-13 kDa). This study aims to identify protein allergens found in tuna. The method used in this study is extraction, the separation of proteins using G-50 gel filtration column chromatography with the principle of separation based on differences in molecular weight. Characterization of proteins using SDS-PAGE electrophoresis, with the principle of movement of negatively charged particles (anions), moves towards the positive pole (anode) while positively charged particles (cations) will move towards the negative pole (anode). Based on the results of protein separation using column chromatography obtained 50 fractions and the characterization process using SDS-PAGE showed that there were prevalence of protein allergens in accordance with the literature namely 10-13 kDa.

Key words: Gel filtrasi cromatografi, prevalbumin protein, tuna fish, and SDS-PAGE.

PENDAHULUAN

Dalam beberapa tahun terakhir angka kejadian alergi pangan terus meningkat tajam, baik dalam negeri maupun luar negeri. World Allergy Organization (WAO) menyebutkan 22% penduduk dunia menderita alergi dan terus meningkat setiap tahun (Candra et al. 2011)

Alergi yang sering timbul karena konsumsi bahan pangan merupakan reaksi yang merugikan dari makanan yang didasarkan pada mekanisme imunologi (Hauben dan Panniks. 1996) Timbulnya reaksi alergi pangan disebabkan di dalam pangan tersebut mengandung senyawa penyebab alergi atau lebih dikenal dengan alergen. Alergen di dalam makanan dapat berupa protein, glikoprotein atau polipeptida dengan berat molekul lebih dari 18.000 Dalton, tahan panas dan tahan enzim proteolitik (Hasyimiet et al. 1992)

Di seluruh dunia, makanan laut berupa ikan, udang dan kerang memiliki peranan dalam sumber zat gizi manusia. Namun makanan laut juga merupakan sumber alergen yang kuat pada individu yang sensitif dan menyebabkan reaksi alergi. Alergi pangan karena makanan laut mudah dideteksi karena gejala yang ditimbulkan relatif cepat. Jenis makanan laut yang sering

mengakibatkan gangguan adalah jenis yang berukuran kecil seperti udang, kerang, kepiting dan sebagainya. Ikan laut yang agak besar seperti salmon, tuna relatif lebih ringan (ALLSA, 2008.) Penelitian Clark et al (2004) menunjukkan bahwa alergen ikan laut dapat mengakibatkan terjadinya 10% anafilaksis. Sifat alergi dari protein ikan dipengaruhi oleh kondisi fisiologis lambung terutama pada individu yang sensitif terhadap jenis pangan ini (Untersmayr et al. 2005)

Salah satu jenis ikan air laut yang memiliki kandungan gizi tinggi adalah ikan tongkol. Ikan tongkol diketahui memiliki kandungan gizi, diantaranya adalah protein dan asam lemak omega-3. Protein yang terdapat pada ikan tongkol salah satunya adalah Protein alergen (prealbumin) yang memiliki bobot molekul 10-13 kDa. (Sharpan dan Lopata, 2013). Tetapi belum ada penelitian tentang protein alergen dalam ikan tongkol sehingga perlu dilakukan pemeriksaan protein alergen di dalam ikan tongkol.

Metode yang dapat digunakan untuk deteksi protein alergen adalah immunoblotting dan ELISA selain itu dapat juga digunakan elektroforesis untuk deteksi protein alergen. Dengan prinsip jika suatu fase zat bermuatan diberi beda potensial fase

tersebut akan berpindah sepanjang medium yang kontinu ke arah katoda atau anoda sesuai dengan muatan partikel. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi protein alergen pada ikan tongkol dengan metode kromatografi Filtrasi Gel G-50 sebagai tahap pemisahan dan SDS-PAGE untuk proses identifikasi.

METODE PENELITIAN

Alat

Satu set alat elektroforesis BK-SCZ4, *homogenizer Scilogen tipe D160*, kolom gelas untuk kromatografi dan peralatan yang umum digunakan dilaboratorium.

