

Pre-Screening Profil Protein Daging Sebagai Pengaruh Variasi Metode Penyembelihan Hewan

Alvina Nur Aini

Program Studi Penjaminan Mutu Industri Pangan, Politeknik AKA Bogor
Jl. Pangeran Sogiri No.283, Tanah Baru, Bogor Utara, Kota Bogor, Jawa Barat 16154

^{*)}Email: alvinaakabogor@gmail.com

(Received : 2 Juli 2021; Accepted: 7 Juli 2021; Published: 2 Agustus 2021)

Abstrak

Perbedaan proses penyembelihan dapat mempengaruhi respon fisiologis hewan yang dapat diidentifikasi melalui pola ekspresi protein. Dalam penelitian ini dilakukan analisis awal protein daging untuk menganalisis pengaruh perbedaan metode penyembelihan, yaitu metode halal dan nonhalal. Penelitian menggunakan enam ekor tikus Wistar sebagai hewan uji. Kelompok uji pertama diberi perlakuan penyembelihan dengan metode halal, yaitu dengan pemotongan pembuluh darah pada leher hewan. Kelompok kedua diberi perlakuan penyembelihan secara nonhalal, yaitu dilakukan metode dislokasi servikal. Analisis profil protein daging dilakukan dengan menggunakan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Hasil SDS-PAGE menunjukkan beberapa pita protein tereskpresi pada berat molekul 116; 55; 48; 45; 41; 26; dan 17 kDa (kiloDalton), sedangkan hasil kuantifikasi pita protein menunjukkan sampel protein daging hasil penyembelihan nonhalal memiliki kuantitas lebih tinggi daripada sampel protein daging hasil penyembelihan halal. Kuantitas protein yang lebih tinggi pada penyembelihan nonhalal diduga karena lepasnya protein tertentu ke dalam sistem metabolisme hewan sebagai akibat dari respon stres yang diberikan.

Kata kunci: elektroforesis; halal; nonhalal; protein; SDS-PAGE

Abstract

Differences in the process of slaughtering animals can affect the physiological responses of animals which can be identified through the pattern of protein expression. In this study, meat protein pre-screening was conducted to analyze the effect of different slaughter methods, namely the halal and non-halal methods. The study used six Wistar rats as test animals. The first test group was slaughtered using the halal method that was by cutting the blood vessels in the neck of animals. The second group was slaughtered using non-halal method that was the cervical dislocation. Meat protein analysis was performed using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE result showed several protein bands expressed at molecular weight of 116; 55; 48; 45; 41; 26; and 17 kDa (kiloDalton), while the quantification results of protein bands showed that the protein samples from non-halal slaughtered meat had a higher quantity than the samples from the halal slaughter. The higher quantity of protein in non-halal slaughter was thought due to the release of certain proteins into animal's metabolic system as a result of the given stress response.

Keywords: electrophoresis; halal; non-halal; protein; SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Daging merupakan salah satu sumber pangan yang banyak diminati masyarakat. Terkhusus bagi masyarakat Muslim, pemilihan makanan mempertimbangkan status kehalalan. Makanan halal tidak hanya makanan yang berasal dari bahan halal, namun juga berkaitan dengan proses penyiapannya. Untuk memperoleh daging halal, hewan harus disembelih dengan metode halal, yaitu dengan memotong kerongkongan, esofagus, dan kedua pembuluh darah pada leher hewan. Metode penyembelihan selain yang dijelaskan dalam aturan

Islam dianggap tidak halal, seperti memukul dan mencekik hewan (Ma'mun dkk., 2006).

Penelitian mengenai analisis kehalalan pangan yang selama ini banyak dilakukan adalah penelitian mengenai penggunaan, pemalsuan, dan pencampuran komponen nonhalal dengan komponen halal, seperti deteksi kandungan daging babi, lemak babi, dan lain sebagainya (Raharjo dkk., 2012; Maryam dkk., 2016; Rahmawati dkk., 2016). Sebaliknya, saat ini belum terdapat analisis yang dilakukan untuk membedakan daging dari proses penyembelihan halal atau nonhalal. Pemantauan proses penyembelihan perlu dilakukan untuk menjamin bahwa daging hewan

berasal dari proses penyembelihan halal dan benar sehingga layak untuk dikonsumsi masyarakat Muslim.

