

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan bahan

3.1.1. Alat-alat

- Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1201) - Magnetic Stirer (Quart)
- Sentrifuga (Centrfic-228) - Pompa Vaccum
- Kompor Listrik (Nuova) - Erlenmeyer
- pH meter (Orion-420A) - Gelas Ukur
- Neraca Analitik (Kern-470) - Gelas Beaker
- Kantong Selopan - Tabung reaksi

3.1.2. Bahan-bahan

- Cairan rumen sapi (100 mL) - Kalium Natrium Tartrat (p.a)
- Amonium Sulfat kristal (p.a) - Natrium karbonat (p.a)
- Asam Asetat (p.a) - Natrium Sulfat (p.a)
- Natrium Asetat (p.a) - Cupri Sulfat Pentahidrat (p.a)
- Karboksi Metil Selulosa (p.a) - Amonium Molibdat
- Selobiosa (p.a) - Natrium Arsenat heptahidrat (p.a)
- Kertas Whatman (No.41) - Folin Cioucalteu (p.a)
- Glukosa (p.a) - Barium hidroksida heksahidrat (p.a)
- Bouvine Serum Albumin (p.a) - Seng Sulfat heptahidrat (p.a)

3.2. Variabel penelitian :

3.2.1. Variabel yang diukur : - Aktivitas enzim selulase

- Aktivitas spesifik enzim selulase

3.2.2. Variabel bebas : – Derajat keasaman (pH)

– Suhu

– Waktu inkubasi

3.2.3. Variabel yang dikonstankan : – Konsentrasi substrat

– Volume enzim

– Volume Substrat

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi larutan

1. Pembuatan Reagen Nelson-Somogyi

Reagen A : 1,2 gram $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2,4 gram Na_2CO_3 , 1,6 gram NaHCO_3 dan 14,4 gram Na_2SO_4 anhidrat dilarutkan ke dalam 35 mL air lalu diencerkan hingga 80 mL disertai sedikit pemanasan.

Reagen B : Sebanyak 2,0 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 18 gram Na_2SO_4 dilarutkan dalam 50 mL H_2O kemudian ditambahkan 1 tetes H_2SO_4 pekat.

Reagen Nelson : Mencampur 1 bagian Reagen A + 1 bagian Reagen B.

Percampuran saat akan digunakan (disiapkan baru)

2. Pembuatan Reagen Arsenomolibdat

Langkah 1 : 5 gram Amonium Molibdat dilarutkan dalam 80 mL aquadest kemudian ditambahkan 4,2 mL H_2SO_4 pekat sambil diaduk.

Langkah 2 : 0,6 gram Na-Arsenat dilarutkan dalam 5 mL aquadest.

Larutan langkah 2 dituangkan dalam larutan langkah 1.

Dimasukkan dalam botol coklat dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam.

3. Pembuatan Reagen Gula Standar

1 % glukosa standar : 1 gram glukosa ditambahkan aquadest sampai 100 mL, disimpan dalam lemari es kemudian diencerkan sehingga kadar glukosa menjadi 10 mg/100 mL dan diencerkan menjadi 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,2 ; 1,4 ; 1,6 ; 1,8 ; 2,0 mg/100 mL .

4. Pembuatan Larutan Substrat CMC (Karboksi Metil Selulosa)

Sebanyak 0,5 gram CMC dilarutkan dengan buffer asetat 0,05 M hingga 100 mL dengan pH bervariasi.

5. Pembuatan Reagen Lowry

Lowry A : 2 gram Na_2CO_3 + 0,4 gram NaOH + 0,02 gram $KNaC_4H_4O_6 \cdot 3H_2O$ dilarutkan dengan aquadest sampai 100 mL.

Lowry B : 0,15 gram $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dilarutkan dalam aquadest hingga 25 mL.

Lowry C : Dibuat dari 50 bagian Lowry A + 1 bagian Lowry B

(harus disiapkan baru)

6. Pembuatan Reagen Folin Ciocalteu

Folin sebanyak 1 bagian + 1 bagian aquadest (harus disiapkan baru)

7. Pembuatan Standar Bouvine Serum Albumin

Larutan standar BSA (90, 180, 270, 360, 450, 520, 630, 720, 810, 900 $\mu\text{g/mL}$), 0,2 gram Bouvine Serum Albumin dilarutkan dengan aquadest hingga 100 mL (2000 $\mu\text{g/mL}$) dari larutan ini kemudian diencerkan untuk membuat larutan konsentrasi diatas.

8. Pembuatan $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M

Melarutkan 0,3153 gram $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ dalam aquadest 100 mL sambil dipanaskan dan diaduk sampai larut semua, didinginkan lalu disimpan.

9. Pembuatan $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M

Melarutkan 0,28738 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 mL aquadest sambil diaduk hingga larut semua.

10. Pembuatan Buffer Asetat 0,05 M

Larutan A (X) : 2,9 mL CH_3COOH dilarutkan dengan aquadest hingga 1000 mL.

Larutan B (Y) : 6,8 gram $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dalam 1000 mL aquadest, sehingga konsentrasinya 0,05 M

3.3.2. Perlakuan sampel

Diambil cairan rumen sapi dari Rumah Pemotongan Hewan Penggaron Kodya Semarang, disaring dengan kain dan diukur 100 mL cairan sampel.

