

**BAB III**  
**METODOLOGI PENELITIAN**

**3.1 Alat dan Bahan**

**3.1.1 Alat**

- Sentrifuge Centrifug-228
- Magnetik stirer Guart
- Spektrometer UV-VIS Shimadzu
- Selofan
- Inkubator Memmert
- Botol semprot
- Timbangan elektrik
- Jarum osse
- pH meter Oroin 420A
- Alat-alat gelas untuk analisis

**3.1.2 Bahan**

- *Aspergillus niger* 6088 IFO 6341
- Kasein
- TEA (Taoge Ekstrak Agar)
- Natrium karbonat
- Natrium hidroksida
- Natrium kalium tartat
- Kupri sulfat pentahidrat
- Asparagin
- Buffer Tris (hidroksimetil-amino metan)
- Merkuri (II) klorida
- Kalium Iodida
- Amonium sulfat
- Akuades

- Tri Kloro Asetat 1,5 M
- Alkohol 60 %
- Barium hidroksida

### 3.2 Variabel

#### 3.2.1 Variabel yang diukur

- aktivitas enzim asparaginase dari *Aspergillus niger*
- aktivitas spesifik enzim asparaginase

#### 3.2.2 Variabel bebas

- derajat keasaman (pH)
- temperatur
- waktu inkubasi

#### 3.2.3 Variabel yang dikonstantakan

- konsentrasi substrat
- volume substrat
- volume enzim

### 3.3 Cara Kerja

#### 3.3.1 Preparasi Larutan

##### a. Pembuatan TEA (Taoge Ekstrak Agar)

100 gram taoge direbus dengan 1 L akuades selama 2 jam, lalu disaring. Ditambahkan 60 gram gula pasir kemudian direbus sampai gula larut. Akuades ditambahkan sampai dengan volume semula (1 L). Sebanyak 20 gram agar dimasukkan dan diaduk sampai larut. Larutan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.



**b. Pembuatan Media Fermentasi**

Sebanyak 50 gram glukosa, 2,06 gram amonium nitrat, 1,2 gram kalium hidrogen fosfat dan 0,5 gram magnesium sulfat heptahidrat diencerkan dengan akuades hingga volume larutan menjadi 1 L, pH diatur sampai 3,5. Larutan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

**c. Pembuatan BaCl<sub>2</sub>**

Sebanyak 0,2083 gram Barium klorida dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 100 mL

**d. Pembuatan Buffer Tris 0,2 M pH 8,6**

Sebanyak 6,055 gram hidrosimetil-amino metan dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 250 mL

**e. Pembuatan Buffer Tris 0,02 M pH 8,6**

Larutan buffer Tris 0,2 M pH 8,6 sebanyak 1 mL dilarutkan dengan akuades hingga volumenya 100 mL

**f. Pembuatan TCA 1,5 M**

Sebanyak 12,29 gram Tri Kloro Asetat dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 50 mL

**g. Pembuatan Asparagin**

Asparagin sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 40 mL akuades.

**h. Pembuatan Reagen Nessler**

Kalium Iodida sebanyak 5 gram dilarutkan dalam 10 mL akuades (larutan A) Merkuri (II) klorida dilarutkan dalam akuades 1 : 20

(larutan B) 15 gram Natrium hidroksida dilarutkan dalam 40 mL akuades (larutan C). Tambahkan larutan B pada larutan A setetes demi setetes sampai terbentuk endapan permanen, lalu tambahkan larutan C dan encerkan dengan akuades sampai volumenya 100 mL

**i. Pembuatan Reagen Lowry**

Lowry A

Sebanyak 10 gram Natrium karbonat ditambah 2 gram Natrium hidroksida dan 0,2 gram Natrium Kalium Tartrat dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 500 mL.

Lowry B

Sebanyak 0,6 gram Kupri sulfat pentahidrat dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 100 mL.

Lowry C

Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B

**j. Pembuatan Larutan Amonium Sulfat Standar**

Amonium sulfat sebanyak 0,03 gram dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL (konsentrasi 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Kemudian dibuat variasi konsentrasi: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45  $\mu\text{g/mL}$

**k. Pembuatan Larutan Kasein Standar**

Kasein 0,03 gram dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 100 mL (konsentrasi 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Kemudian dibuat variasi konsentrasi: 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45  $\mu\text{g/mL}$

### 3.3.2 Pembiakan *Aspergillus niger*

Biakan murni *Aspergillus niger* ditumbuhkan pada media TEA steril dengan menggunakan jarum ose. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Hasil pembiakan dipindahkan ke media fermentasi, diinkubasi pada suhu 37 °C dengan variasi waktu 42, 44, 46, 48, 50, 52 jam pada shaker 200 rpm, untuk menentukan waktu fermentasi enzim optimum.

