



PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI PARVALBUMIN PATIN DAN GURAMI

Roni Nugraha*, Novemi Gita Saftiri, Mala Nurilmala, Rizsa Mustika Pertiwi

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University
Jalan Agatis, Kabupaten Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

Diterima: 8 Desember 2023/Disetujui: 13 Desember 2024

*Korespondensi: rnugraha@apps.ipb.ac.id

Cara sitasi (APA Style 7th): Nugraha, R., Saftiri, G. N., Nurilmala, M., & Pertiwi, R. M. (2024). Purifikasi dan karakterisasi parvalbumin patin dan gurami. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(12), 1134-1145. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v27i12.52147>

Abstrak

Parvalbumin merupakan protein penyebab utama alergi ikan. Namun, penderita alergi ikan menunjukkan reaksi yang berbeda terhadap jenis ikan yang berbeda. Oleh karena itu, purifikasi dan karakterisasi parvalbumin pada berbagai spesies ikan penting untuk dilakukan sebagai upaya pengembangan teknologi deteksi alergi ikan. Penelitian ini bertujuan menentukan saturasi amonium sulfat terbaik untuk purifikasi parvalbumin dan mengkarakterisasinya secara *in silico*. Parvalbumin dari ikan patin dan gurami mentah dan hasil pemasakan dimurnikan dan dikarakterisasi. Parvalbumin dimurnikan dengan metode presipitasi amonium sulfat (20-90% saturasi), kemudian diidentifikasi menggunakan metode SDS-PAGE. Sifat alergenitas parvalbumin dari gurami dan patin dianalisis secara *in silico*. Identifikasi profil protein menunjukkan adanya 2 pita yang merepresentasikan parvalbumin dengan bobot molekul 11 dan 14 kDa. Pemurnian menggunakan amonium sulfat belum menghasilkan parvalbumin yang murni karena masih ditemukan adanya pita-pita protein lain yang cukup tebal. Namun, amonium sulfat dengan saturasi 80-90% menghasilkan profil yang terbaik pada proses pemurnian parvalbumin dari ikan mentah dan 90-100% untuk ikan yang dimasak. Hasil analisis bioinformatika menunjukkan adanya 7 sekuen parvalbumin untuk ikan patin, tetapi tidak ditemukan adanya sekuen parvalbumin untuk ikan gurami. Sekuens parvalbumin ikan patin dengan kode XP_026772003.1 memiliki kemiripan yang tinggi dengan parvalbumin dari spesies lain misalnya salmon dan tilapia yang terbukti alergenik. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar dalam karakterisasi parvalbumin lebih lanjut untuk mendukung adanya diagnosis yang lebih baik.

Kata kunci: alergen, amonium sulfat, bioinformatika, *in silico*, SDS-PAGE

Purification and Characterization of Catfish and Gourami Parvalbumin

Abstract

Parvalbumin is the main protein responsible for fish allergies. However, allergic sufferers show different reactions to different types of fish. Therefore, it is important to purify and characterize parvalbumin from various fish species. In this study, parvalbumin from raw and cooked catfish and gourami fish was purified and characterized. Parvalbumin was purified using the ammonium sulfate precipitation method and identified using SDS-PAGE. The allergenic properties of parvalbumin from gourami and catfish were analyzed *in silico*. Protein profiling using SDS-PAGE showed the presence of two bands representing parvalbumin with molecular weights ranging from 12-14 to kDa. Purification using ammonium sulfate did not result in pure parvalbumin because the other protein bands were still quite thick. However, ammonium sulfate at 80-90% saturation produced the best profile in the purification process of parvalbumin from raw fish and 90-100% for cooked fish. Bioinformatics analysis showed seven parvalbumin sequences in catfish, but no parvalbumin sequences were found in gourami fish. One catfish parvalbumin sequence with the code XP_026772003.1, showed high similarity with parvalbumin from other species known to be allergenic.

The results of this study can serve as a basis for further characterization of parvalbumin to support better diagnosis.

Keywords: allergen, ammonium sulfate, bioinformatics, in silico, SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Ikan merupakan sumber makanan tinggi protein dan mengandung banyak komponen-komponen yang menyehatkan. Tingkat konsumsi ikan meningkat setiap tahunnya. Tingkat konsumsi ikan per kapita dunia meningkat dari 18,9 kg pada tahun 2010 menjadi 20,6 kg di tahun 2021 (FAO, 2024). Angka konsumsi ikan perkapita di Indonesia pada tahun 2023 mencapai 57,61 kg dengan gurami dan patin merupakan salah satu jenis ikan yang banyak dikonsumsi (Kementerian Kelautan dan Perikanan [KKP] 2024). Peningkatan tingkat konsumsi *seafood* ini diiringi dengan meningkatnya angka kejadian alergi (Ruethers *et al.*, 2018). Ikan termasuk dalam makanan yang umum dikategorikan sebagai alergen (Soedarini *et al.*, 2024). Hasil penelitian *cross-sectional* pada lebih dari 8.600 orang di Vietnam menunjukkan tingginya jumlah penderita alergi *seafood* terdiagnosis oleh dokter pada anak-anak di bawah 6 tahun dengan krustasea sebagai penyebab utama (3,8% dari total populasi), diikuti oleh ikan (1,2%), dan moluska (1,0%) (Le *et al.*, 2020). Angka kejadian alergi ikan di Indonesia lebih tinggi dibandingkan dengan negara lain. Hasil pelacakan yang dilakukan oleh Candra *et al.* (2011) pada pasien yang datang ke Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo (RSCM) menunjukkan jumlah penderita alergi ikan mencapai 18% dengan jumlah penderita alergi ikan dari kalangan orang dewasa lebih tinggi dibandingkan dengan penderita dari kalangan anak-anak. Oleh karena itu, penanganan alergi ikan perlu dilakukan dengan menghindari penyebab alergi, yaitu tidak mengonsumsi ikan.

