

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
- pH-meter (Orion – 870)
- Kompur listrik (Nuova)
- Magnetik stirer (Quart)
- Penangas
- Gelas ukur
- Inkubator (Hammert)
- Selofan
- Termometer
- Kain penyaring

3.1.2 Bahan

- Kubis bunga
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (p.a)
- $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (p.a)

- Kasein (p.a)
- Lecitin (p.a)
- Reagen Folin Ciocalteu (p.a)
- Reagen Lowry A : Na_2CO_3 (p.a), NaOH (p.a), KNaTartrat (p.a)
- Reagen Lowry B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (p.a)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (p.a)
- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ teknis
- CH_3COOH (p.a)
- CH_3COONa (p.a)
- I_2 (p.a)
- KI (p.a)
- CH_3Cl (p.a)
- aquades

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel yang diukur

- Aktivitas enzim fosfolipase D
- Aktivitas spesifik enzim fosfolipase D

3.2.2 Variabel yang dikonstankan

- Volume enzim fosfolipase D
- Volume substrat
- Konsentrasi substrat

3.2.3 Variabel bebas

- Derajat keasaman (pH)



- Temperatur
- Waktu inkubasi
- Konsentrasi aktivator CaCl_2

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Preparasi larutan

1. Larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,01 M

Sebanyak 0,3153 gram $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan aquades hingga diperoleh 100 mL larutan

2. Larutan substrat Lesitin (10 mg/ mL)

Sebanyak 10 mg lesitin dilarutkan dengan 1 mL eter

3. Larutan reagen Iodin (0,05 M)

Sebanyak 12,7 gram I_2 dan 25 gram KI dilarutkan dengan air dan diencerkan sampai 1 liter.

4. Larutan reagen Lowry A

Sebanyak 2 gram Na_2CO_3 , 0,4 gram NaOH dan 0,02 gram KNa tartrat dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL

5. Larutan reagen Lowry B

Sebanyak 0,15 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan aquades hingga 25 mL

6. Larutan reagen Lowry C

Sebanyak 50 bagian Lowry A dan 1 bagian Lowry B dicampur dalam keadaan baru

7. Larutan reagen Folin

Sebanyak 1 bagian Folin dan 1 bagian aquades dicampur dalam keadaan baru

8. Larutan standar Kasein

Sebanyak 0,2 gram kasein dilarutkan dengan 100 mL aquades sehingga diperoleh larutan kasein dengan konsentrasi 2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Dari larutan ini dibuat larutan standar kasein dengan konsentrasi 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 dan 300 $\mu\text{g} / \text{mL}$

9. Larutan buffer asetat 0,05 M

Larutan A : Larutan CH_3COOH 0,05 M

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

Larutan B : 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.

Sebanyak X mL larutan CH_3COOH 0,05 M ditambah dengan Y mL larutan CH_3COONa 0,05 M, lalu diencerkan hingga 100 mL sesuai dengan tabel pembuatan buffer asetat (lampiran 7).

10. Larutan CaCl_2 0,2 M

Sebanyak 2,94 gram $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL (0,2 M). Kemudian dari larutan ini dilakukan pengenceran untuk membuat konsentrasi sebagai berikut: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 mM.

3.3.2. Isolasi enzim fosfolipase D

Sebanyak 100 gram daun kubis bunga diblender dengan 50 mL air selama 20 menit. Campuran dibiarkan selama 2 jam pada suhu 5 °C. Homogenat selanjutnya disaring dengan kain dan supernatan disentrifus dengan kecepatan 3400 rpm selama 22 menit. Supernatan yang didapat adalah ekstrak enzim. Selanjutnya dilakukan pemurnian secara bertingkat dengan amonium sulfat.

3.3.3. Fraksinasi dengan garam amonium sulfat

Amonium sulfat ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan untuk tiap tingkat fraksinasi (sesuai dari tabel pada lampiran 8). Amonium sulfat yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam supernatan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan magnetik stirer secara perlahan-lahan dan dilakukan dalam tempat yang direndam es. Campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama 2 jam lalu disentrifus hingga diperoleh endapan pada kejenuhan amonium sulfat 0 - 20 % jenuh. Filtrat yang diperoleh difraksinasi 20 - 40 % jenuh, lalu diperlakukan sama untuk 40 - 60 % jenuh, 60 - 80 % jenuh, dan 80 - 100 % jenuh. Endapan yang diperoleh pada tiap fraksi dilarutkan dengan buffer asetat 0,05 M pada pH = 5,6.

3.3.4. Proses dialisis

Proses dialisis dilakukan menggunakan selofan yang telah direbus dalam aquades selama 30 menit lalu dicuci dengan aquades. Selofan yang berisi larutan enzim lalu diikat ujungnya dengan benang dan dimasukkan

ke dalam buffer asetat 0,0005 M. Selama proses dialisis, buffer asetat diaduk dengan magnetic stirer dan diganti setiap 2 jam. Buffer yang diganti diuji kandungan amonium sulfatnya dengan penambahan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ hingga tidak terbentuk endapan putih.

3.3.5. Penentuan aktivitas spesifik enzim fosfolipase D

A. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah dengan 3 mL reagen Lowry C lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Kemudian ditambah 0,3 mL larutan Folin dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali dikocok. Ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang optimum protein.

B. Penentuan unit aktivitas enzim

Sebanyak 1 mL larutan substrat lesitin, 0,1 mL enzim, 0,3 mL buffer asetat 0,05 M dengan $\text{pH} = 5,6$, 0,1 mL CaCl_2 0,1 M, dan 3,5 mL eter dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok sampai terbentuk emulsi. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 25°C selama 90 menit. Di akhir waktu tersebut ditambahkan eter sampai volumenya menjadi 5 mL. Campuran lalu dikocok dan kemudian ditutup. Selama 45 menit campuran dibiarkan supaya proses ekstraksi sempurna. Kemudian campuran disentrifus dan lapisan air yang diperoleh kemudian dipisahkan dari lapisan eter. Diambil 1 mL lapisan air dan ditambahkan 0,5 mL reagen iodine, dicampur dan ditempatkan dalam ice bath selama 15 menit sampai garam kolin-iodine terbentuk. Campuran selanjutnya disentrifus dan

supernatan yang diperoleh dibuang. Sedangkan endapan dilarutkan dengan kloroform sampai volumenya menjadi 5 mL dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang optimum 365 nm.

3.3.6. Karakterisasi enzim fosfolipase D.

- Penentuan pH optimum dilakukan dengan reaksi enzim pada berbagai pH mulai 4,8 – 6,0 dengan suhu 25 ° C selama 90 menit dan konsentrasi CaCl_2 0,1 M.
- Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menguji aktivitas enzim pada suhu 30 ° – 60 ° C pada pH optimum, selama 90 menit dan konsentrasi CaCl_2 0,1 M.
- Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan variasi waktu mulai 30 –120 menit pada pH, dan suhu optimum dengan konsentrasi CaCl_2 0,1 M.
- Penentuan konsentrasi aktivator optimum dilakukan dengan variasi konsentrasi CaCl_2 antara 0 –160 mM pada pH, suhu, dan waktu inkubasi optimum.