

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Alat, dan Bahan

3.1.1. Sampel

Daun benalu mangga kuweni segar dari desa Pager, Susukan, Kab. Semarang.

3.1.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- a. Sentrifuge (Centrif-228)
- b. Spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu)
- c. Inkubator (Memmert)
- d. Blender (Panalux)
- e. Neraca analitik (Kern 870)
- f. Alat-alat gelas untuk analisis
- g. pH-meter (Orain-420 A)
- h. Magnetik stirer (Quart)
- i. Membran selofan
- j. Morter dan stomper
- k. Botol semprot

3.1.3. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain :

- a. Daun benalu mangga kuweni segar
- b. Asparagin p.a.

- c. Aquades
- d. Folin-Ciocalteu p.a.
- e. Kasein p.a.
- f. Buffer Tris p.a.
- g. Merkuri (II) Iodida p.a.
- h. Natrium Karbonat p.a.
- i. Natrium Hidroksida p.a.
- j. Kalium Iodida p.a.
- k. Amonium Sulfat p.a.
- l. TCA (Tri Khloro Asetat) p.a.
- m. Barium Klorida p.a.
- n. Hidrogen Klorida p.a.
- o. Kalium Natrium Tartrat p.a.
- p. Tembaga Sulfat p.a.

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang Diukur

- Aktivitas enzim asparaginase dari benalu mangga kuweni
- Aktivitas spesifik

3.2.2. Variabel Bebas

- Derajat keasaman (pH)
- Temperatur
- Waktu inkubasi

3.2.3. Variabel yang Dikonstankan

- Konsentrasi substrat
- Volume enzim
- Volume substrat

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi Larutan

- a. Larutan 0,2 M buffer Tris pH 8,6

Kristal Tris sebanyak 24,22 g dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 L.

Kemudian buffer Tris ditambah hidrogen klorida encer hingga pH 8,6.

- b. Larutan 0,002 M buffer Tris pH 8,6

Larutan 0,2 M buffer Tris sebanyak 1 mL diencerkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 100 mL.

- c. Larutan 0.01 M barium klorida

Kristal BaCl_2 sebanyak 0,2083 g dilarutkan dalam aquades hingga volume 100 mL.

- d. Larutan 1,5 M TCA (Tri Kloro Asetat)

Kristal TCA seberat 24,5085 g dilarutkan dalam aquades hingga volume 100 mL.

- e. Reagen Lowry

Lowry A

Sebanyak 2 g natrium karbonat ditambah 0,4 g natrium hidroksida dan 0,04 g natrium kalium tartrat dilarutkan dalam aquades hingga volume 100 mL.

Lowry B

Sebanyak 0,15 g kristal tembaga sulfat dilarutkan dalam aquades hingga volume 25 mL.

Lowry C

Larutan Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B.

Lowry D

Folin-Ciocalteu 1 bagian ditambah 1 bagian aquades.

f. Reagen Nessler

Kristal kalium iodida sebanyak 5 g dilarutkan dalam 5 mL aquades, ditambahkan kedalamnya larutan merkuri (II) klorida (1:20 / 1g dalam 20 mL aquades) sampai terjadi endapan merah yang tidak hilang lagi. Kemudian disaring dengan glass wool. Filtrat ditambah larutan 15 g natrium hidroksida dalam 30 mL aquades, kemudian diencerkan hingga volume 100 mL. Didiamkan kemudian disaring dan diambil yang jernih.

g. Pembuatan substrat asparagin

Kristal asparagin sebanyak 2,5 g dilarutkan dalam aquades hingga volume 100 mL.

h. Pembuatan standar amonium sulfat $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Kristal amonium sulfat sebanyak 0,02 g dilarutkan dalam aquades hingga volume 100 mL.

i. Pembuatan standar kasein $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Kristal kasein sebanyak 0,05 g dilarutkan dalam aquades hingga volume 100 mL.