Alergi ikan merupakan salah satu penyakit akibat adanya kelainan sistem kekebalan tubuh manusia yang menganggap protein ikan adalah zat berbahaya yang masuk ke tubuh (Nugraha *et al.*, 2020). Penanganan alergi ikan yang tepat dapat dilakukan apabila penderita alergi mengetahui penyebab alerginya tersebut. Penyebab alergi ikan sampai saat ini terdapat 11 protein (Ruethers *et*

al., 2018). Parvalbumin merupakan penyebab utama alergi ikan, sedangkan protein-protein lain aldolase, enolase, kolagen dan beberapa proteini lain teridentifikasi sebagai alergen minor (Stephen *et al.*, 2017). Deteksi alergi ikan dapat dilakukan melalui beberapa cara, yaitu menggunakan teknik tusuk kulit atau *skin prick test* (SPT), tes darah dan *microarray*. Metode-metode deteksi tersebut dapat menggunakan larutan ekstrak atau menggunakan protein-protein alergen yang dimurnikan. Ekstrak banyak digunakan untuk deteksi alergi karena mudah dibuat dan dapat mendeteksi alergi secara lebih luas (Dramburg *et al.*, 2023). Akan tetapi, hasil penelitian Ruethers *et al.* (2019) menunjukkan bahwa larutan-larutan ekstrak ikan yang digunakan pada SPT memiliki kandungan alergen yang berbeda-beda. Kandungan protein total, konsentrasi alergen dan reaktivitas antibodi (IgE) dari 26 larutan SPT berbeda hingga 10 kali lipat. Selain itu, ekstrak juga banyak mengandung protein-protein yang tidak memiliki efek terhadap alergi.

Deteksi menggunakan komponen alergen kemudian menjadi alternatif yang dapat mengatasi keterbatasan penggunaan ekstrak. Protein alergenik telah banyak dimurnikan dan dikarakterisasi termasuk yang berasal dari ikan. Ruethers *et al.* (2018) berhasil memurnikan parvalbumin dari ikan Pasifik makarel, sedangkan Rahman *et al.* (2010) berhasil memurnikan tropomiosin dari udang windu. Protein alergenik ini menyebabkan berkembangnya metode deteksi yang disebut *component resolved diagnostics* (CRD). Teknik deteksi ini bertujuan untuk mengkarakterisasi profil sensitisasi pasien penderita alergi hingga pada taraf molekular sehingga mampu meningkatkan spesifisitas sistem deteksi alergi (Muraro *et al.*, 2014).

Sistem deteksi komersial misalnya *ImmunoCAP Allergen Components and microarray platforms* (ImmunoCAP ISAC, FABER test) dikembangkan berdasarkan prinsip CRD. Akan tetapi, komponen alergen yang digunakan pada platform-platform



komersial tersebut berasal dari spesies-spesies ikan yang berasal dari Eropa sehingga tidak sepenuhnya kompatibel dengan profil sensitisasi alergi *seafood* di Indonesia. Telah diketahui bahwa alergi sensitisasi bersifat spesifik untuk daerah tertentu (Ruethers, *et al.*, 2020). Oleh karena itu, purifikasi dan karakterisasi protein alergenik dari ikan yang banyak dikonsumsi masyarakat Indonesia menjadi hal yang penting dilakukan untuk mendukung berkembangnya sistem CRD. Alergen murni ini akan digunakan pada tahapan penelitian selanjutnya untuk mengembangkan sistem deteksi berbasis komponen yang disebut *component resolved diagnostics* (CRD). Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan dan mengarakterisasi parvalbumin pada ikan patin dan ikan gurami.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan Ekstrak Ikan

Daging ikan yang dibeli dari pasar tradisional dan modern di Bogor dicampur dengan bufer fosfat (PBS, 4 mmol/L; pH 7,1; 3 mL/g daging) dan dihancurkan menggunakan *homogenizer* (3 menit pada 13.000 rpm di atas es). Setelah agitasi selama satu malam di atas es, campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 15 menit. Supernatan kemudian dipanaskan selama 5 menit dalam penangas air (95-100°C). Protein yang diendapkan dihilangkan dengan sentrifugasi pada 12.000 g dan supernatan yang didapatkan disimpan pada suhu -20°C (Nugraha *et al.* 2020).

Pemurnian Komponen Alergen

Komponen alergen dari ikan dimurnikan menggunakan teknik presipitasi amonium sulfat (Ruethers *et al.*, 2018). Percobaan presipitasi amonium sulfat dilakukan untuk menentukan saturasi optimal amonium sulfat yang digunakan. Jumlah amonium sulfat yang ditambahkan ditentukan menggunakan situs <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>. Kristal amonium sulfat yang digunakan dihaluskan hingga menjadi serbuk terlebih dahulu, kemudian serbuk amonium sulfat dimasukkan ke dalam *microtube* 2 mL. Amonium sulfat ditimbang

dengan jumlah yang sesuai dengan rentang saturasi yang telah ditentukan, mulai dari 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% dan 90-100%.

Sampel hasil ekstraksi protein selanjutnya disiapkan sejumlah delapan buah masing-masing 1 mL di dalam *microtube* 2 mL. Serbuk amonium sulfat ditambahkan ke dalam 1 mL sampel secara berurutan lalu dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 jam menggunakan *rocker-shaker*. Campuran lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dituangkan dengan hati-hati ke dalam *microtube* 2 mL. Amonium sulfat ditambahkan kembali dengan jumlah yang sesuai, kemudian dilanjutkan hingga diperoleh supernatan seperti pada tahap sebelumnya. Hasil purifikasi berupa pelet dilarutkan dengan pelarut PBS 20× pH 7,2 lalu disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya dianalisis berat molekul protein menggunakan SDS-PAGE. Kandungan protein yang didapatkan dari hasil pemurnian diukur menggunakan metode Bradford.

