

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat yang digunakan:

- Gelas ukur
- Erlenmeyer
- Gelas bekkor
- Tabung reaksi
- Labu takar
- Pipet tetes
- Pipet volume
- Pengaduk kaca
- Corong gelas
- Gelas arloji
- Spatula
- Spet 1 ml
- Pisau daging
- Termometer 100 °C
- Botol semprot
- Plastik berperekat
- Neraca analitis merk Kern 870
- Magnetic stirrer merk Nuova

- Picnometer 10 mL
- Sentrifuse 3400 rpm
- Spektrofotometer UV-Vis Shimatzu
- pH-meter

3.1.2. Bahan-bahan yang digunakan:

- Enzim papain p.a
- Asam Askorbat p.a
- Larutan Folin-Ciocalteu p.a
- Serum Bovine Albumin p.a
- Natrium Karbonat p.a
- Natrium-Kalium Tartrat p.a
- Ammonium Sulfat Kristal p.a
- Kupri Sulfat p.a
- Asam Asetat p.a
- Natrium Asetat p.a
- Aquadest
- Daging sapi segar bagian sirloin
- Kertas saring

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang dikonstankan:

- Ukuran sampel
- Konsentrasi papain
- Temperatur inkubasi

3.2.2. Variabel yang bebas:

- Berat sampel
- Waktu inkubasi
- Konsentrasi asam askorbat

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Persiapan sampel

- Daging, dipilih bagian sirloin, dipotong dengan ukuran 1,5 X 1,5 X 5 cm dengan potongan yang sama sebanyak 30 potong.
- Masing-masing potongan ditimbang beratnya.

3.3.2. Perlakuan sampel tanpa papain (Pembeding)

- Sebanyak 6 potong daging disiapkan,
- Potongan pertama ditentukan kadar protein terlarutnya pada 0 jam inkubasi, potongan kedua ditentukan kadar protein terlarutnya setelah 1 jam inkubasi dan potongan ketiga setelah 2 jam inkubasi, sedangkan potongan keempat, kelima dan keenam ditentukan kadar protein terlarutnya setelah 3 jam, 4 jam, dan 5 jam inkubasi pada temperatur 4 °C.

3.3.3. Perlakuan sampel dengan papain

- Sebanyak 6 potong daging diinjeksikan dengan 0,25 mg/mL papain dalam buffer asetat 0,05 M pH 5,0 sebanyak 10 % berat daging.
- Potongan pertama ditentukan kadar protein terlarutnya pada 0 jam inkubasi, potongan kedua setelah 1 jam inkubasi, potongan ketiga setelah 2 jam, dan potongan keempat, kelima dan keenam setelah 3 jam, 4 jam dan 5 jam inkubasi pada temperatur yang sama.

3.3.4. Perlakuan sampel dengan inhibitor

- Sebanyak 18 potong daging disiapkan, kemudian masing-masing diinjeksi dengan 0,25 mg/mL papain dalam buffer asetat sebanyak 10 % berat daging, dan dikelompokkan menjadi 3 bagian.
- 6 potong bagian pertama diinjeksi dengan $2,5 \cdot 10^{-3}$ M asam askorbat dalam buffer asetat, 6 potong bagian kedua dengan $2,5 \cdot 10^{-4}$ M asam askorbat dan 6 potong bagian ketiga dengan $2,5 \cdot 10^{-5}$ M asam askorbat. Inhibitor diinjeksikan dengan cara yang sama sebanyak 10 % berat daging.
- Potongan pertama bagian I, II dan III ditentukan kadar protein terlarutnya pada

inkubasi 0 jam, potongan kedua bagian I, II, dan III ditentukan kadar protein terlarutnya setelah inkubasi 1 jam, potongan ketiga setelah 2 jam, dan potongan keempat, kelima serta keenam ditentukan kadar protein terlarutnya setelah 3 jam, 4 jam, dan 5 jam inkubasi pada 4 °C.

3.3.5. Penentuan kadar protein terlarut

** Preparasi sampel*

- Sampel setelah inkubasi dimasukkan kedalam 10 mL aquadest,
- Sampel diaduk dan digojog selama 3 menit, kemudian daging diangkat.
- Sebanyak 5 mL dari 10 mL larutan didapat kemudian ditambah dengan ammonium sulfat kristal sedikit demi sedikit dengan pengadukan menggunakan magnetic stirer sebanyak 2 gram.
- Selanjutnya disentrifuse selama 15 menit pada 3400 rpm.
- Endapan yang diperoleh kemudian dipisahkan dari larutan jernihnya dan dilarutkan kembali kedalam 5 mL buffer asetat 0,05 M pH 5,0.

* *Analisa dengan metode Lowry*

- Sebanyak 0,6 mL sampel (larutan dalam buffer asetat) ditambahkan 3 mL larutan lowry C, kemudian didiamkan selama 15 menit, selanjutnya ditambahkan 0,3 mL lowry D dengan cepat dan diinkubasi 45 menit dengan sesekali digojog.
- Ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang optimum 725 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