Bahan

Sampel yang digunakan ikan tongkol. Bahan yang digunakan untuk karakterisasi adalah akrilamid, Bis-Akrilamid (N,N'-metilen bis akrilamida), Tris (2-hidroksimetil-2-metil-1,3-propanediol), Sodium Dodesil Sulfat, TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilenediamine), Ammonium persulfat, 2-mercaptoetanol, gliserol, bromophenol blue, glycine, HCl, dan Urea. Bahan untuk preparasi sampel dapat PBS pH7,2, Trisine, gliserol, mercaptoethanol, coomassie blue

Pembuatan reagen

Buffer gel 50 ml

Dilarutkan 18,5 Tris g dalam 30 ml aquades di dalam beaker glass 100ml. Kemudian stirrer dan tambahkan 0,15 g SDS 0,3% tambah aquades hingga 50 ml.

Buffer katoda 200ml

Dilarutkan 24,2 g Tris dan 38,5 g tricine dalam 100 ml aquades di dalam beaker glass 100ml. Kemudian stirrer dan tambahkan aquadest hingga 200 ml.

Buffer anoda 200ml

Dilarutkan 48,4 g Tris dalam aquades 150 ml kemudian stirrer dan tambahkan aquadest hingga 200 ml.

Larutan AB-3 100 ml

Dilarutkan 48 g akrilamid, 1,5 g bis-akrilamid dalam 100 ml aquadest kemudian stirrer.

Buffer sampel

Dilarutkan 0,18171 g Tris dalam 2 ml aquades kemudian adjust tambah 1,2 g SDS, 600 µl mercaptoethanol, 3,52 gliserol, 0,005 g coomassie blue tambahkan aquadest hingga 10 ml

Ekstraksi Protein dengan dapar

Pembuatan larutan dapar 1 L

Ditimbang dan dimasukkan bahan pembuatan dapar (KH_2PO_4 0,24g ; K_2HPO_4 1,44g ; KCl 0,2 g; dan NaCl 8g)

Preparasi sampel

Ikan tongkol direbus selama 20 menit pisahkan dari kulit dan tulang. Ikan tongkol tanpa kulit dan tulang selanjutnya ditambahkan larutan dapar pH 7.2 dan dilakukan homogenisasi dalam keadaan dingin. Setelah itu dilakukan sentrifugasi. Kemudian ambil supernatannya. Supernatant yang diperoleh merupakan ekstrak kasar).

Pemisahan dengan menggunakan

Kromatografi Kolom filtrasi Gel

Packing kolom Kromatografi Filtrasi Gel

Ditimbang sephadex *Marker Protein* dan masing-masing sampel dimasukkan ke dalam, sumur SDS-PAGE. Elektroforesis dilakukan kurang lebih 2 jam pada tegangan 30 volt selama 10 menit sampai stackinggel, kemudian *run* kembali dengan tegangan 100 volt sampai gel turun. G-50 sebanyak 50 gram ditambahkan dapar pH 7,2 sebanyak 500 ml kemudian diamkan semalaman..

Pemisahan

Turunkan dapar pH 7,2 hingga hampir menyentuh matriks (fase diam). Kemudian fraksi diukur menggunakan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 280 nm.

Karakterisasi SDS PAGE

Pembuatan gel SDS-PAGE sesuai dengan Bollag, Rozycki, Edelstein (1996), Meliputi pembuatan *resolving gel* dan *stacking gel resolving gel*. Dicampurkan aquadest 5 ml, AB-3 3,33 ml ml, buffer gel 3,33 ml, gliserol 1 ml, APS 10% 45 ml dan temed 6 ml. Stacking gel 4%. Dicampurkan aquadest 5 ml, AB-3 0,4614 ml, *buffer gel* 1,26 ml, APS 10% 45 μ l dan temed 6 μ l

Preparasi sampel untuk SDS-PAGE

Dicampurkan sampel 15 μ l dengan buffer sampel 5 μ l. kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.

Running SDS-PAGE

Pewarnaan Gel

Silver staining dilakukan dengan cara merendamkan gel kedalam larutan fiksasi 50% asam asetat. Setelah difiksasi gel dibilas dengan aquadest selama 10 menit lalu dicuci dengan larutan etanol 20% selama 3 x 20 menit. Kemudian gel diwarnai dengan 0,1% perak nitrat selama 20 menit. Gel