Analisis Kandungan Protein

Kadar protein larut air dari sampel hasil ekstraksi filet patin dan daging gurami diuji menggunakan metode Bradford dengan BSA sebagai standar (Bradford 1976). Larutan stok pereaksi Bradford dibuat dengan mencampurkan 25 mg CBB ke dalam 12,5 mL etanol dan 25 mL asam fosfat. Larutan ditambahkan akuades hingga volume larutan menjadi 250 mL. Larutan pereaksi Bradford yang akan digunakan dilakukan pengenceran menggunakan akuades dengan perbandingan 1:3. Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 2 mg/mL, kemudian larutan standar diencerkan sehingga didapatkan konsentrasi 0,1-0,7 mg/mL. Pengujian metode Bradford dilakukan dengan mencampurkan 5 mL pereaksi Bradford ke dalam 100 µL sampel dan akuades digunakan sebagai blangko. Larutan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

Analisis Proksimat

Analisis proksimat (AOAC 1980) dilakukan pada sampel filet patin dan daging ikan gurami. Analisis proksimat merupakan metode uji yang dilakukan untuk menentukan komposisi kimia pada suatu bahan. Analisis proksimat meliputi kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak.

Karakterisasi Alergen

Bobot molekul alergen ditentukan dengan SDS-PAGE berdasarkan metode Laemmli (1970). Protein 2 µg ditambahkan buffer Laemmli dengan perbandingan 1:1 (v/v) kemudian dipanaskan selama 10 menit pada suhu 85°C. Gel yang digunakan, yaitu gel pemisah dengan konsentrasi 15% untuk parvalbumin dan 12% untuk tropomiosin, serta gel pengumpul 3%. Ekstrak protein sebanyak 10 µL dengan konsentrasi (1 µg/µL) dimasukkan ke dalam sumur SDS-PAGE kemudian dipisahkan dengan memberikan arus listrik pada gel dengan tegangan 170 V selama 1 jam. Protein yang telah dipisahkan berdasarkan bobot molekulnya divisualisasikan dengan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* selama 1 jam.

Analisis Bioinformatika

Prosedur analisis bioinformatika pada penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan. Tahap pertama adalah pengumpulan sekuens dari situs GenBank NCBI (Sayers *et al.*, 2022). Sekuens yang telah diunduh kemudian diidentifikasi menggunakan *website* ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) dan dilanjutkan dengan tahap *alignment* sekuens dan pembuatan pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak MEGA11 (Kimura *et al.*, 2022).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Proksimat

Analisis proksimat dilakukan untuk mengetahui komposisi gizi yang terkandung dalam suatu bahan pangan. Analisis yang dilakukan di laboratorium meliputi kadar air, kadar abu, kadar lemak dan kadar protein (AOAC, 1980). Hasil analisis proksimat menunjukkan bahwa komposisi utama pada

filet patin dan daging ikan gurami adalah air $84,66 \pm 0,82\%$ (patin) dan $77,88 \pm 0,56\%$ (gurami). Kadar air merupakan komponen utama dalam bagian ikan segar yang dapat dimakan. Kadar lemak ikan patin adalah $0,32 \pm 0,14\%$ dan ikan gurami $3,33 \pm 0,41\%$, sedangkan abu ikan patin $2,13 \pm 0,17\%$ dan gurami $0,80 \pm 0,13\%$.

Protein merupakan komponen utama dari otot atau daging ikan. Komposisi protein pada filet patin, yaitu $12,23 \pm 0,28\%$, nilai ini lebih rendah dari komposisi protein pada daging gurami $17,35 \pm 0,10\%$. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa filet patin termasuk ikan dengan kategori protein sedang. Daging ikan gurami yang memiliki persentase protein $>15\%$ termasuk dalam kategori ikan berprotein tinggi (Njinkoue *et al.*, 2016). Hasil analisis proksimat pada penelitian Setiawati *et al.* (2015) menunjukkan kadar protein ikan patin $14,20 \pm 0,04\%$. Kadar protein ikan gurami pada penelitian Nurjanah *et al.* (2010), yaitu $18,71 \pm 0,13\%$.

Kandungan protein kasar yang relatif tinggi hingga sedang berkaitan dengan fungsi ikan sebagai sumber protein yang baik. Kandungan protein pada spesies ikan lain memiliki nilai yang sangat bervariasi. Berdasarkan penelitian oleh Olagunju *et al.* (2012), kandungan protein pada ikan lele (*Hemisynodontis membranacea*) $20,26 \pm 1,47\%$, ikan nila (*Tilapia zilli*) $18,80 \pm 0,17\%$, ikan haring (*Clupea harengus*) $18,45 \pm 0,47\%$ dan mackerel (*Scomber scombrus*) $20,20 \pm 0,66\%$. Perbedaan kadar protein pada berbagai jenis ikan dapat disebabkan oleh perbedaan pakan yang dikonsumsi, ketersediaan nutrisi di lingkungan hidupnya dan kemampuan penyerapan atau konversi nutrisi pada ikan. Proses penanganan dan pengolahan dapat memengaruhi kadar protein bahan hasil perairan (Wulan *et al.*, 2024).

Kandungan protein terlarut

Analisis protein terlarut menggunakan metode Bradford (1976) dilakukan pada ekstrak daging ikan patin dan gurami. Hasil uji protein terlarut menunjukkan bahwa sampel ekstrak daging dengan perlakuan segar mengandung konsentrasi protein yang lebih



tinggi dibandingkan dengan sampel dengan perlakuan pemasakan (*Figure 1*). Konsentrasi protein pada sampel ekstrak daging ikan patin segar (PS) dan gurami segar (GS) berturut-turut sebesar 0,595 mg/mL dan 0,544 mg/mL. Sampel ekstrak daging patin masak (PM) dan gurami masak (GM) masing-masing mengandung protein sebesar 0,502 mg/mL dan 0,398 mg/mL.

