

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat

- Blender (Makita)
- Sentrifuge (Centrific-228)
- Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1201)
- Neraca analitik (Kern-870)
- pH meter (Orion-420A)
- Kompor listrik (Nuova)
- Magnetik stirer (Quart)
- Penangas
- Seperangkat gelas kimia
- Kain penyaring
- Botol semprot
- Kantong selofan
- Aluminium foil
- Termometer

3.1.2. Bahan

- Hepatopankreas bekicot

- Natrium klorida (p.a)
- Amonium sulfat (p.a)
- Asam asetat glasial (p.a)
- Natrium asetat (p.a)
- Barium hidroksida (p.a)
- Seng sulfat (p.a)
- Kalium Natrium-tartrat (p.a)
- Natrium karbonat (p.a)
- Natrium sulfat (p.a)
- Tembaga sulfat (p.a)
- Asam sulfat pekat (p.a)
- Amonium molybdat (p.a)
- Natrium arsenat (p.a)
- Kertas saring Whatman
- Karboksi metil selulosa (CMC)
- Selobiosa (p.a)
- Natrium hidroksida (p.a)
- Natrium bikarbonat (p.a)
- Bovine serum albumin (p.a)
- Reagen Folin-Ciocalteu (p.a)
- Eceng gondok

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Preparasi larutan

1. Larutan NaCl 1% dingin

Sebanyak 5 gram NaCl dilarutkan dengan aquadest hingga diperoleh 500 mL larutan, kemudian didinginkan.

2. Larutan CH_3COONa 0,05 M

Sebanyak 6,8 gram $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan aquadest hingga diperoleh 1 liter larutan.

3. Larutan CH_3COOH 0,05 M

Sebanyak 2,9 mL asam asetat glasial dilarutkan dengan aquadest hingga diperoleh 1 liter larutan.

4. Larutan buffer asetat 0,05 M dengan pH yang bervariasi

Tabel III.1. Pembuatan larutan buffer asetat 0,05 M

Volume CH_3COOH 0,05 M (X)	Volume CH_3COONa 0,05M (Y)	pH
44,0	6,0	4,0
41,0	9,0	4,2
36,8	13,2	4,4
30,5	19,5	4,6
25,5	24,5	4,8
20,0	30,0	5,0
14,8	35,2	5,2
10,5	39,5	5,4
8,8	41,2	5,6
4,8	45,2	5,8
4,0	46	6,0

Sebanyak X mL larutan CH_3COOH 0,05 M ditambah dengan Y mL larutan CH_3COONa 0,05 M, lalu diencerkan hingga 100 mL.

5. Larutan substrat CMC

Sebanyak 0,5 gram CMC ditambah dengan buffer asetat 0,05 M dengan pH yang bervariasi hingga diperoleh 100 mL larutan.

6. Larutan substrat selobiosa

Sebanyak 0,5 gram selobiosa ditambah dengan buffer asetat 0,05 M; pH 5 hingga diperoleh 100 mL larutan.

7. Larutan Ba(OH)₂ 0,01 M

Sebanyak 0,3153 gram Ba(OH)₂.8H₂O ditambah dengan aquadest hingga diperoleh 100 mL larutan.

8. Larutan ZnSO₄ 0,01 M

Sebanyak 0,2874 gram ZnSO₄.7H₂O ditambah dengan aquadest hingga diperoleh 100 mL larutan.

9. Larutan standar glukosa

Sebanyak 10 mg glukosa dilarutkan dengan aquadest hingga diperoleh 100 mL larutan (10 mg/100 mL), kemudian diencerkan untuk membuat larutan glukosa standar dengan konsentrasi yang bervariasi (0,2 mg/100 mL; 0,4 mg/100 mL; 0,6 mg/100mL; 0,8 mg/100 mL; 1,0 mg/100 mL; 1,2 mg/100 mL; 1,4 mg/100 mL; 1,6 mg/100 mL; 1,8 mg/100 mL; 2,0 mg/100 mL).

