

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

1. Labu ukur
2. Beker gelas
3. Gelas ukur
4. Pipet tetes
5. Botol-botol kecil
6. Pipet ukur
7. Erlenmeyer
8. Neraca Listrik merek Kern 870
9. pHmeter merek Orion tipe 420A
10. Kolom kromatografi
11. Statif dan klem
12. Spektrofotometer UV-Vis tipe 1201 merek Shimadzu

3.1.2 Bahan

1. Aquabides dari Lab. KA-UGM
2. HCl pa
3. NaOH

4. Asam Sitrat
5. Na_2HPO_4
6. Alumina Netral ✓
7. Lisozim standar (EC 3.2.1.17) Bio Sigma Science No. L-7651
8. Isolat bakteri streptomyces
9. Madu

3.2 Preparasi

1. Larutan Na_2HPO_4 0,1M

Sebanyak 1,42 gram kristal Na_2HPO_4 ditimbang dengan neraca listrik dilarutkan dalam aquades dengan labu ukur sehingga diperoleh 100 mL larutan.

2. Larutan Na_2HPO_4 0,5 M

Sebanyak 7,1 gram kristal Na_2HPO_4 ditimbang dengan neraca listrik dilarutkan dalam aquades dengan labu ukur sehingga diperoleh 100 mL larutan.

3. Larutan Asam Sitrat 0,1 M

Sebanyak 2,10 gram kristal Asam Sitrat ditimbang dengan neraca listrik dilarutkan dalam aquades dengan labu ukur sehingga diperoleh 100 mL larutan.

4. Larutan NaOH 6M

Sebanyak 24 gram kristal NaOH ditimbang dengan neraca listrik dilarutkan dalam aquades dengan labu ukur sehingga diperoleh 100 mL larutan.

5. Larutan NaCl 9%

Sebanyak 0,09 gram kristal NaCl ditimbang dengan neraca listrik dilarutkan dalam aquades dengan labu ukur sehingga diperoleh 100 mL larutan.

6. Resin Penukar Kation

Sebanyak 5 gram resin Alumina ditimbang dengan neraca listrik lalu dimasukkan dalam beker gelas, ditambahkan aquades kedalam beker gelas kemudian diaduk sampai terbentuk bubur yang homogen. Bubur dimasukkan ke dalam kolom yang sudah diisi glasswool dan aquades secara perlahan. Resin dibiarkan mengendap. Resin dicuci dengan HCl 2M kemudian dengan aquades, setelah itu dicuci dengan NaOH 6M kemudian dengan aquades. Resin disetimbangkan dengan mengalirkan buffer fosfat pada pH 8.

7. Lisozim standar

Sebanyak 2 mg lisozim ditimbang dengan neraca listrik, dan dilarutkan dalam 2 mL aquabides (larutan A).

- a. 0,1 mL larutan A diencerkan dengan 2,9 mL NaCl 9% (larutan B)
- b. Sebanyak 0,5 mL larutan B diencerkan dengan 0,5 mL aquabides (standar 1)
- c. Sebanyak 0,25 mL larutan B diencerkan dengan 0,75 mL aquabides (standar 2)
- d. Sebanyak 0,25 mL larutan B diencerkan dengan 1,75 mL aquabides (standar 3)
- e. Sebanyak 0,25 mL larutan B diencerkan dengan 3,75 mL aquabides (standar 4)
- f. Sebanyak 0,25 mL larutan B diencerkan dengan 7,75 mL aquabides (standar 5)

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Isolasi Lisozim

Sampel madu yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam kolom kromatografi penukar kation, Sebanyak 150 mL buffer fosfat 0,1M pada pH 7,5 dialirkan ke dalam kolom.

Eluat yang keluar ditampung dan diuji dengan spektrofotometer UV-Vis. Isolasi lisozim dilakukan dengan mengalirkan sebanyak 150 mL larutan buffer fosfat 0,5 M pada pH 8 kedalam kolom, setiap 20 mL eluat ditampung di dalam botol kecil dan dilakukan uji aktivitas lisozim.

3.2.2 Pengukuran aktivitas larutan Lisozim standar

Sebanyak 3 mL suspensi bakteri Streptomyces dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambahkan 1 mL larutan standar 1 dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 565 nm, diamati perubahannya setiap 30 detik selama 480 detik. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk larutan standar 2 sampai larutan standar 5.

3.2.3 Pengukuran aktivitas eluat (sampel madu)

Sebanyak 3 mL suspensi Streptomyces dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambahkan 1 mL eluat hasil isolasi, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 565 nm dan diamati perubahannya setiap 30 detik selama 480 detik.