Hasil uji protein larut air menunjukkan bahwa ekstrak sampel dengan perlakuan tidak masak mengandung konsentrasi protein lebih tinggi dibandingkan dengan sampel dengan perlakuan pemasakan. Konsentrasi protein larut air pada kedua sampel ikan mengalami penurunan setelah diberikan perlakuan pemasakan. Hal ini dapat disebabkan karena proses pemasakan menyebabkan perubahan kimia yang menimbulkan denaturasi protein. Suhu pemanasan pada kisaran 45-50°C menyebabkan kompleks aktin-miosin terdisosiasi. Suhu yang meningkat pada kisaran 50-55°C mengakibatkan transformasi struktur heliks yang diikuti oleh agregasi molekul protein (Chan *et al.*, 1985). Agregasi atau adanya agregat protein tidak larut dalam air dapat terjadi karena peningkatan paparan daerah hidrofobik dan perubahan gugus sulfhidril serta ikatan disulfida yang tidak dapat diakses pada keadaan asli menjadi tersedia dan dapat bereaksi membentuk ikatan silang baik antarmolekul maupun intramolekul (Keshavarz *et al.*, 2019).

Protein sarkoplasma mengandung berbagai jenis protein larut air yang disebut dengan miogen. Kandungan miogen dalam otot ikan bervariasi tergantung pada spesies ikan (Gultom *et al.*, 2015). Hasil analisis protein larut air pada penelitian Qixing *et al.* (2014) menunjukkan bahwa konsentrasi protein larut air dari sampel otot ikan mas (*Aristichthys nobilis*) mengalami sedikit penurunan setelah dipanaskan dengan suhu 50°C dan mengalami penurunan yang signifikan setelah dipanaskan pada suhu lebih dari 60°C. Hasil ini dikaitkan dengan denaturasi protein sarkoplasma, yang utamanya terdiri dari mioglobulin, kreatina kinase dan enzim yang memiliki kisaran stabilitas termal.

Hasil penelitian Ayala *et al.* (2005) menunjukkan pemasakan otot ikan selama 10 menit mengakibatkan agregasi granular yang melimpah di ruang subsarkolema. Agregat ini terutama berhubungan dengan denaturasi dan koagulasi protein sarkoplasma dan miofibril. Proses pemasakan juga menyebabkan pecahnya sarkolema, digantikan oleh materi padat yang terkoagulasi bergabung dengan endomisium. Rongga-rongga juga terbentuk di banyak serat otot yang kemudian ditempati oleh cairan dan agregat protein yang terkoagulasi. Hal ini mungkin menyebabkan kelarutan protein sarkoplasma menjadi berkurang pada saat diekstraksi.

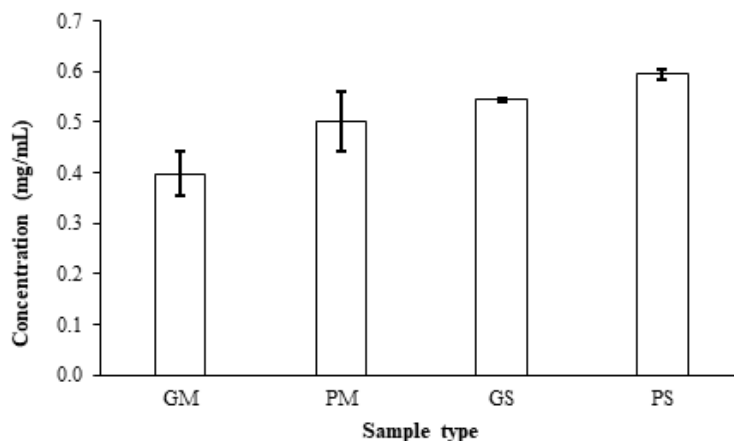


Figure 1 Protein concentration of cooked gourami (GM), cooked catfish (PM), fresh gourami (GS) and fresh catfish (PS) as measured by Bradford method

Gambar 1 Konsentrasi protein larut air ikan gurame rebus (GM), patin rebus (PM), gurame segar (GS) dan patin segar (PS)

Presipitasi dengan Amonium Sulfat

Presipitasi menggunakan amonium sulfat dilakukan untuk memurnikan protein alergen dari ikan patin dan gurami. Hasil uji SDS-PAGE disajikan pada *Figure 2*. Hasil analisis menunjukkan visualisasi pita protein yang berbeda-beda setelah pengendapan dengan amonium sulfat. Pita yang tebal menunjukkan konsentrasi protein yang tinggi, sedangkan pita yang tipis menunjukkan konsentrasi protein yang rendah. Profil protein pada SDS-PAGE memperlihatkan belum optimalnya proses pemurnian menggunakan amonium sulfat, terbukti dengan pita-pita protein selain parvalbumin yang muncul. Namun, amonium sulfat dengan saturasi 80-90% menghasilkan lebih sedikit pita-pita protein non-parvalbumin pada ikan segar

dan saturasi 90-100% pada ikan masak. Konsentrasi amonium sulfat tersebut dapat mengendapkan protein parvalbumin dan lebih banyak mengeliminasi protein-protein selain parvalbumin.

Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak protein sampel segar mengandung lebih banyak jenis protein. Ekstrak protein masak menunjukkan adanya penebalan dan eliminasi beberapa pita protein akibat proses pemanasan. Proses presipitasi mampu mengeliminasi protein-protein yang diinginkan dengan lebih baik pada ikan gurami yang diindikasikan dengan hanya munculnya sedikit pita di SDS-PAGE. Metode purifikasi dengan amonium sulfat memiliki beberapa keunggulan di antaranya proses purifikasi tidak memerlukan waktu yang lama, murah, kemampuan memisahkan protein