kemudian direndam pada larutan pengembang sampai dirasa cuku, gel yang direndam diberi larutan stop solution yang berisi 6 ml asam asetat dan 440ml aquadest selama 5 menit. Gel dicuci dengan aquadest selama 5 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel ikan tongkol yang digunakan pada penelitian ini mendapatkan 2 perlakuan yaitu ikan tongkol sebelum pemanasan dan ikan tongkol setelah pemanasan untuk membandingkan pengaruh pemanasan pada ikan tongkol. Kemudian sampel di ekstraksi menggunakan pelarut dapar fosfat salin pH 7,2 karena dapar yang ideal untuk target protein biasanya antara pH 7,0 sampai pH 8,5 hal ini bertujuan untuk membantu menstabilkan protein target (Bonner, 2007). Sampel hasil ekstraksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan suhu 5⁰ C, karena pada saat sentrifugasi terjadi perputaran yang membuat suhu naik maka dibutuhkan suhu dingin supaya tidak merusak protein dari ikan tongkol. Hasil dari sentrifugasi ini didapat supernatan.

Pemisahan menggunakan kromatografi kolom

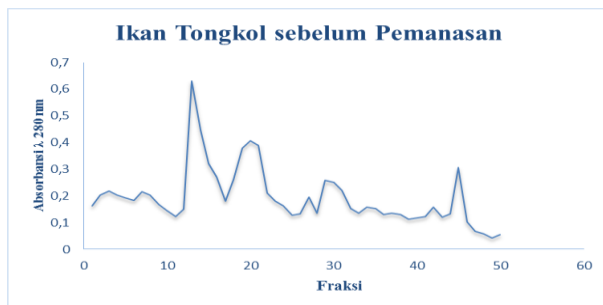
Kromatografi merupakan suatu teknik dimana komponen dari sampel dipisahkan

berdasarkan kemampuan masing-masing komponen tersebut untuk berinteraksi dengan fase gerak (*mobile phase*) dan fase diam (*stationary phase*) yang dilalui sampel.

Kromatografi filtrasi gel dilakukan untuk memisahkan protein yang tidak diinginkan dan diperlukan untuk persiapan sebelum analisis dengan elektroforesis SDS-PAGE (Sachtlehner & Haltrich 1999). Prinsip kromatografi filtrasi gel adalah pemisahan berdasarkan perbedaan bobot molekul. Molekul yang lebih kecil akan menembus ke dalam pori-pori matriks dan tertahan, tetapi molekul protein besar tidak dapat menembus ke dalam matriks akan melewati kolom lebih cepat.

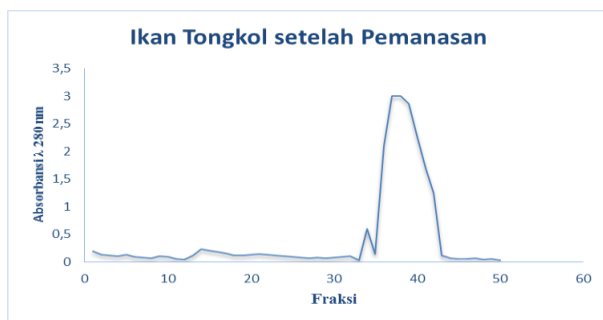
Pada penelitian ini digunakan kromatografi kolom filtrasi gel dengan matriks yang digunakan adalah Sephadex G-50. Kromatografi kolom gel filtrasi memisahkan ekstrak protein berdasarkan berat molekulnya (Balqis 2007). Matriks yang berupa gel berpori akan menahan fraksi protein dengan berat molekul yang lebih kecil, sedangkan fraksi dengan berat molekul yang lebih besar akan terelusi terlebih dulu. Dengan kata lain, protein yang terelusi pada fraksi-fraksi awal

merupakan protein yang memiliki berat molekul besar.



Gambar 1 Hasil pemisahan protein ikan tongkol sebelum pemanasan

Fractions of the separation result are monitored using spectrophotometry. In Figure 1, fractions that form peaks are suspected to contain allergenic proteins.



Gambar 2 Hasil pemisahan protein ikan tongkol setelah pemanasan

Fractions of the separation result are monitored using spectrophotometry. In Figure 2, fractions that form peaks are suspected to contain allergenic proteins.

