

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1. Alat dan bahan**

##### **3.1.1. Alat yang digunakan**

1. Oven (Carbolite)
2. Corong buchner
3. Sentrifuge (Centrific-228)
4. Termometer ( $0^{\circ}\text{C} - 300^{\circ}\text{C}$ )
5. Pengaduk gelas
6. Bekker glass
7. Tabung reaksi
8. Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1201)
9. Labu takar
10. Timbangan elektrik (Mettler AT200)
11. pH-meter (Orion-420A)
12. Inkubator (Memmert)
13. Blender (Makita)

##### **3.1.2. Bahan-bahan yang digunakan**

1. Getah pepaya
2. Sistein p.a

3. Natrium hidroksida p.a
4. Ammonium sulfat p.a
5. Natrium klorida p.a
6. Aquadest
7. Kasein p.a
8. Trikloro asetat p.a
9. Tirosin p.a
10. Natrium karbonat p.a
11. Kupri sulfat pentahidrat p.a
12. Natrium kalium tartrat p.a
13. Folin ciocalteu p.a
14. Asam asetat glacial
15. Natrium asetat p.a
16. Karrageenan p.a

### **3.2. Variabel penelitian**

#### **3.2.1. Variabel yang diukur**

- Aktivitas enzim papain
- Aktivitas spesifik enzim papain
- Stabilitas enzim amobil

#### **3.2.2. Variabel bebas**

- Derajat keasaman (pH)
- Suhu



### 3.2.3. Variabel yang dikonstantakan

- Konsentrasi substrat
- Volume enzim
- Volume substrat

### 3.3. Cara kerja

#### 3.3.1. Penyadapan getah pepaya

Buah pepaya muda jenis pepaya semangka digores-gores dengan pisau yang terbuat dari bambu. Getah ditampung dalam gelas penampung. Disimpan dalam lemari es.

#### 3.3.2. Preparasi getah pepaya kering

Sebanyak 1L getah pepaya hasil sadapan dituang tipis-tipis pada wadah pengering. Dioven pada temperatur  $55^{\circ}\text{C}$ - $65^{\circ}\text{C}$  selama 6-7 jam.

#### 3.3.3. Preparasi larutan

##### a. Pembuatan sistein 0,04 M

Sebanyak 7,018 g sistein dilarutkan dalam NaOH 0,054 N hingga volumenya menjadi 1L.

##### b. Pembuatan sistein 0,02 M

Sebanyak 1,775 g sistein dilarutkan dalam NaOH 0,054 N hingga volumenya menjadi 500 mL.

##### c. Pembuatan sistein 0,15 M

Sebanyak 0,263 g sistein dilarutkan dalam aquadest hingga volumenya menjadi 10 mL.

d. Pembuatan NaOH 1 N

Sebanyak 40 g NaOH dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 1L.

e. Pembuatan NaOH 0,1 M

Sebanyak 10 mL larutan NaOH 1 N dilarutkan dalam aquades hingga volumenya 100 mL.

f. Pembuatan NaOH 0,054 N

Sebanyak 54 mL larutan NaOH 1 N dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 1L.

g. Pembuatan TCA 30 %

Sebanyak 30 g TCA dilarutkan dalam aquades hingga 100 mL.

h. Pembuatan larutan ammonium sulfat

Sebanyak 125 g ammonium sulfat dilarutkan dalam aquades hingga volumenya 500 mL.

i. Pembuatan larutan NaCl jenuh

Sebanyak 100 mL aquades ditambahkan NaCl padat sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga NaCl tidak larut lagi.

j. Pembuatan reagen Lowry <sup>18)</sup>

- Reagen Lowry A

Sebanyak 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ditambah NaOH 0,1 N hingga volumenya menjadi 100 mL.

- Reagen Lowry B

Sebanyak 0,05 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ditambah Natrium-Kalium-Tartrat hingga volumenya menjadi 10 mL.

- Reagen Lowry C

Reagen Lowry A 50 mL ditambah reagen Lowry B 1 mL.

- Reagen Lowry D

Folin ciocalteu 1 bagian ditambah aquades 1 bagian.