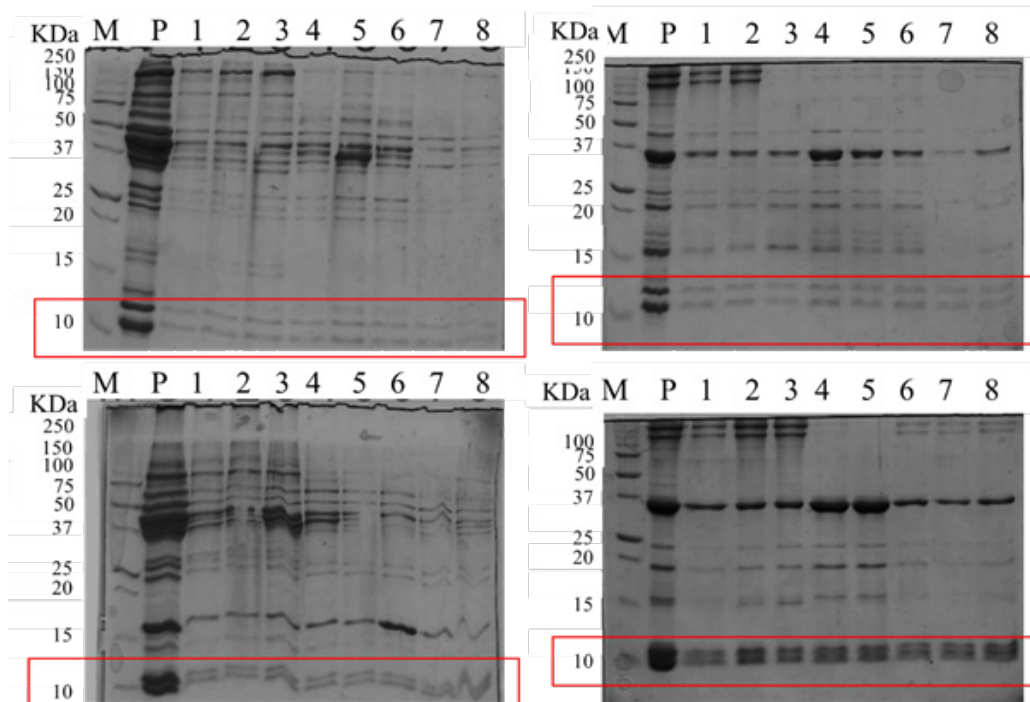


Figure 2 SDS-PAGE results of protein profile from fresh catfish (A), cooked catfish (B), fresh fresh gourami (C) and cooked gourami (D). M = protein marker; P = catfish crude protein; G = gourami crude protein, amonium sulfat saturation, 1 = 20-30%, 2 = 30-40%, 3 = 40-50%, 4 = 50-60%, 5 = 60-70%, 6 = 70-80%, 7 = 80-90%, 8 = 90-100%. Red boxes indicate parvalbumin

Gambar 2 Hasil analisis profil protein ikan patin segar (A) dan ikan patin masak (B) ikan gurami (C) dan ikan gurami masak (D). M = protein marker; P = ekstrak kasar protein patin; G = ekstrak kasar protein gurame. Saturasi amonium sulfat, 1 = 20-30%, 2 = 30-40%, 3 = 40-50%, 4 = 50-60%, 5 = 60-70%, 6 = 70-80%, 7 = 80-90%, 8 = 90-100%. Kotak merah menunjukkan pita protein parvalbumin



yang baik, dan dapat mudah dihilangkan dengan dialisis larutan protein dalam buffer atau air (Eursakun *et al.*, 2012). Presipitasi amonium sulfat memanfaatkan prinsip *salting in* dan *salting out*. Protein akan larut dengan penambahan konsentrasi garam rendah (<0,15 M), efek ini disebut sebagai *salting in*. Konsentrasi garam yang ditambahkan lebih tinggi, maka kelarutan protein umumnya menurun dan menyebabkan presipitasi, efek ini disebut *salting out* (Green & Hughes, 1955).

Presipitasi amonium sulfat didasarkan pada kelarutan protein, penambahan amonium sulfat dapat mengurangi jumlah pelarut yang dapat berinteraksi dengan molekul protein dalam larutan. Kelarutan protein juga berkaitan dengan berat molekul protein, komponen dengan berat molekul yang lebih rendah memiliki kelarutan yang tinggi. Amonium sulfat dengan saturasi yang lebih rendah akan mengendapkan protein dengan berat molekul yang tinggi (Sha *et al.*, 2014). Hal ini sesuai dengan hasil uji SDS-PAGE pada *Figure 2* yang menunjukkan adanya pita-pita protein dengan berat molekul tinggi pada hasil purifikasi protein dengan saturasi yang rendah.

Protein dengan berat molekul yang tinggi makin menurun konsentrasinya seiring dengan peningkatan saturasi amonium sulfat. Hal ini dibuktikan dengan menurunnya jumlah pita protein dengan berat molekul >15 kDa mulai dari rentang saturasi amonium sulfat 50-60% hingga 90-100%. Saturasi amonium sulfat terpilih pada sampel ikan patin dan gurami dengan perlakuan segar,

yaitu 80-90%, sedangkan pada perlakuan masak, yaitu 90-100%. Hasil penelitian Sun *et al.* (2019) pada sampel protein otot ikan japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) menggunakan saturasi amonium sulfat 60-90%.

Sampel ekstrak filet patin dan daging gurami dengan perlakuan tidak masak menunjukkan adanya pita protein yang berjumlah lebih dari 20 pita protein. Pita protein mengalami penurunan pada sampel ekstrak filet patin dan daging gurami masak. Pita protein makin menurun jumlahnya secara signifikan pada ekstrak filet patin dan daging gurami hasil purifikasi. Pita parvalbumin ditunjukkan pada tiga isoform dengan berat molekul antara 10-14 kDa. Berat molekul parvalbumin yang diperoleh dari uji SDS-PAGE pada kedua sampel, ikan patin dan ikan gurami sesuai dengan hasil penelitian Sun *et al.* (2019) pada parvalbumin dari otot ikan japanese flounder. Parvalbumin murni ditunjukkan dengan hasil uji SDS-PAGE yang memperoleh tiga isoform parvalbumin dengan berat molekul 11-14 kDa.