3.3.3. Isolasi Enzim

Sebanyak 100 mL sampel cairan rumen sapi didialisis selama 10 jam dalam larutan buffer asetat 0,05 M dan disentrifus dengan kecepatan 3400 rpm selama kurang lebih 30 menit. Kemudian dipisahkan antara endapan dan supernatan.

Supernatan yang terbentuk disebut " Ekstrak kasar ".

Kemudian diuji aktivitasnya dengan substrat tertentu yakni CMC untuk enzim endoglukanase, substrat kertas whatman untuk enzim eksoglukanase dan Selobiosa untuk enzim β -glukosidase.

3.3.4. Pemurnian enzim

A. Fraksinasi dengan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Amonium sulfat ditimbang sesuai dengan kebutuhan untuk tiap tingkat fraksinasi (lihat lampiran 9), kemudian dimasukkan dalam supernatan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan magnetic stirer secara perlahan dan dilakukan dalam tempat yang sekelilingnya direndam es. Kemudian dipindah dalam tabung reaksi dan campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama satu malam, lalu disentrifus hingga diperoleh endapan F1 dengan kejenuhan 0 - 10%, F2 (10 - 20%), F3 (20 - 40%), F4 (40 - 60 %), F5 (60 - 80%) dan F6 (80 - 100%). Endapan yang diperoleh tiap fraksi dilarutkan dalam buffer asetat 0,05 M pH 5,5 kemudian didialisis.

B. Proses Dialisis

Kantong selopan direbus dahulu selama 30 menit dalam aquadest, kemudian salah satu ujung diikat dengan benang dan diisi dengan larutan enzim. Ujung selopan yang lain kemudian diikat dengan hati-hati untuk menghindari penggelembungan. Selopan diikat dengan benang lalu dimasukkan dalam beker glass yang sudah berisi larutan buffer 0,0005 M pH 5,5. Buffer diaduk dengan magnetic stirer dan diganti tiap 2 jam sekali. Buffer yang telah diganti diuji kandungan amonium sulfat dalam dialisis dengan ditambahkan Ba^{2+} hingga tak terbentuk endapan putih BaSO_4 . Hasil dialisis akan diperoleh larutan enzim dengan tingkat kejenuhan tertentu.

3.3.5. Penentuan Aktivitas Enzim

Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah 4,9 mL larutan substrat tertentu (0,5 gram/100 mL CH_3COONa pada pH, temperatur dan waktu inkubasi yang bervariasi). Lalu larutan hasil inkubasi ditentukan kadar gula pereduksinya dengan metode Nelson Somogyi, sedang penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Lowry.

A. Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode Nelson Somogyi

Sebanyak 0,5 mL larutan hasil inkubasi ditambah 1 mL $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,01 M dan 1 mL ZnSO_4 0,01 M Campuran digojog, disentrifus selama 20 menit. Larutan yang dihasilkan ditambah dengan 5 mL Reagen Nelson-Somogyi kemudian tabung reaksi ditutup dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Kemudian tabung didinginkan dan ditambahkan 5 mL reagen Arsenomolibdat. Larutan didiamkan beberapa menit lalu diukur absorbansinya pada λ : 440 nm. Aktivitas enzim dinyatakan

kan sebagai 1 μ mol glukosa yang terbentuk dari substrat CMC tiap satuan waktu inkubasi. Sebagai larutan standar digunakan larutan glukosa pada konsentrasi berbeda-beda

B. Penentuan Kadar protein

Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambahkan 3 mL Reagen Lowry C lalu diaduk dan dididihkan selama 20 menit pada suhu kamar. Larutan kemudian ditambah 0,3 mL larutan folin dengan cepat. Larutan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar sambil sesekali digojog. Kemudian ditentukan absorbansinya pada λ : 640 nm. Sebagai larutan standar digunakan BSA (Bovine Serum Albumin) dengan berbagai konsentrasi. Pengukuran konsentrasi protein digunakan untuk mengetahui aktivitas spesifik, dimana aktivitas spesifik merupakan jumlah unit aktivitas per mg protein.

3.3.6. Karakterisasi enzim

- A. Penentuan pH optimum dilakukan dengan reaksi enzim pada berbagai pH mulai 4,0 - 6,0 (selang 0,2) dengan substrat CMC dalam buffer asetat 0,05 M, diinkubasi pada suhu 39° C selama 45 menit.
- B. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menguji aktivitas pada berbagai suhu percobaan mulai 30° - 60°C (selang 5°C) pada pH optimum selama 45 menit.
- C. Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan memvariasi waktu inkubasi dari 0' - 120' (selang 15 menit) pada suhu optimum dan pH optimum.

3.3.7. Uji hidrolisa substrat selulosa dari serbuk gergajian kayu dengan Selulase

Serbuk gergajian kayu yang halus dikeringkan dengan sinar matahari. Kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 0,05 gram serbuk gergajian lalu ditambahkan larutan enzim 0,1 mL dan 4,9 mL larutan buffer asetat 0,05 M pada kondisi optimum yang diperoleh. Glukosa yang terbentuk diuji dengan metode Nelson-Somogyi.