- Pembuatan Natrium-Kalium-Tartrat

Sebanyak 1 g Natrium-Kalium-Tartrat dilarutkan dalam aquades hingga volumenya 100 mL

j. Pembuatan substrat Kasein

Sebanyak 1,2 g Kasein dilarutkan dalam aquades hingga volumenya 100 mL.

k. Pembuatan standar Kasein

Sebanyak 30 mg Kasein dilarutkan dalam aquades hingga volumenya 100 mL. Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15; 0,18; 0,21; 0,24; 0,27 mg/mL).

l. Pembuatan standar Tirosin

Sebanyak 3 mg tirosin dilarutkan dalam aquades hingga 100 mL. Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/100 mL).

m. Pembuatan buffer asetat <sup>19)</sup>

- Pembuatan larutan asam asetat 0,2 M

Sebanyak 11,55 mL asam asetat glacial dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 1L.

- Pembuatan larutan Natrium asetat 0,2 M

Sebanyak 16,4 g Natrium asetat dilarutkan dalam aquades hingga volumenya 1L.

Pembuatan buffer asetat pada berbagai pH dilakukan sesuai dengan tabel.

#### 3.3.4. Penentuan $\lambda$ maksimum Kasein

Kasein 0,15 mg/mL dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

#### 3.3.5. Penentuan $\lambda$ maksimum Tirosin

Tirosin 1,5 mg/mL dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

#### 3.3.6. Penentuan Kurva standar Kasein

Kasein dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada  $\lambda = 730$  nm dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

### 3.3.7. Penentuan kurva standar Tirosin

Tirosin dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada  $\lambda = 270$  nm dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

### 3.3.8. Isolasi enzim papain dari getah pepaya<sup>20)</sup>

- Getah pepaya kering 90 g ditambah dengan 150 mL sistein 0,04 M sehingga memiliki pH 5,7. Campuran kemudian diblender. Suspensi disaring dan filtrat didekanter. Ekstraksi dan pemblanderan diulangi sampai diperoleh ekstrak papain kasar.
- Filtrat yang diperoleh dari proses ekstraksi ditambah NaOH 1 N hingga pH nya 9, difiltrasi dan homogenat dipisahkan dari supernatan.
- Supernatan difraksinasi dengan amonium sulfat dengan kejenuhan F1(0 – 10 %); F2(10 – 30 %); F3(30 – 40 %); F4(40 – 60 %). Suspensi hasil fraksinasi dibiarkan pada 4<sup>0</sup>C selama 1-2 jam. Homogenat dikumpulkan dengan sentrifus pada 3400 rpm selama 32 menit dan supernatan dipisahkan. Homogenat masing-masing fraksi dicuci dengan larutan ammonium sulfat 250 mL dan disentrifus.
- Homogenat dilarutkan dalam sistein 0,02 M sehingga memiliki pH 7 dan ditambah dengan NaCl secara perlahan sambil diaduk. Suspensi yang diperoleh dibiarkan pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 1 jam dan disentrifus pada 3400 rpm selama 32 menit dalam keadaan dingin.
- Homogenat hasil sentrifus dilarutkan dalam sistein 0,02 M hingga memiliki pH 6,5. Suspensi dibiarkan selama 1 malam pada suhu 4<sup>0</sup>C. Endapan seperti

selai dikumpulkan dengan sentrifus dalam keadaan dingin pada 3400 rpm selama 1 jam.

- Enzim papain yang diperoleh dilarutkan dalam 5 mL aquades dan 5 mL larutan NaCl jenuh sambil diaduk. Suspensi dibiarkan selama 1 malam pada suhu 4°C dan enzim dikumpulkan dengan sentrifugasi.

### 3.3.9. Uji aktivitas enzim papain bebas

- Sebanyak 2,0 mL larutan substrat Kasein dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang bersih dan kering, ditambah 1,3 mL buffer asetat pH 5,0 dan 0,2 mL sistein 0,15 mL.
- Larutan enzim yang telah diencerkan 50 kali ditambah sebanyak 0,5 mL.
- Diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 menit.
- Larutan TCA 30% ditambahkan sebanyak 1 mL.
- Disentrifugasi pada 3400 rpm selama 65 menit. Homogenat dipisahkan.
- Supernatan dibaca serapannya pada  $\lambda = 270$  nm dengan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

### 3.3.10. Penentuan kadar protein

- Larutan enzim yang telah diencerkan 50 kali sebanyak 1 mL ditambahkan 5 mL reagen Lowry C, dikocok pelan-pelan dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit.
- Reagen Lowry D sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan cepat dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar dengan sesekali digojog.