Figure 3 menunjukkan bahwa perlakuan pemasakan tidak menghilangkan protein parvalbumin. Parvalbumin memiliki stabilitas termal yang tinggi, sebagian besar protein telah terdenaturasi dan terkoagulasi setelah dipanaskan. Perlakuan pemanasan ditujukan untuk memperoleh kemurnian parvalbumin yang tinggi karena proses pemanasan dapat menghilangkan lemak dan zat lipid lain pada protein sarkoplasma (Yu *et al.*, 2015).

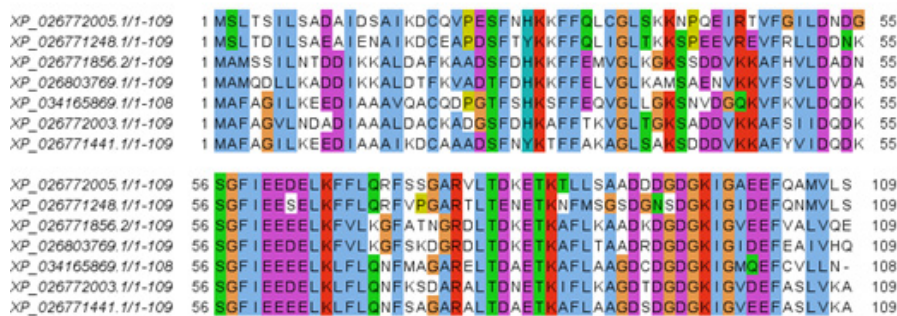


Figure 3 Sequence alignment of catfish parvalbumins
 Gambar 3 Hasil penyejajaran sekuens parvalbumin dari ikan patin

Penentuan Struktur Parvalbumin dari Ikan Patin dan Ikan Gurame

Berdasarkan penelusuran pangkalan data hasil sekuensing genom dari ikan patin yang berasal dari Indonesia, diketahui terdapat tujuh jenis parvalbumin yang terdistribusi di 3 kromosom (Table 1). Panjang sekuens protein parvalbumin ini berkisar 108-109 asam amino. Penelitian Ruethers *et al.* (2021) menemukan bahwa 2 sekuens parvalbumin, yaitu XP_026772003.1 dan XP_026803769.1 diekspresikan dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan parvalbumin lainnya. Protein ini juga dapat mengikat antibodi IgE, yang merupakan biomarker penyakit alergi. Perbandingan ketujuh sekuens parvalbumin tersebut menunjukkan keberagaman sekuens

dan tergambarkan dalam bervariasinya jajaran asam amino di ke-7 sekuens parvalbumin tersebut (Figure 3). Nilai kemiripan tertinggi adalah sebesar 73,39% dan terendah 44,95%. Dari nilai kemiripan ini diketahui bahwa reaktivitas parvalbumin dalam menyebabkan alergi sangat bervariasi. Protein XP_026772003.1 bereaksi dengan 44% pasien alergi ikan, sedangkan XP_026803769.1 hanya bereaksi dengan 10% pasien alergi ikan (Ruethers *et al.*, 2021).

Sekuens protein parvalbumin ikan gurami belum dilaporkan saat ini. Namun, hasil penelusuran spesies yang memiliki kekerabatan dekat dengan gurami, yaitu *Anabas testudineus* (ikan betok) yang menunjukkan 5 tipe parvalbumin (Table 2).

Table 1 Identity of parvalbumin sequences of catfish obtained from database

Tabel 1 Identitas sekuens parvalbumin ikan patin yang didapatkan dari pangkalan data

#Name	Accession	Protein product	Length	Protein name
chromosome 25	NC_047619.1	XP_026803769.1	109	parvalbumin-7
chromosome 12	NC_047606.1	XP_026771248.1	109	parvalbumin 9
chromosome 12	NC_047606.1	XP_026771441.1	109	parvalbumin-2
chromosome 13	NC_047607.1	XP_026771855.2	109	parvalbumin 6
chromosome 13	NC_047607.1	XP_026771856.2	109	parvalbumin 6
chromosome 13	NC_047607.1	XP_026772005.1	109	parvalbumin 8
chromosome 13	NC_047607.1	XP_026772003.1	109	parvalbumin 4
chromosome 13	NC_047607.1	XP_026772007.1	108	parvalbumin 5
chromosome 13	NC_047607.1	XP_034165869.1	108	parvalbumin 5

Table 2 Sequence identity of parvalbumins from *A. testudineus* obtained from database

Tabel 2 Identitas sekuens parvalbumin ikan *A. testudineus* yang didapatkan dari pangkalan data

#Name	Accession	Protein product	Length	Protein name
chromosome 19	NC_046628.1	XP_026208007.1	109	parvalbumin 3
chromosome 19	NC_046628.1	XP_026207250.1	109	parvalbumin 9
chromosome 8	NC_046617.1	XP_026216373.1	108	parvalbumin 5
chromosome 8	NC_046617.1	XP_026216379.1	108	parvalbumin 5
chromosome 8	NC_046617.1	XP_026216387.1	108	parvalbumin 5
chromosome 8	NC_046617.1	XP_026211852.1	109	parvalbumin 8
chromosome 8	NC_046617.1	XP_026219281.1	109	parvalbumin 6
chromosome 8	NC_046617.1	XP_026219360.1	109	parvalbumin 6
chromosome 8	NC_046617.1	XP_026219439.1	109	parvalbumin 6
chromosome 8	NC_046617.1	XP_026219515.1	109	parvalbumin 6



