

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Alat Yang Digunakan

- Spektrometri UV
- Ultracentrifuga OTD Combi
- Inkubator 37°C
- Termostat
- Membran dialisis
- Magnet stirrer
- Tabung reaksi
- Erlenmeyer
- Beker gelas
- Labu ukur
- Gelas ukur
- pH meter
- Neraca
- Pengaduk kaca
- Corong gelas
- Pipet transfer
- Pipet tetes
- Ruang dingin

#### 3.2. Bahan Yang Digunakan

- Limbah fermentasi alkohol dari PT Perindustrian  
Bapak Djenggot
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (p.a.)
- Celit (teknis)

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (p.a.)
- $\text{CH}_3\text{COOH}$  (p.a.)
- $\text{Na}_2(\text{EDTA})$  (p.a.)
- Bentonit (teknis)
- Buffer Tris (Tris hidroksimetil amino metan) (p.a.)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (p.a.)
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (p.a.)
- Kresol merah (p.a.)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (p.a.)
- $\text{Na}_2 \text{ATP}$  (p.a.)
- $\text{NaOH}$  (p.a.)
- Glisilglisin (p.a.)
- Glukosa (p.a.)
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (p.a.)
- Kalium natrium tartrat (p.a.)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (p.a.)
- Folin (p.a.)
- Serum albumin (p.a.)
- Akuades

### 3.3. Preparasi Larutan

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M

Ditimbang 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidrat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 ml larutan. (11)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M

Ditimbang 2,84 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidrat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 ml larutan. (11)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,3 M

Ditimbang 4,259 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidrat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 ml larutan. (11)

$\text{CH}_3\text{COOH}$  3 N

Ditimbang 42,6 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  pekat (17,6 M) diencerkan dengan akuades sehingga diperoleh 250 ml larutan. (11)

Buffer fosfat 0,1 M

Ditimbang 1,74 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dan 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 150 ml larutan. (12)

Buffer fosfat 0,05 M

Ditimbang 5,31 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dan 2,66 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1000 ml larutan. (5)

Tris 0,05 M

Ditimbang 6,057 g Tris (BM = 121,14) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1000 ml larutan. (12)

$\text{NaOH}$  0,1 M

Ditimbang 2 g  $\text{NaOH}$  (BM = 40) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 500 ml larutan. (11)

$\text{NaOH}$  0,01 N

Ditimbang 0,4 g  $\text{NaOH}$  dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1000 ml larutan. (11)

$\text{Na}_2(\text{EDTA})$  0,002 M

Ditimbang 0,744 g  $\text{Na}_2(\text{EDTA})\cdot\text{H}_2\text{O}$  (BM = 372,25) dilarutkan

dengan akuades sehingga diperoleh 1000 ml larutan. (13)

$\text{Na}_2(\text{EDTA})$  0,001 M

Ditimbang 0,372 g  $\text{Na}_2(\text{EDTA})$  dihidrat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1000 ml larutan. (13)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M

Ditimbang 13,609  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (BM = 136,089) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 ml larutan. (11)

Kresol merah 0,006 %

Ditimbang 0,09 g kresol merah dilarutkan dengan 0,01 N NaOH sehingga diperoleh 1500 ml larutan homogen. (14)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,6 %

Ditimbang 1,6 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 ml larutan. (11)

Disodium ATP 0,1 M

Ditimbang 0,551 g disodium ATP (BM = 551,15) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 10 ml larutan. (15)

Glukosa 0,2 M

Ditimbang 0,9 g glukosa anhidrat (BM = 180,16) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 25 ml larutan. (11)

Glisilglisin 0,1 M-NaOH. pH 7

Ditimbang 0,33 g glisilglisin dilarutkan dengan 15 ml akuades dan ditambah NaOH 0,1 M sampai pH 9, kemudian diencerkan sehingga diperoleh 25 ml larutan. (16)

### 3.4. Cara Kerja

#### 3.4.1. Preparasi enzim

##### a. Preparasi ekstrak kasar<sup>(5)</sup>

1. Limbah fermentasi alkohol disentrifuga 10.000 rpm 10 menit 4°C, endapan dipisahkan.
2. Dari 33,3 g endapan yang diperoleh disuspensikan dengan 100 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; 0,2 M dan 0,3 M dan campuran diinkubasikan pada 37°C selama 3 jam.
3. Kemudian campuran disentrifuga 14.000 rpm 30 menit 4°C dan ekstrak kasar bersih dipisahkan.
4. Ekstrak kasar disuspensikan dengan 13,6 g celit.