- Dibaca serapannya pada  $\lambda = 730$  nm dengan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

### 3.3.11. Penentuan pH optimum enzim papain bebas

Enzim papain diuji aktivitasnya pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  dengan pH yang bervariasi (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0).

### 3.3.12. Penentuan suhu optimum enzim papain bebas

Enzim papain diuji aktivitasnya pada pH 5,0 dengan temperatur yang bervariasi ( $33^{\circ}\text{C}$ ;  $35^{\circ}\text{C}$ ;  $37^{\circ}\text{C}$ ;  $39^{\circ}\text{C}$ ;  $41^{\circ}\text{C}$ ;  $43^{\circ}\text{C}$ ;  $45^{\circ}\text{C}$ ;  $47^{\circ}\text{C}$ ;  $49^{\circ}\text{C}$ ;  $51^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.3.13. Amobilisasi enzim papain <sup>17)</sup>

- Karrageenan 500 mg dilarutkan pada 15 mL NaCl 25% kemudian dipanaskan pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$ , kemudian didinginkan menjadi  $40^{\circ}\text{C}$ .
- Enzim papain yang telah diencerkan 50 kali sebanyak 5 mL diinkubasi pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$ .
- Setelah keduanya mencapai suhu  $40^{\circ}\text{C}$  dicampurkan sambil diaduk hingga homogen.
- Setelah rata didinginkan pada suhu kamar.
- Dicuci dengan larutan NaCl 25 % dipotong-potong dengan ukuran (3x3x3) mm.

#### 3.3.14. Uji aktivitas enzim papain amobil

- Sebanyak 2,0 mL larutan substrat kasein dimasukkan ke dalam beker glass 50 mL yang bersih dan kering, ditambah buffer asetat pH 6,0 dan 0,2 mL sistein 0,15 M.
- Enzim amobil 2,4 g ditambahkan ke dalam beker glass. Diinkubasi pada suhu 41<sup>0</sup>C selama 30 menit.
- Supernatan dipisahkan dari enzim amobil.
- Larutan TCA 30 % ditambahkan ke dalam supernatan sebanyak 1 mL.
- Supernatan disentrifuge pada 3400 rpm selama 65 menit. Homogenat dipisahkan.
- Supernatan dibaca serapannya pada  $\lambda = 270$  nm dengan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

#### 3.3.15. Penentuan pH optimum enzim amobil

Enzim papain amobil diuji aktivitasnya pada suhu 35<sup>0</sup>C dengan pH yang bervariasi (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0)

#### 3.3.16. Penentuan suhu optimum enzim amobil

Enzim papain amobil diuji aktivitasnya pada pH 6 dengan temperatur yang bervariasi (33<sup>0</sup>C; 35<sup>0</sup>C; 37<sup>0</sup>C; 39<sup>0</sup>C; 41<sup>0</sup>C; 43<sup>0</sup>C; 45<sup>0</sup>C; 47<sup>0</sup>C; 49<sup>0</sup>C; 51<sup>0</sup>C).

#### 3.3.17. Penentuan stabilitas enzim papain amobil

Enzim papain amobil diuji aktivitasnya untuk beberapa kali pemakaian.

### 3.3.18. Penentuan aktivitas unit dan aktivitas spesifik enzim papain

- Satuan unit aktivitas enzim (U) didefinisikan sebagai :

*Jumlah mikromol substrat yang dirubah menjadi produk tiap satuan waktu.*

$$1 \text{ U aktivitas papain} = \frac{1 \mu\text{mol. tirosin}}{\text{menit}}$$

- Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai :

*Satuan unit aktivitas enzim tiap miligram protein yang dikandung*

$$\text{Aktivitas spesifik enzim papain} = \frac{\text{Unit aktivitas papain}}{\text{mg protein}}$$