Analisis sampel daging yang berasal dari proses penyembelihan halal ataupun nonhalal dapat dilakukan dengan pemeriksaan terhadap ekspresi protein daging. Salah satu metode analisis protein adalah *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). SDS-PAGE digunakan untuk memisahkan biomolekul seperti protein berdasarkan sifat pergerakan elektroforetik (pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasi dalam sebuah medan listrik). SDS-PAGE sering digunakan dalam analisis sampel biologis karena kemampuannya dalam memisahkan campuran kompleks dengan baik (Rosenberg, 1996).

Pada penelitian ini, analisis protein didasarkan pada protein spesifik yang terekspresi sebagai respon fisiologis hewan, yaitu berkaitan dengan perlakuan penyembelihan yang dilakukan. Menurut Huang dkk. (2014), adanya perlakuan berbeda pada penyembelihan menyebabkan respon stres pada tubuh hewan yang dapat terekspresi pada protein yang dihasilkan. Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis profil protein daging sebagai langkah awal dalam mengidentifikasi pengaruh metode penyembelihan halal dan nonhalal. Penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi sebagai penelitian awal (*pre-screening*) untuk menyediakan metode deteksi daging halal dan nonhalal.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas laboratorium, peralatan bedah, tabung konikal 15 mL, *centrifuge*, mikropipet, timbangan elektrik, *deep freezer* -80 °C, *vortex*, *shaker incubator* dan elektroforesis SDS-PAGE Mini Protean® II Cell.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah enam ekor tikus Wistar (*Rattus norvegicus*, usia 3 bulan, berat 200 g dan jenis kelamin jantan), akuades, Tris HCl, standar protein *Precision Plus Protein Dual Color*, sodium dodesil sulfonat (SDS), gel pemisah (akrilamida 10%), *coomassie blue*, glisin, metanol, asam asetat dan akuades.

Penyembelihan hewan secara halal dan nonhalal

Enam ekor tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) digunakan di dalam penelitian sebagai hewan uji. Keenam tikus dibagi menjadi dua kelompok perlakuan. Kelompok pertama terdiri dari 3 (tiga) ekor yang dieuthanasi (dikorbankan) menggunakan metode penyembelihan halal, yaitu dengan memotong bagian pembuluh darah leher. Kelompok kedua terdiri dari 3 (tiga) ekor yang dieuthanasi dengan metode dislokasi servikal, yaitu dengan memutuskan syaraf pada tulang belakang sehingga tikus mati tanpa mengeluarkankan darah (metode nonhalal).

Ekstraksi protein

Sebanyak 0,5 g daging tikus dari kedua metode penyembelihan diambil dan ditambah dengan 2,5 mL larutan Tris HCl 0,05 M (pH 7-8), kemudian dihaluskan hingga homogen. Sampel protein daging dihomogenkan dengan *vortex* selama 30 menit, yang diikuti dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang berisi ekstrak protein disimpan pada suhu -80 °C sebelum elektroforesis.