##### b. Fraksi amonium sulfat

1. Ekstrak kasar suhunya dinaikkan hingga 25°C dan secara perlahan-lahan ditambahkan CH<sub>3</sub>COOH 3 N sehingga pH menjadi 4,4.
2. Didinginkan dalam air es dan disentrifuga pada 10.000 rpm 10 menit 4°C, endapan yang terbentuk dipisahkan.
3. Dengan perlahan-lahan ditambahkan 24,3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> padat (0-40 % jenuh) untuk setiap 100 ml larutan supernatan.
4. Larutan disentrifuga pada 10.000 r.p.m. 10 menit 4°C, endapan yang terjadi dipisahkan.
5. Selanjutnya untuk setiap 100 ml larutan supernatan jernih ditambah 9,7 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> padat (40-55 %

jenuh).

6. Larutan disentrifuga pada 10.000 r.p.m. 10 menit 4°C, endapan yang terjadi dipisahkan lagi.
7. Masing-masing endapan yang terbentuk dari 0-40 % jenuh dan 40-55 % jenuh dilarutkan dengan akuades dingin hingga volume 4 ml.
8. Kedua larutan hasil ditempatkan dalam membran dialisis yang telah dicuci dengan akuades pada 60°C dan didialisis dengan 300 ml buffer fosfat 0.05 M, pH 7 selama 24 jam dan tiap 4 jam larutan buffer fosfat diganti dengan yang baru.
9. Setelah dialisis selesai, larutan disentrifuga pada 10.000 r.p.m. 10 menit 4°C dan endapan inaktif yang terjadi dipisahkan.
10. Larutan supernatan dilarutkan dengan 4 ml buffer fosfat 0,05 M, pH 7.

c. Adsorbsi bentonit

1. Larutan supernatan ditambah dengan 0,288 g bentonit dan diaduk selama 1 jam, selanjutnya disentrifuga pada 14.000 r.p.m. 10 menit 4°C.
2. Residu bentonit yang mengandung heksokinase dicuci dalam 300 ml buffer fosfat 0,05 M, pH 7 dan disentrifuga pada 14.000 r.p.m. 10 menit 4°C.
3. Residu bentonit bersih disuspensikan dalam 300 ml Tris 0,05 M : Na<sub>2</sub>(EDTA) 0,001 M dengan perbandingan 1:1.

4. Larutan disentrifuga pada 14.000 r.p.m. 30 menit 4°C dan larutan supernatan dipisahkan.

d. Kristalisasi

1. Larutan supernatan ditambah dengan larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  hingga pH 4,4.

2. Tiap 100 ml larutan ditambah dengan 51,6 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  padat (0-75 % jenuh) dan disentrifuga pada 14.000 r.p.m. 10 menit 4°C, endapan yang terjadi dikumpulkan.

3. Endapan dilarutkan dalam 5 ml buffer fosfat 0,1 M -  $\text{Na}_2(\text{EDTA})$  0,002 M, pH 7 dan disentrifuga pada 14.000 r.p.m. 30 menit 4°C, zat-zat gelatin yang tak larut dipisahkan.

4. Untuk kristalisasi, larutan supernatan bersih ditambah dengan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  jenuh hingga mempunyai turbiditas rendah.

5. Larutan diaduk selama 1,5 jam, selanjutnya ditempatkan pada 4°C.

6. Kristalisasi ternyata tidak terbentuk setelah 14 hari.

3.4.2. Pembuatan larutan penguji<sup>(5)</sup>

1. Dibuat campuran 7 ml kresol merah 0,006 %,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,6 % ditambah 1,5 ml ATP 0,1 M, dinetralkan dengan NaOH 0,1 M.

2. Larutan campuran di atas ditambah 3 ml glisilglisin 0,1 M - NaOH, pH 9, kemudian dilarutkan dengan

akuades hingga 30 ml. Larutan harus disiapkan baru setiap kali dipakai.

### 3.4.3. Pengujian aktivitas enzim<sup>(5)</sup>

Sebanyak 2,5 ml larutan uji ditambah 0,4 ml glukosa 0,2 M dan 0,1 ml enzim pada 30°C kemudian diukur serapannya pada 560 nm.

Untuk tiap-tiap langkah dalam preparasi enzim dilakukan pengujian terhadap aktivitas enzim.

### 3.4.4. Penentuan kadar protein Lowry<sup>(17)</sup>

#### a. Pembuatan reagen Lowry

1. Lowry A : 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ditambah 0,4 g NaOH dan 0,02 g kalium natrium tartrat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 ml larutan.
2. Lowry B : 0,15 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 25 ml larutan.
3. Lowry C : 50 bagian Lowry A ditambah 1 bagian Lowry B (harus disiapkan baru).
4. Folin : Folin 1 bagian dan akuades 1 bagian (harus disiapkan baru).

#### b. Prosedur pengujian

1. 0,6 ml larutan sampel ditambah 3 ml Lowry C.
2. Diinkubasikan selama 20 menit pada suhu kamar.
3. Ditambah 0,3 ml larutan folin dengan cepat.
4. Didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali digojok.
5. Dicari panjang gelombang maksimum untuk larutan



standar protein.

6. Serapan dibaca pada panjang gelombang maksimum.
7. Untuk kurva standar, disiapkan larutan standar serum albumin dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