10. Larutan standar bovine serum albumin

Sebanyak 0,1 gram bovine serum albumin dilarutkan dengan aquadest hingga diperoleh 100 mL larutan (1000 µg/mL), kemudian diencerkan untuk membuat larutan standar BSA dengan konsentrasi yang bervariasi(90 µg/mL;

180 $\mu\text{g/mL}$; 270 $\mu\text{g/mL}$; 360 $\mu\text{g/mL}$; 450 $\mu\text{g/mL}$; 540 $\mu\text{g/mL}$; 630 $\mu\text{g/mL}$; 720 $\mu\text{g/mL}$; 810 $\mu\text{g/mL}$; 900 $\mu\text{g/mL}$).

11. Larutan Cu-tartrat alkalis

■ Reagen A : 1,2 gram KNa-tartrat; 2,4 gram Na_2CO_3 ; 1,6 gram NaHCO_3 ; 14,4 gram Na_2SO_4 , dilarutkan dengan aquadest hingga 80 mL.

Reagen B : 2 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ditambah dengan 18 gram Na_2SO_4 kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga volumenya 100 mL.

Sebanyak 1 bagian reagen A ditambah dengan 1 bagian reagen B (harus disiapkan baru).

12. Larutan arseno-molybdat

Sebanyak 5 gram amonium molybdat dilarutkan dengan 80 mL aquadest dan ditambah dengan 4,2 mL H_2SO_4 pekat.

0,6 gram $\text{NaHASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan 5 mL aquadest.

Kedua larutan dicampur, kemudian disimpan dalam botol coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

13. Reagen Lowry

Lowry A : 2 gram Na_2CO_3 ; 0,4 gram NaOH ; 0,02 gram KNa-tartrat dilarutkan dengan aquadest hingga diperoleh 100 mL larutan.

Lowry B : 0,15 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan aquadest hingga diperoleh 25 mL larutan.

Lowry C : 50 bagian Lowry A ditambah dengan 1 bagian Lowry B (harus disiapkan baru).

14. Reagen Folin-Ciocalteu

Sebanyak 1 bagian Folin-Ciocalteu ditambah dengan 1 bagian aquadest (harus disiapkan baru).

3.2.2. Penentuan λ optimum larutan standar glukosa

Larutan standar glukosa (1,4 mg/100 mL) diukur absorbansinya pada panjang gelombang 380 - 480 nm hingga diperoleh panjang gelombang optimum dengan absorbansi terbesar.

3.2.3. Pembuatan kurva standar glukosa

Larutan standar glukosa yang konsentrasinya bervariasi diukur absorbansinya pada λ optimum, kemudian dibuat kurva standar dan persamaan kurvanya.

3.2.4. Penentuan λ optimum larutan standar bovine serum albumin

Larutan standar BSA (900 μ g/mL) diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600-700 nm hingga diperoleh panjang gelombang optimum dengan absorbansi terbesar.

3.2.5. Pembuatan kurva standar bovine serum albumin

Larutan standar BSA yang konsentrasinya bervariasi diukur absorbansinya pada λ optimum, kemudian dibuat kurva standar dan persamaan kurvanya.

3.2.6. Isolasi Enzim

A. Ekstraksi

- Sebanyak 35 gram hepatopankreas bekicot ditambah dengan 500 ml larutan NaCl 1% dingin, lalu dihomogenisasi dalam blender pada pH 7 selama 10 menit.
- Homogenat disaring dengan kain pada suhu kamar.
- Filtrat didialisis, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3400 rpm selama 30 menit, dipisahkan antara endapan dan supernatan.
- Supernatan yang diperoleh disebut sebagai ekstrak kasar dan ditentukan aktivitas serta aktivitas spesifiknya dengan menggunakan tiga macam substrat, yaitu kertas saring, CMC dan selobiosa.

B. Fraksinasi dengan garam amonium sulfat

- Amonium sulfat ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan untuk tiap tingkat fraksinasi (dilihat dari tabel atau dari perhitungan).
- Amonium sulfat yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam supernatan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan magnetik stirer secara perlahan dan dilakukan dalam tempat yang sekelilingnya direndam dengan es.
- Campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama 1 malam, lalu disentrifuse hingga diperoleh endapan (0 - 10% jenuh) dan filtrat.
- Filtrat difraksinasi 10 - 20% jenuh, lalu diperlakukan sama. Fraksinasi dilakukan pada 20 - 40% jenuh, 40 - 60% jenuh, 60 - 80% jenuh dan 80 - 100% jenuh.