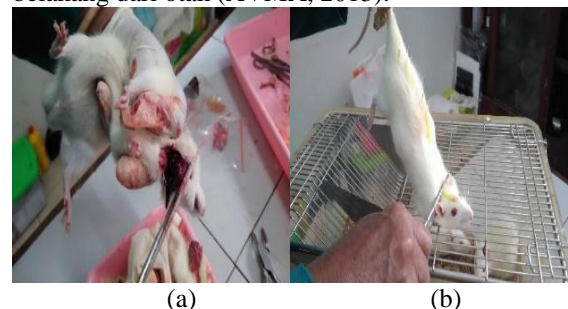
Elektroforesis

Proses pemisahan sampel protein menggunakan buffer pemisah yang terdiri dari 25 mM Tris HCl, 200 mM glisin, dan 0,1% SDS (b/v). Sebelum dilakukan elektroforesis, disiapkan gel akrilamida 10% sebagai gel pemisah. Sebanyak 20 µL sampel protein daging dari penyembelihan halal dan nonhalal (mengandung 25 µg protein) dimasukkan ke dalam sumuran yang telah tersedia pada gel. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 125 V dan arus 70 mA selama 1,5 jam. Setelah elektroforesis selesai, gel diwarnai dengan larutan pewarna yang terdiri dari 0,3% *coomassie blue*, 45% metanol, dan 10% asam asetat (v/v) selama semalaman di dalam *shaker*. Gel dipucatkan dengan larutan *destain* yang terdiri dari asam asetat dan metanol hingga menyisakan warna pita protein. Masing-masing profil protein dianalisis berat molekul dan intensitasnya menggunakan *software ImageJ 1.52a* (Rasband, 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyembelihan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6 (enam) ekor tikus Wistar yang dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan. Kelompok penyembelihan halal (selanjutnya disebut kelompok halal) disembelih dengan tata cara halal, yaitu dengan memotong pembuluh darah pada bagian leher, sedangkan kelompok berikutnya yaitu kelompok penyembelihan nonhalal (selanjutnya disebut kelompok nonhalal), dikorbankan dengan cara dislokasi servikal. Metode dislokasi servikal dilakukan dengan cara meletakkan benda tumpul atau ibu jari telunjuk di setiap sisi leher tikus untuk memberi tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang, sementara tangan lainnya pada bagian ekor lalu ditarik dengan cepat, sehingga terjadi pemisahan tulang belakang dari tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak (AVMA, 2013).



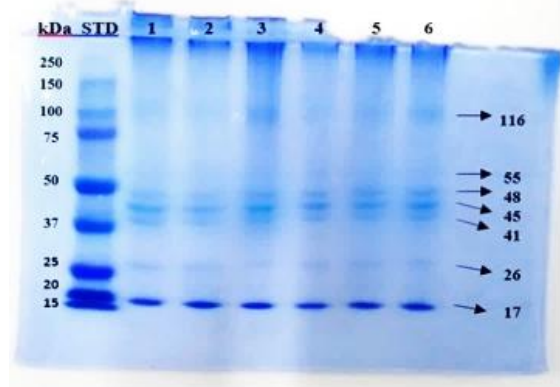
Gambar 1. (a) Penyembelihan halal, (b) Penyembelihan nonhalal (dislokasi servikal)

Ekstraksi Protein

Daging kaki bawah dipilih sebagai sampel untuk ekstraksi protein. Daging kaki bawah merupakan jaringan otot rangka yang berfungsi sebagai otot gerak. Menurut DiFranco dkk. (2005), otot rangka bawah seperti otot soleus, tibialis anterior, dan ekstensor digitorum merupakan sistem ekspresi protein mamalia yang sangat baik. Ekstraksi protein menggunakan buffer Tris HCl 0,05 M pH 7-8. Buffer Tris HCl digunakan untuk melisiskan sel di dalam sistem biologi, sehingga isi sel akan keluar dan dapat diekstraksi. Buffer Tris HCl juga dapat melindungi protein dengan cara mempertahankan pH (Tan, 2018). Protein yang telah terekstraksi dipisahkan dari komponen padatan melalui sentrifugasi. Protein yang bersifat larut air berada sebagai supernatan.

Hasil Pemisahan SDS-PAGE

Pemisahan protein daging dilakukan dengan teknik SDS-PAGE. Prinsip SDS-PAGE yaitu memisahkan protein berdasarkan ukuran molekulnya dengan pemberian arus listrik. Hasil SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan hasil pemisahan SDS-PAGE, profil protein daging menghasilkan pita-pita protein yang terletak pada kisaran berat molekul 17-116 kDa (kiloDalton). Pita-pita tersebut berada pada kisaran 116; 55; 48; 45; 41; 26; dan 17 kDa.



Gambar 2. Profil protein hasil pemisahan SDS-PAGE. STD adalah standar protein; sumuran 1, 2, 3, 4, 5, 6 berturut-turut adalah sampel halal 1, halal 2, halal 3, nonhalal 1, nonhalal 2, dan nonhalal 3. Jumlah sampel protein yang dimasukkan ke setiap sumuran adalah 25 µg.