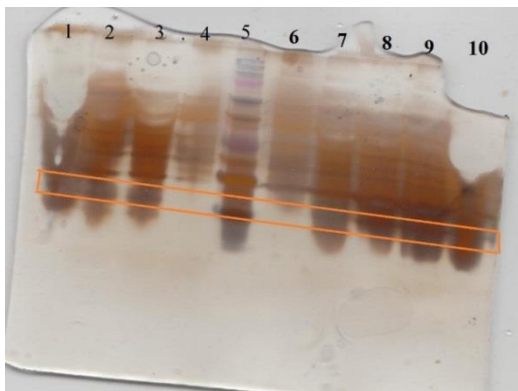
prealbumin. From the picture, it can be seen that the chromatogram peaks are slightly lower, indicating that the process of heating destroys many prealbumin proteins.

Karakterisasi Elektroforesis SDS-PAGE

Proteins generally have a positive or negative charge that describes the mixture of amino acid charges contained within. When protein molecules are placed in an electric field, they will migrate according to their charge, size, and shape.

Electrophoresis is a chemical analysis that is based on the movement of charged molecules in an electric field (isoelectric point). The movement of molecules in an electric field is influenced by their shape, size, charge, and chemical properties. If an electric current is directed through a supporting medium containing protein plasma components, these components will begin to migrate (Ricardson dkk. 1986). SDS-PAGE uses a synthetic gel as a supporting medium. The gel used is formed from acrylamide with N, N'-methylene bisacrylamide so that cross-links are formed because acrylamide polymerizes on its own.

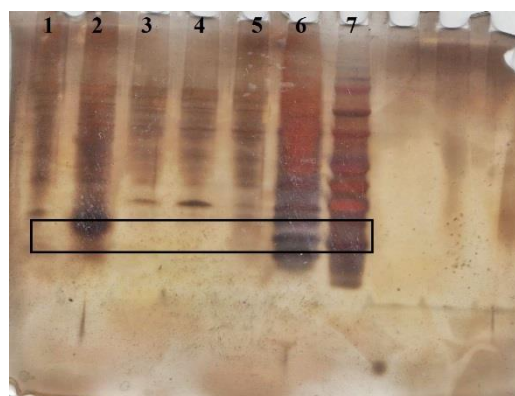
hanya menghasilkan ikatan linear yang tidak membentuk gel kalbu (Girindra, 1993).



Gambar 3. Elektrogram hasil SDS-PAGE (Ikan tongkol sebelum pemanasan) Tricine pewarnaan silver staining, (1) ekstrak kasar ikan tongkol sebelum pemanasan, (2) fraksi ke 45, (3) fraksi ke 42, (4) fraksi ke 29,30 dan 31, (5) standar protein, (6) fraksi ke 29, (7) fraksi ke 27, (8) fraksi ke 19,20 dan 21, (9) fraksi ke 20 (10) fraksi ke 13. Ukuran BM standar berturut-turut dari atas ke bawah yaitu 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 dan 10. Dari gambar diatas dapat dilihat protein alergen terdapat pada fraksi ke 13 fraksi 20, fraksi ke 19, 20, dan 21, fraksi 27, fraksi ke 45 dan ekstrak kasar.

Pada penelitian kali ini SDS-PAGE yang digunakan adalah SDS Tricine karena berat molekul sampel ikan tongkol kurang dari 25 KDa yaitu 10-13 KDa. Elektroforesis dilakukan terhadap sampel berupa fraksi ikan tongkol sebelum pemanasan dan ekstrak ikan tongkol setelah pemanasan dengan menggunakan standar berat molekul pembanding (marker protein)

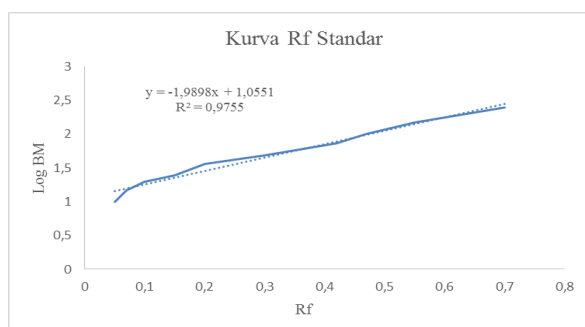
standar biorad precision plus protein tm dual color standard, protein marker digunakan sebagai standart untuk menentukan berat moleku dari sampel. Berikut adalah gambar dari hasil karakterisasi SDS-PAGE protein prevalbumin pada ikan tongkol :