3.3.2. Isolasi Enzim

Daun benalu mangga kuweni segar seberat 1000 g yang sudah dibersihkan, digerus dalam mortar dengan stomper, dihomogenisasi dengan 500 mL 0,2 M buffer Tris pH 8,6 dalam blender selama 20 menit. Campuran dibiarkan selama 1-2 jam pada temperatur 5 °C. Homogenat selanjutnya disaring dengan kain, filtrat disentrifuge pada 3400 rpm selama 10 menit. Supernatan yang di dapat merupakan enzim kasar (ekstrak kasar)

3.3.3. Pemurnian Enzim

3.3.3.1. Fraksinasi dengan Garam Amonium Sulfat

Pemisahan enzim dari ekstrak kasar dilakukan dengan penambahan amonium sulfat yang telah ditimbang sesuai fraksi yang dikehendaki 0 – 20 % dari tabel dimasukkan ke dalam ekstrak kasar sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam penangas es. Campuran didiamkan selama satu malam dalam keadaan dingin, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 50 menit. Endapan dipisahkan dan disuspensi dengan 0,2 M buffer Tris pH 8,6. Endapan tersebut merupakan fraksi 0 – 20 %. Supernatan diperlakukan sama dengan di atas hingga didapatkan fraksi dengan tingkat kejenuhan 20 – 40 %, 40 – 60 %, 60 – 80 %, 80 – 100 %.

3.3.3.2. Dialisis

Dialisis dilakukan dengan menggunakan membran selofan yang telah direbus dalam aquades selama 30 menit. Selofan yang berisi enzim direndam dalam 0,002 M

buffer Tris pH 8,6 dalam keadaan dingin, dan tiap 2 jam buffer Tris diganti dan diuji kandungan amonium sulfatnya dengan barium klorida.

3.3.4. Penentuan Panjang Gelombang Optimum Amonium Sulfat

Amonium sulfat $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dibaca absorbansinya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-VIS Shimadzu.

3.3.5. Penentuan Kurva Standar Amonium Sulfat

Amonium sulfat dalam berbagai konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dibaca absorbansinya pada panjang gelombang optimum amonium sulfat dengan alat spektrofotometer UV-VIS Shimadzu.

3.3.6. Penentuan Panjang Gelombang Optimum Kasein

Kasein $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dibaca absorbansinya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-VIS Shimadzu

3.3.7. Penentuan Kurva Standar Kasein

Kasein dalam berbagai konsentrasi 100, 200, 300, 400 dan $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum kasein dengan alat spektrofotometer UV-VIS Shimadzu.

3.3.8. Uji Aktivitas Enzim ⁽²⁾

Larutan substrat asparagin 0,5 mL ditambah 0,1 mL enzim, 0,4 mL 0,2 M buffer Tris pH 8,6 diinkubasi 37°C selama 30 menit. Kemudian ditambah 1 mL 1,5 M TCA . Selanjutnya disentrifuge 3400 rpm selama 15 menit untuk memisahkan endapan. Sebanyak 0,25 mL supernatan diambil, ditambah 4,25 mL aquades dan

0,5 mL pereaksi Nessler. Selanjutnya larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum dengan spektrofotometer UV-VIS Shimadzu. Sebagai kontrol adalah campuran enzim yang telah dimatikan sebanyak 0,1 mL, 1 mL 1,5 M TCA, 0,4 mL 0,2 M buffer Tris, dan 0,5 mL asparagin. Aktivitas enzim ditentukan secara regresi linear terhadap kurva standar amonium sulfat.

3.3.9. Penentuan Kadar Protein Enzim ⁽²⁾

Larutan enzim sebanyak 0,3 mL ditambah 1,5 mL larutan Lowry C, dibiarkan selama 20 menit pada temperatur kamar. Ditambahkan 0,15 mL larutan Lowry D, dengan cepat dan dibiarkan selama 45 menit pada temperatur kamar sambil sesekali dikocok. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang optimum dari kasein dengan spektrofotometer UV-VIS Shimadzu. Kadar protein ditentukan secara regresi linear terhadap kurva standar kasein.

3.3.10. Penentuan Temperatur Optimum Enzim

Enzim asparaginase diuji aktivitasnya dengan variasi temperatur 31, 34, 37, 40, 43 °C.

3.3.11. Penentuan pH Optimum

Enzim asparaginase diuji aktivitasnya pada temperatur optimum dengan variasi pH 8,0; 8,2; 8,4; 8,5; 8,6; 8,8; 9,0.

3.3.12. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Enzim asparaginase diuji aktivitasnya pada temperatur dan pH optimum dengan variasi waktu inkubasi 24, 27, 30, 33, 36 menit.