Untuk memprediksi jenis protein pada setiap pita, dilakukan perbandingan berat molekul terukur/sampel dengan berat molekul teoritis. Perbandingan dilakukan menggunakan *database* The UniProt Consortium (2019) dan The UniProt Consortium (2021). Hasil prediksi jenis-jenis protein dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Prediksi protein hasil SDS-PAGE

Kisaran BM (kDa)	No.	Prediksi Protein	BM teoritis (kDa) ^{a,b}
116	1	2-oksoglutarat dehidrogenase	116,2
41-55	2	Dihidrolipoil dehidrogenase	54
	3	Miosin-binding	52,8
	4	Sitrat sintase	51,8
	5	Isositrat dehidrogenase	50,9
	6	Adenilosuksinat sintetase isoenzim	50,2
	7	Calreticulin	48
	8	Beta-enolase	47
	9	Alfa-1-antiproteinase	46,6
	10	Aspartat aminotransferase	46,4
	11	Calsequestrin-1	46,4
	12	Fosfoglisarat kinase	44,5
	13	Kreatin kinase	43
	14	Aktin, alfa- <i>skeletal muscle</i>	42
	15	Fruktose-bisfosfat aldolase	39,3
26	16	Triosefosfat isomerase	26,8
17	17	Proteasom subunit alfa kinase	26,4
	18	Nukleosida difosfat kinase	17,3
	19	Mioglobin	17,1

^aThe UniProt Consortium (2019)

^bThe UniProt Consortium (2021)

Berdasarkan data The Uniprot Consortium (2021), protein yang teridentifikasi merupakan kelompok protein sarkoplasma, yaitu protein yang terlibat dalam proses metabolisme sel hewan. Berdasarkan hasil pemisahan SDS-PAGE, terlihat bahwa pita-pita protein terletak pada kisaran berat molekul yang sama. Namun, ketebalan beberapa pita antara kelompok halal dan nonhalal terlihat berbeda. Perbedaan ketebalan pita dapat dikonfirmasi melalui analisis kuantitatif. Menurut Mustofa dkk. (2006), ketebalan pita dikuantifikasi dalam bentuk luas area di bawah kurva pada kurva densitograf. Kuantifikasi dapat dilakukan dengan sistem digitalisasi otomatis menggunakan *software* ImageJ. Kuantifikasi dilakukan terhadap pita protein pada kisaran berat molekul 26; 41; 45; dan 48 kDa. Pita-pita ini dipilih karena merupakan pita yang memberikan gambaran visual paling jelas diantara pita-pita lain. Hasil kuantifikasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kuantifikasi pita protein menggunakan *software* ImageJ 1.52a

Berat molekul (kDa)	Halal 1		Halal 2		Halal 3	
	Luas (a.u.)	area	Luas (a.u.)	area	Luas (a.u.)	area
26	9058		10236		12388	
41	11297		10979		11203	
45	19471		21898		17731	
48	14002		13355		13796	

Berat molekul (kDa)	Nonhalal 1		Nonhalal 2		Nonhalal 3	
	Luas (a.u.)	area	Luas (a.u.)	area	Luas (a.u.)	area
26	18144		17361		19228	
41	15436		15696		16107	
45	24681		21922		22032	
48	20477		17887		19178	

Tabel 2 menunjukkan kuantitas pita protein pada penyembelihan halal dan nonhalal cenderung berbeda. Sampel nonhalal mempunyai luas area lebih besar dibandingkan sampel halal, yang berarti bahwa kuantitas protein sampel nonhalal lebih tinggi dari sampel halal. Zaman dkk. (2012) telah melakukan penelitian pada profil protein otot ayam yang dipengaruhi oleh variasi metode penyembelihan. Metode pertama yang dilakukan adalah memotong leher ayam sampai terputus dari tubuh dan metode kedua adalah memotong sebagian leher tanpa terputus dari tubuh. Protein dengan ekspresi lebih tinggi ditemukan pada kisaran 35-66 kDa menggunakan SDS-PAGE dari metode kedua. Perbedaan ini dipengaruhi oleh respon stres yang diterima hewan selama proses penyembelihan.

