

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

- Spektrofotometer UV - Vis (Shimadzu - 1201)
- Sentrifuga (Centrific - 228)
- Blender (Makita)
- Membran Selopan
- pH meter (Orion-420 A)
- Neraca Analitik (Kern 870)
- Erlenmeyer
- Gelas Ukur
- Magnetik Stirrer (Quart)
- Shaker (TS-330 A)
- Corong Gelas
- Gelas Beaker
- Kertas Saring
- Kertas Tisu
- Labu Takar
- Pengaduk
- Pipet Tetes
- Termometer
- Penangas
- Kaki Tiga
- Wadah Aluminium

- Tabung Reaksi

- Termos Es

3.1.2 BAHAN

- Jamur Merang (500 gr)

- Kentang (500 gr)

- Natrium Hidroksida 0,1 M (p.a.)

- Aseton (p.a.)

- Akuades

- Natrium Karbonat (p.a.)

- Natrium Kalium Tartrat (p.a.)

- Kupri Sulfat Pentahidrat (p.a.)

- Folin Ciocalteu (p.a.)

- Dinatrium Monohidrofosfat (p.a.)

- Natrium Dihidrofosfat (p.a.)

- Amonium Sulfat kristal (p.a.)

- Serum Albumin

- L-Tirosin

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Preparasi Larutan

1. Larutan NaOH 1 M

Sebanyak 4 g Natrium Hidroksida dilarutkan dengan akuades sehingga menjadi 1000 mL larutan.

2. Larutan L-Tirosin

Sebanyak 0,128 g L-Tirosin dilarutkan dengan akuades sehingga menjadi 100 mL larutan.

3. Larutan Standar Serum Albumin

Larutan Standar Serum Albumin (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, dan 300 μ gram / mL), 0,2 gram serum albumin dilarutkan dengan akuades sehingga menjadi 100 mL (2000 μ gram/mL), dari larutan ini kemudian diencerkan untuk membuat konsentrasi di atas.

4. Larutan Lowry A.

Dilarutkan 20 gram Natrium Karbonat, 4 gram Natrium Hidroksida dan 0,2 gram Natrium Kalium Tartrat dengan akuades sehingga menjadi 1000 mL larutan.

5. Larutan Lowry B.

Dilarutkan 0,6 gram Kupri Sulfat pentahidrat dengan akuades sehingga menjadi 200 mL larutan.

6. Lowry C.

Campuran antara Lowry A dengan Lowry B dengan perbandingan 50 : 1.

7. Larutan Folin.

Dilarutkan dengan akuades dengan perbandingan 1 : 1

8. Larutan Buffer Fosfat 0,05 M

Ditimbang 2,655 g Dinatrium monohidrofosfat dan 1,33 g Natrium Dihidrofosfat lalu dilarutkan dengan akuades sehingga menjadi 500 mL larutan.

3.2.2 Perlakuan Sampel

Sampel jamur merang segar ditimbang sebanyak 500 g dan dibersihkan dari jerami serta kotoran lainnya, kemudian

dimasukkan ke dalam blender serta ditambah sedikit demi sedikit aseton sebanyak 300 mL. Blender dihidupkan selama 7 menit atau sampai halus. Setelah homogen kemudian disaring untuk memisahkan ampas dengan larutan. Endapan yang diperoleh ditambah dengan buffer fosfat 0,05 M pH 6,8 sehingga volume larutan 100 mL. Demikian pula halnya dengan kentang.

3.2.3 Isolasi Tirosinase dari Jamur merang dan kentang.

Sebanyak 500 gram jamur dimasukkan ke dalam blender selama 7 menit atau sampai homogen dengan penambahan aseton lalu disaring sehingga terpisah endapan dan filtrat. Kemudian masing-masing supernatan ditambah dengan kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ secara bertingkat dari F1 (0-10 %) F2 (10-20 %), F3 (20-30 %) dan F4 (30-60 %), kemudian diaduk selama 10 menit dengan menggunakan shakker pada 200 rpm. Setelah itu didiamkan sebentar lalu disaring, endapan yang didapat ditambah buffer fosfat dan didialisis selama 12 jam dengan buffer yang sama dan serapan dibaca pada panjang gelombang 280 nm.

3.2.4 Uji Protein

Sebanyak 0,6 mL supernatan ekstrak kasar dan hasil dialisis dengan kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ F1 (0-10 %), F2 (10-20 %) F3 (20-30 %) dan F4 (30-60 %), di tambahkan 3 mL lowry C dan diinkubasikan selama 20 menit pada suhu kamar. Kemudian

ditambahkan 0,3 mL folin dengan cepat dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali dikocok. Serapan dibaca pada panjang gelombang 655 nm.

3.2.5 Uji Aktivitas Unit Enzim

Sebanyak 0,128 gram L-Tirosin dilarutkan dalam akuades sampai 100 mL, tiap 4 mL larutan L-Tirosin ditambah sampel sebanyak 1 mL dengan kontak waktu selama 5 menit, pada suhu 28°C. Kemudian serapannya diukur pada panjang gelombang 475 nm. Kemudian untuk mencari nilai aktivitas unit enzim, absorbansi yang didapat dimasukkan kedalam rumus penentuan aktivitas unit enzim seperti yang tersebut di atas.

3.2.6 Penentuan Panjang Gelombang Optimum Larutan Serum albumin

Larutan standar serum albumin 180 µgram diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600-700 nm sehingga akan didapatkan panjang gelombang optimum.