Figure 4 Sequence alignment of parvalbumins from *Anabas testudineus*

Gambar 4 Hasil penjajaran sekuens parvalbumin dari ikan *Anabas testudineus*

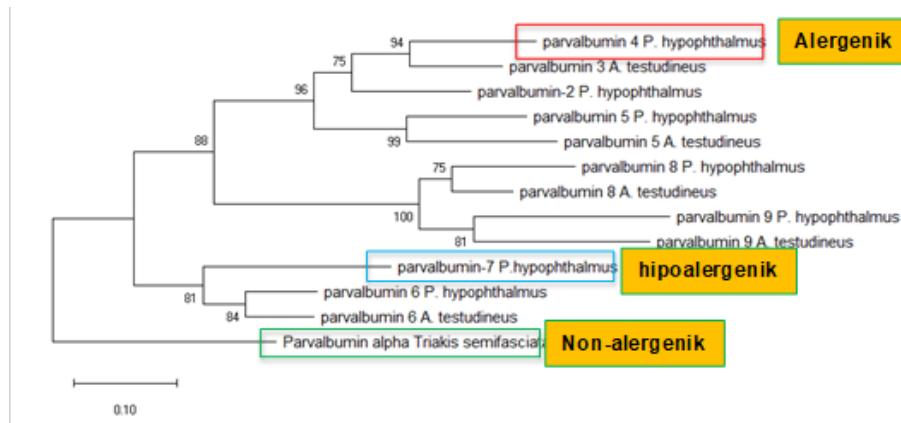


Figure 5 Phylogenetic tree of parvalbumin sequences from catfish and *A. testudineus*

Gambar 5 Pohon filogenetik sekuens-skuens parvalbumin dari ikan patin dan *A. testudineus*

Hasil penyejajaran menggunakan Clustal Omega menunjukkan bahwa kelima sekuens parvalbumin ini juga memiliki kemiripan yang rendah (Figure 4). Hasil penelitian memperlihatkan hanya 2 tipe parvalbumin yang terdeteksi, namun belum diketahui sekuens yang mendominasi.

Analisis filogenetik terhadap sekuens-skuens parvalbumin ikan patin dan *Anabas testudineus* memperlihatkan terjadinya klusterisasi yang dapat dihubungkan dengan reaktivitas parvalbumin terhadap IgE (Figure 5). Parvalbumin 4 dari patin yang memiliki reaktivitas tinggi terhadap IgE terpisah sangat jauh dari parvalbumin 7 yang reaktivitasnya rendah. Parvalbumin 3 dari *A. testudineus* dari klusterisasi ini diketahui mengelompok dengan parvalbumin -4 sehingga diduga parvalbumin 3 *A. testudineus* memiliki reaktivitas yang hampir sama dengan parvalbumin 4 *P. hypophthalmus*.

KESIMPULAN

Purifikasi parvalbumin menggunakan metode presipitasi amonium sulfat berhasil

dilakukan pada ikan patin dan ikan gurami meskipun belum memperoleh hasil dengan tingkat kemurnian 100%. Saturasi amonium sulfat terpilih pada purifikasi sampel ikan patin dan gurami segar 80-90% dan perlakuan perebusan adalah 90-100%. Profil parvalbumin pada ikan patin dan gurami ditunjukkan pada hasil uji SDS-PAGE yang memperoleh isoform dengan berat molekul berkisar antara 10-14 kDa. Berdasarkan analisis bioinformatika terdapat 7 sekuens parvalbumin untuk ikan patin, tetapi tidak ditemukan pada ikan gurami. Sekuens parvalbumin ikan patin dengan kode XP_026772003.1 (Parvalbumin 4) memiliki kemiripan yang tinggi dengan parvalbumin dari spesies lain misalnya salmon dan tilapia yang terbukti alergenik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Institut Pertanian Bogor melalui pendanaan Program Hibah Dosen Muda dengan nomor kontrak: 5529/IT.L1/PT.01.03/M/T/2021 atas nama Roni Nugraha, S.Si, M.Sc, Ph.D.

DAFTAR PUSTAKA

- Association of Official Analytical Chemist [AOAC]. (1980). Official Method of Analysis of The association of Official Analytical of Chemist.
- Ayala, M. D., Albors, O. L., Blanco, A., Alcazar, G., Abellan, E., Zarzosa, G. R., & Gil, F. (2005). Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture*, 250, 215-231. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.057>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(2), 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Chan, E. L., Nakai, S., & Wood, D. F. (1985). Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle protein: effects of heating, freezing, pH and species. *Journal of Food Science*, 50(4), 1034-1040. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13006.x>
- Candra, Y., Setiawati, A., & Rengganis, I. (2011). The level of sensitivity of food allergens. *Makara Journal of Health Research*, 15(1), 44-50. <https://doi.org/10.7454/msk.v15i1.797>
- Dramburg, S., Hilger, C., Santos, A. F., de Las Vecillas, L., Aalberse, R. C., Acevedo, N., ... & Hoffmann-Sommergruber, K. (2023). EAACI molecular allergology user's guide 2.0. *Pediatric Allergy and Immunology*, 34, 1-386. <https://doi.org/10.1111/pai.13854>
- Eursakun, S., Simsiriwong, P., & Ratanabanangkoon, K. (2012). Studies on the fractionation of equine antivenom IgG by combinations of ammonium sulfate and caprylic acid. *Toxicon*, 60(6), 1022-1029. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.005>
- FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action. Rome.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607
- Green, A. A., & Hughes, W. L. (1955). Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods Enzymol*, 1, 67-90.
- Gultom, O. W., Lestari, S., & Nopianti, R. (2015). Analisis proksimat, protein larut air dan protein larut garam pada beberapa jenis ikan air tawar Sumatera Selatan. *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*, 4(2), 120-127. <http://dx.doi.org/10.36706/fishtech.v4i2.3506>
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259): 680-685.
- Keshavarz, B., Jiang, X., Hsieh, Y. H. P., & Rao, Q. (2019). Matrix effect on food allergen detection-a case study of fish parvalbumin. *Food Chemistry*, 274, 526-234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.138>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). Mega11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2024). Angka Konsumsi Ikan. <https://portaldata.kkp.go.id/portals/data-statistik/aki/tbl-dinamis> (diakses 10 Desember 2024).
- Le, T. T. K., Tran, T. T. B., Ho, H. T. M., Vu, A. T. L., McBryde, E., & Lopata, A. L. (2020). The predominance of seafood allergy in Vietnamese adults: Results from the first population-based questionnaire survey. *World Allergy Organization Journal*, 13(3), 100102. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100102>
- Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Beyer, K., Bindslev-Jensen, C., Cardona, V., Dubois, A., duToit, G., Eigenmann, P., Rivas, M. F., Halken, S., Hickstein,