Berdasarkan hasil kuantifikasi pada penelitian ini, dapat diduga bahwa penyembelihan secara nonhalal mampu memicu lepasnya protein tertentu ke dalam sistem metabolisme sebagai akibat dari respon stres yang diberikan, sehingga kuantitas protein yang diekspresikan pada sampel penyembelihan nonhalal menjadi lebih tinggi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi sebagai penelitian awal (*pre-screening*) dalam menyediakan metode deteksi daging halal dan nonhalal. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan, khususnya menggunakan instrumen analisis seperti *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* guna memisahkan, menganalisis dan mengkuantifikasi protein dengan lebih komprehensif.

KESIMPULAN

Hasil pemisahan SDS-PAGE menunjukkan beberapa pita protein tereskpresi pada kedua sampel penyembelihan, yaitu pada berat molekul 116; 55; 48; 45; 41; 26; dan 17 kDa. Kuantitas protein yang lebih tinggi pada penyembelihan nonhalal diduga karena lepasnya protein tertentu ke dalam sistem metabolisme hewan sebagai akibat dari respon stres yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anil, M.H. (2012). *Effects of Slaughter Method on Carcass and Meat Characteristics in the Meat of Cattle and Sheep*. Kenilworth: Agriculture and Holticulture Development Board UK.
- AVMA. (2013). *AVMA Guidelines for The Euthanasia of Animals*. Schaumburg: American Veterinary Medical Association (AVMA).
- DiFranco, M., Neco, P., Capote, J., Meera, P., & Vergara, J.L. (2005). Quantitative Evaluation of Mammalian Skeletal Muscle as a Heterologous Protein Expression System. *Protein Expression and Purification*, 47, 281-288.
- Huang, J.C., Huang, M., Yang, J., Wang, P., Xu, X.L., & Zhou, G.H. (2014). The Effects of Electrical Stunning Methods on Broiler Meat Quality: Effect on Stress, Glycolysis, Water Distribution, and Myofibrillar UltraStructures. *Poultry Science*, 93, 2087-2095.
- Ma'mun, M., Mura'i & Nurjannah. (2006). *Tuntunan Penyembelihan Binatang Secara Islam*, Sleman: MUI Kabupaten Sleman.
- Maryam, S., Sismindari, Raharjo, T.J., Sudjadi & Rohman, A. (2016). Analysis of Porcine Contamination in Dendeng Using Mitochondrial D-Loop 686 and cyt b Gene Primers by Real Time Polymerase Chain Reaction, *International Journal of Food Properties*, 19, 187-195.
- Mustofa, L., Mahaputra, L., Dachlan, Y.P., Rantam, F.A., & Hinting, A. (2006). Analisis Densitometrik Protein Reseptor Fertilisasi Pada Zona Pelusida Kamibing Sebagai Kandidat Bahan Imunokontrasepsi, *Media Kedokteran Hewan*, 22.
- Raharjo, T.J., Cahyaningtyas, W., Surajiman, Istini, & Pranowo, D. (2012). Validation of PCR-RFLP Testing Method to Detect Porcine Contamination in Chicken Nugget. *Indonesian Journal of Chemistry*, 12, 302-307.
- Rahmawati, Sismindari, Raharjo, T.J., Sudjadi, & Rohman, A. (2016). Analysis of Pork Contamination in Abon Using Mitochondrial DLoop22 Primers Using Real Time Polymerase Chain Reaction Method. *International Food Research Journal*, 23, 370-374.
- Rasband, W.S. (2018). *ImageJ* <https://imagej.nih.gov/ij/>, Bethesda: National Institutes of Health.
- Tan, A. (2018). *The Function of a Tris Buffer in DNA Extraction*. Accessed on 5 Januari 2019 from www.sciencing.com.
- The UniProt Consortium. (2019). UniProt: A Worldwide Hub Of Protein Knowledge. *Nucleic Acid Research*, 47, D506-D515.
- The UniProt Consortium. (2021). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase In 2021. *Nucleic Acids Research*, 49, D480-D489.

organism:"Rattus norvegicus (Rat) [10116]"
AND proteome:up000002494 in
UniProtKB.

Zaman, R., Hamzah, M.N., Abdurrazq, N.B.,
Hamzah, M.S., & Mohammad, T.T. (2012).
Effect of Different Methods of Slaughtering
on Protein Expression in Chicken Meat,
Engineering IIUM Journal, 13.