Gambar 4. Elektrogram hasil SDS-PAGE (ikan tongkol sesudah Pemanasan) Tricine pewarnaan silver staining, (1) fraksi ke 34, (2) fraksi ke 33, 34 dan 35, (3) fraksi ke 37, (4) fraksi ke 38, (5) fraksi ke 36, 37, 38, 39 dan 40, (6) ekstrak ikan tongkol setelah pemanasan (7) standar protein. Ukuran BM standar berturut-turut dari atas ke bawah yaitu 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 dan 10. Dari gambar diatas dapat dilihat protein alergen terdapat pada fraksi ke 34 fraksi ke 33, 34 dan 35 dan ekstrak kasar

Dari gambar 3 dan 4 terlihat bentuk bentuk pita dari hasil elektroforesis, dari pita tersebut menunjukkan protein dengan bobot molekul rendah akan akan termigrasi terlebih dahulu disusul dengan protein dengan bobot molekul lebih besar

berikutnya sesuai dengan urutan besar bobot molekul.



Gambar 5. Kurva log BM

Hasil perhitungan kurva standar protein yang dihasilkan dari standar protein ini memiliki persamaan linear $Y = -1,6817 + 2,1972x$; $R^2 = 0,885$. Berdasarkan perhitungan berat molekul sesuai dengan kurva standar protein menunjukkan bahwa terdapat beberapa protein yang tampak. Pada ikan tongkol sebelum pemanasan terdapat pada ekstrak kasar ikan tongkol sebelum pemanasan, fraksi ke 13, fraksi 20, fraksi ke 19, 20, dan 21, fraksi 27, fraksi ke 45 dan ekstrak kasar. Sedangkan pada sampel ikan tongkol setelah pemanasan terdapat pada fraksi ke 34, fraksi ke 33, 34 dan 35 dan ekstrak kasar. Dilakukan pencampuran pada beberapa fraksi karena diduga masih mengandung protein alergen terbukti dari hasil terdapat protein alergen. Tetapi tidak semua fraksi campuran terdapat protein alergen kemungkinan protein alergen rusak atau terdenaturasi.

KESIMPULAN

Penelitian pada ikan tongkol sebelum dan setelah pemanasan dapat dimurnikan dengan kromatografi kolom filtrasi gel Sehadex G-50 walaupun tingkat kemurniannya tidak 100%. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan pada sampel ikan tongkol yang diambil di Karawang, Jawa Barat menunjukkan terdapat protein alergen prevalbumin

DAFTAR PUSTAKA

- Bollag. M Daniel, Rozycki. D Michale., Edelstein. J Stuart. 2000. Protein Methods. Edisi kedua. A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Bonner, Philip, L.R. (2007) Protein Purification The basic. Nottingham Trent University. Taylor & Francis Group Hal : 31
- Bowman CC, Selgrade MK. 2008. Failure to induce oral tolerance in mice is predictive of dietary allergenic potency among foods with sensitizing capacity. *Toxicol Sci.* 106(2):435–443.
- David G. Watson. 2009. Analisis Farmasi. Jakarta : EGC
- Girindra A. 1993 Imunokimia Bogor PAU-IPB
- Hemes, B.D. 1998. Gel Electrophoresis of proteins. Oxford University

- Press. New York.
- Johansson SGO, Hourihane J, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wuthrich B. 2001. A revised nomenclature for allergy. *Allergy* 56:813-824.
- Klug, W. S. & M. R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Prentice Hall, Englewood cliffs: xvi + 779 hlm.
- Lopata A and Lehrer S. 2009. Seafood Allergen Overview: Focus on Crustacea. Di dalam Jędrychowski L and. Wichers HJ, editor. *Chemical and Biological Properties of Food Allergens*. CRC Press. United States of America. hlm 229-251.
- Richardson, B. J, P. R. Baverstock and M. Adams 1986. *Allozyme Electrophoresis*. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Academic Press, Inc. San Diego
- Roitt IM, Delves PJ. 2001. *Essential Immunology*. New York : Blackwell Science.
- Roitt IM, Delves PJ. 2001. *Essential Immunology*. New York : Blackwell Science.
- Untersmayr E, Szalai K, Riemer AB, Hemmer W, Swoboda I, Hantusch B, Schöll I, Spitzauer S, Scheiner O, Jarisch R, Boltz-Nitulescu G, Jensen-Jarolim E. 2006. Mimotopes identify conformational epitopes on parvalbumin, the major fish allergen. *Mol Immunol*. 43(9):1454-61.