- L., *et al.*, (2014). EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*, 69(8), 1008-1025. <https://doi.org/10.1111/all.12429>
- Njinkoue, J. M., Gouado, I., Tchoumboungang, F., Nguenguim, J. H. Y., Ndinteh, D. T., Fomogne-Fodjo, C. Y., & Schweigert, F. J. (2016). Proximate composition, mineral content and fatty acid profile of two marine fishes from Cameroonian coast: *Pseudotolithus typus* (Bleeker, 1863) and *Pseudotolithus elongatus* (Bowdich, 1825). *NFS Journal*, 4, 27-31.
- Nugraha, R., Ruethers, T., Johnston, E. B., Rolland, J. M., O'Hehir, R. E., Kamath, S. D., & Lopata, A. L. (2021). Effects of extraction buffer on the solubility and immunoreactivity of the pacific oyster allergens. *Foods*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/foods10020409>
- Nugraha, R., Pamingkas, I. D., Pertiwi, R. M., & Nurhayati, T. (2020). Penurunan kandungan protein penyebab alergi pada proses pembuatan surimi ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3), 558-565.
- Nurjanah, Taufiqurrahman., & Muryanto, T. N. (2010). Komposisi kimia dan vitamin A, B₁, B₂, B₃ daging ikan gurami (*Ospbronemous gouramy*) pada berbagai ukuran. *Jurnal Sumberdaya Perairan*, 4(1), 10-13.
- Olagunju, A., Muhammad, A., Mada, S. B., Mohammed, A., Mohammed, H. A., & Mahmoud, K. T. (2012). Nutrient composition of *Tilapia zilli*, *Hemi synodontis membranacea*, *Clupea harengus* and *Scomber scombrus* consumed in Zaria. *World Journal Life Science and Medical Research*, 2(16), 1-4.
- Qixing, J., Zhengran, M., Shuoshuo, W., Yanshun, X., Fengyu, T., Xueqin, X., Peipei, Y., & Wenshui, X. (2014). Effect of temperature on protein compositional changes of big head carp (*Aristichthys nobilis*) muscle and exudates. *Food Science and Technology Research*, 20(3), 655-661.
- Ruethers, T., Ruethers, T., Taki, A. C., Johnston, E. B., Nugraha, R., Le, T. T. K., Kalic, T., McLean, T. R., Kamath, S. D., & Lopata, A. L. (2018). Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens. *Molecular Immunology*, 100, 28-57. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.04.008>
- Ruethers, T., Taki, A. C., Nugraha, R., Cao, T. T., Koeberl, M., Kamath, S. D., Williamson, N. A., O'Callaghan, Sean., Nie, S., Mehr, S. S., Campbell, D. E., & Lopata, A. L. (2018). Characterization of Rask 1 a novel major allergen in Indian mackerel and identification of parvalbumin as the major fish allergen in 33 Asia-Pacific fish species. *Clinical & Experimental Allergy*, 48(4), 452-463. <https://doi.org/10.1111/all.13748>
- Ruethers, T., Taki, A. C., Nugraha, R., Cao, T. T., Koeberl, M., Kamath, S. A., Williamson, N. A., O'Callaghan, Sean., Nie, S., Mehr, S. S., Campbell, D. E., & Lopata, A. L. (2019). Variability of allergens in commercial fish extracts for skin prick testing. *Allergy*, 74, 1352-1363. <https://doi.org/10.1111/all.13748>
- Ruethers, T., Taki, A. C., Karnaneedi, S., Nie, S., Kalic, T., Dai, D., Daduang, S., Leeming, M., Williamson, N. A., Breiteneder, H., Mehr, S. S., Kamath, S. D., Campbell, D. E., & Lopata, A. L. (2021). Expanding the allergen repertoire of salmon and catfish. *Allergy*, 76, 1443-1453.
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., ... Sherry, S. T. (2022). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 50(D1), D20-D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Setiawati, M., Sakinah, A., & Jusadi, D. (2015). Evaluasi pertumbuhan dan kualitas daging *Pangasianodon hypophthalmus* yang diberi pakan mengandung daun *Cinnamomum burmanni*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 14(2), 171-178. <https://doi.org/10.17844/jphpi>

- v23i1.31064
- Sha, X. M., Tu, Z. C., Liu, W., Wang, H., Shi, Y., Huang, T., & Man, Z. Z. (2014). Effect of ammonium sulfate fractional precipitation on gel strength and characteristics of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scale. *Food Hydrocolloids*, 36, 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.024>
- Soedarini, B., & Octavia, E. T. P. (2024). A literature review of allergen properties in fish collagen and its derivative products. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(8), 719-739. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v27i8.49736>
- Stephen, J. N., Sharp, M. E., Ruethers, T., Taki, A., Campbell, D. E., & Lopata, A. L. (2017). Allergenicity of bony and cartilaginous fish - molecular and immunological properties. *Clinical & Experimental Allergy*, 47(3), 300-312. <https://doi.org/10.1111/cea.12892>
- Sun, L., Xu, L., Huang, Y., Lin, H., Ahmed, I., & Li, Z. (2019). Identification and comparison of allergenicity of native and recombinant fish major allergen parvalbumins from japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Food & Function*, 10, 1-9.
- Wulan, N. L. N., Palupi, N. S., Kusnandar, F., & Wulandari, N. (2024). Pengaruh proses autoklaf dalam pembuatan bubuk udang windu (*Penaeus monodon*) dan puffing snack hipoalergenik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(2), 142-158. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v27i2.50620>
- Yu Y, Guan R, Lu Y, Xu G, Wang Y, Pan J. 2015. Isolation, purification and identification of parvalbumin allergen in *Cyprinus carpio*. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 8(2): 140-145