- Endapan yang diperoleh dari tiap fraksi dilarutkan dengan buffer asetat 0,05 M; pH 5.

C. Dialisis

- Kantong selofan direbus selama 30 menit dengan aquadest.
- Salah satu ujungnya diikat dan diisi dengan larutan enzim..
- Ujung selofan yang lain kemudian diikat dengan hati-hati untuk menghindari penggelembungan.
- Selofan diikat dengan benang, lalu dimasukkan ke dalam baker-glass yang sudah berisi larutan buffer asetat 0,0005 M dengan pH tertentu dan diletakkan di dalam penangas yang berisi es.
- Buffer diaduk dengan magnetik stirer dan diganti tiap 2 jam sekali.
- Buffer yang diganti diuji kandungan amonium sulfatnya dengan penambahan Pb^{2+} dan Ba^{2+} hingga tidak terbentuk endapan.

3.2.7. Penentuan aktivitas enzim

Larutan enzim ditambah dengan larutan substrat, lalu diinkubasi pada pH dan suhu tertentu, lalu diukur kadar gula pereduksinya dengan metode Nelson-Somogyi, sedangkan penentuan aktivitas spesifiknya dilakukan dengan menentukan kadar protein dengan metode Lowry.

A. Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

- Sebanyak 0,5 mL larutan hasil inkubasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan 1mL larutan $Ba(OH)_2$ 0,01 M dan 1mL larutan $ZnSO_4$ 0,01 M.

- Larutan digojog, disentrifuse dan diambil supernatnya.
- Supernatan ditambah 5 mL reagen Cu-tartrat alkalis, lalu digojog.
- Tabung reaksi ditutup dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit.
- Tabung didinginkan dan ditambah 1 mL reagen arsenomolibdat.
- Didiamkan beberapa menit, lalu diukur absorbansinya pada 440 nm untuk mengetahui aktivitasnya. Satu unit aktivitas dinyatakan sebagai aktivitas enzim yang dapat menghasilkan 1 μ mol glukosa dari substrat pada kondisi percobaan.

B. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

- Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah dengan 3 mL reagen Lowry C.
- Larutan dibiarkan selama 20 menit pada suhu kamar.
- Kemudian ditambah dengan 0,3 mL larutan folin-ciocalteu dengan cepat.
- Larutan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar sambil sesekali digojog, kemudian diukur absorbansinya pada 640 nm untuk mengetahui aktivitas spesifiknya. Aktivitas spesifik adalah jumlah unit aktivitas per mg protein.

3.2.8. Karakterisasi enzim selulase

- Penentuan pH optimum dilakukan dengan reaksi enzim pada berbagai pH mulai dari pH 4,0 - 6,0 dengan substrat CMC dalam buffer asetat 0,05 M, diinkubasi pada suhu 39°C selama 45 menit.

- Penentuan suhu optimum dengan menguji aktivitas pada berbagai suhu percobaan mulai dari 30 - 65°C pada pH optimum.
- Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan memvariasikan waktu inkubasi mulai dari 0 -180 menit pada pH dan suhu optimumnya.

3.2.9. Hidrolisa eceng gondok dengan menggunakan enzim selulase

- Eceng gondok dipisahkan bagian daun dan batangnya, masing-masing dirajang halus dan dikeringkan.
- Daun dan batang eceng gondok yang sudah kering kemudian diblender hingga diperoleh bubuk yang halus.
- Bubuk daun dan batang eceng gondok masing-masing ditimbang sebanyak 0,0245 gram dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- Masing-masing ditambah dengan 4,9 mL buffer asetat 0,05 M pH 5,4 dan 0,1mL enzim.
- Campuran diinkubasi pada suhu 50°C selama 45 menit, kemudian diukur kadar gula pereduksinya.