### 3.3.3 Isolasi Enzim

#### a. Ekstraksi

Cairan kultur disentrifuge pada kecepatan 3400 rpm 4 °C selama 10 menit. Supernatan yang didapat merupakan enzim ekstrak kasar.

#### b. Presipitasi

Pemisahan protein enzim dari hasil ekstraksi dilakukan dengan penambahan amonium sulfat secara bertingkat. Amonium sulfat yang telah ditimbang sesuai dengan fraksi yang dikehendaki (0-20%) dari tabel (lampiran 11) dimasukkan ke dalam enzim kasar sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam penangas es. Campuran didiamkan semalam dalam keadaan dingin, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3400 rpm selama 50 menit. Endapan dipisahkan dan suspensikan dengan buffer Tris 0,2 M 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%.

### c. Dialisis

Dialisis dilakukan dengan menggunakan selofan yang telah direbus dalam akuades selama 30 menit. Selofan yang berisi enzim direndam dalam buffer Tris 0,2 M pH 8,6 dalam keadaan dingin, dan tiap 2 jam diganti buffernya. Dialisis dihentikan jika hasil pengujian buffer dengan  $\text{BaCl}_2$  tidak lagi terdapat endapan putih.

#### 3.3.4 Penentuan $\lambda$ optimum $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Larutan amonium sulfat dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

#### 3.3.5 Penentuan Kurva Standar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Larutan amonium sulfat dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

#### 3.3.6 Penentuan $\lambda$ optimum Kasein

Kasein dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

#### 3.3.7 Penentuan Kurva Standar Kasein

Kasein dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum kasein dengan alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

#### 3.3.8 Uji Aktivitas Enzim

Larutan substrat asparaginase sebanyak 0,5 mL ditambah 0,1 mL larutan enzim, 0,4 mL buffer Tris 0,2 M pH 8,6, diinkubasi pada suhu 37 °C

selama 30 menit. Campuran ditambah larutan TCA sebanyak 1 mL kemudian disentrifuge pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Sebanyak 0,25 mL supernatan diambil, ditambah 4,25 mL akuades dan 0,5 mL pereaksi Nessler. Larutan didiamkan beberapa menit lalu dibaca serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Sebagai kontrol adalah campuran substrat, buffer, TCA, akuades, Nessler, dan enzim yang telah dimatikan (tidak memiliki aktivitas). Aktivitas enzim dicari secara regresi linier terhadap kurva standar  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### **3.3.9 Penentuan Kadar Protein Enzim (Metode Lowry)**

Larutan enzim sebanyak 1 mL ditambah 5 mL larutan Lowry C dibiarkan selama 20 menit dalam suhu kamar. Kemudian ditambah 0,5 mL larutan folin dengan cepat dan biarkan kembali selama 30 menit pada suhu kamar sambil sesekali dikocok. Larutan dibaca serapannya pada panjang gelombang optimum dari kasein dengan spektrofotometer UV-Vis. Kadar protein enzim ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar kasein

### **3.3.10 Penentuan pH Optimum Enzim**

Enzim asparaginase diuji aktivitasnya dengan pH yang bervariasi (8,0 , 8,2 , 8,4 , 8,6 , 8,8 , 9,0 ) pada temperatur 37 °C selama 30 menit.

### **3.3.11 Penentuan Temperatur Optimum Enzim**

Enzim asparaginase diuji aktivitasnya pada pH optimum dengan variasi temperatur (28, 31, 34, 37, 40, 43 °C) selama 30 menit.

### 3.3.12 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Enzim

Enzim asparaginase diuji aktivitasnya pada suhu dan pH optimum dengan variasi waktu inkubasi (10, 20, 30, 40, 50, 60 menit)

### 3.3.13 Penentuan Aktivitas Unit dan Aktivitas Spesifik Enzim

Satuan unit aktivitas enzim (Unit) didefinisikan sebagai:

*Jumlah mikromol produk yang terbentuk tiap satuan waktu inkubasi*

$$1 \text{ Unit aktivitas enzim asparaginase} = \frac{1 \mu \text{ mol amonia}}{\text{satuan waktu inkubasi}}$$

Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai:

*Jumlah unit aktivitas enzim tiap miligram protein yang dikandung*

$$\text{Aktivitas spesifik enzim asparaginase} = \frac{\text{Unit aktivitas enzim asparaginase}}{\text{mgram protein}}$$

