

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Tahap-tahap yang telah dilakukan pada penelitian ini meliputi isolasi enzim, pemurnian enzim melalui fraksinasi dengan garam amonium sulfat, dialisis, penentuan aktivitas enzim α -amilase, penentuan kadar protein enzim α -amilase, penentuan aktivitas spesifik enzim α -amilase sebelum ditambah dengan asam askorbat, asam fitat dan asam oksalat, dan penentuan aktivitas spesifik enzim α -amilase setelah dilakukan penambahan asam askorbat, asam fitat dan asam oksalat.

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat yang Digunakan

- Spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu)
- Blender (Panalux)
- pH meter (Orion-420 A)
- Neraca analitik (Kern 870)
- Alat-alat gelas untuk analisa
- Magnetik stirer (Quart)
- Membran Selofan
- Inkubator
- Sentrifuge (Centrifuc-228)
- Botol semprot

3.1.2. Bahan-bahan yang Dibutuhkan

- Ubi jalar
- Amonium sulfat p.a. (Merck)
- Barium hidroksida p.a. (Merck)
- Seng sulfit p.a. (Merck)
- Folin–Ciocalteu p.a. (Merck)
- Amilum p.a. (Merck)
- Glukosa p.a. (Merck)
- Kasein p.a. (Merck)
- Barium klorida p.a. (Merck)
- Asam sulfat p.a. (Merck)
- Amonium molibdat p.a. (Merck)
- Akuades
- Natrium karbonat p.a. (Merck)
- Natrium hidroksida p.a. (Merck)
- Kalium natrium tartrat p.a. (Merck)
- Tembaga sulfat p.a. (Merck)
- Natrium bikarbonat p.a. (Merck)
- Natrium sulfat anhidrat p.a. (Merck)
- Asam askorbat p.a. (Merck)
- Asam fitat p.a. (Merck)
- Asam oksalat p.a. (Merck)

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang Dikonstankan

- a. Konsentrasi substrat
- b. Volume substrat
- c. Volume enzim
- d. Derajat keasaman (pH)
- e. Temperatur
- f. Waktu inkubasi

3.2.2. Variabel Bebas

- a. Konsentrasi asam askorbat
- b. Konsentrasi asam fitat
- c. Konsentrasi asam oksalat

3.2.3. Variabel yang Diukur

- a. Aktivitas enzim α -amilase
- b. Aktivitas spesifik enzim α -amilase

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi Larutan

- a. Pembuatan substrat amilum 1%

Sebanyak 1 g amilum dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL.

- b. Pembuatan reagen Lowry

- Lowry A dibuat dengan cara menimbang 2 g Na_2CO_3 , 0,4 g NaOH dan 0,02 g Kalium natrium tartrat, kemudian dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL.
 - Lowry B dibuat dengan cara menimbang 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga 25 mL.
 - Lowry C adalah campuran antara 50 bagian Lowry A dengan 1 bagian Lowry B (harus disiapkan baru).
- c. Pembuatan reagen Folin-Ciocalteu
- Sebanyak 1 bagian larutan Folin dicampur dengan 1 bagian akuades (harus disiapkan baru).
- d. Pembuatan larutan standar kasein
- Sebanyak 0,1 g kasein dilarutkan dengan akuades sampai 100 mL.
- Pengenceran dibuat dengan konsentrasi yang bervariasi sebagai berikut:
5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- e. Pembuatan larutan glukosa standar
- Sebanyak 10 mg glukosa dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL.
- Pengenceran dibuat dengan konsentrasi yang bervariasi sebagai berikut:
0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 mg/100 mL.
- f. Pembuatan reagen Nelson-Somougyi
- Reagen Nelson A
- Sebanyak 1,2 g Kalium natrium tartrat, 1,6 g Natrium bikarbonat, 14,4 g Natrium sulfat anhidrat, 2,4 g Natrium karbonat anhidrat

dilarutkan dengan akuades sampai 80 mL, disertai sedikit pemanasan.

- Reagen Nelson B

Sebanyak 2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ditambah dengan 18 g Na_2SO_4 anhidrat kemudian dilarutkan dengan akuades sampai 100 mL.

(Reagen Nelson-Somougyi adalah campuran 1 bagian larutan Nelson A dengan 1 bagian larutan Nelson B)

g. Pembuatan reagen Arsenomolibdat

- Sebanyak 5 g amonium molibdat dilarutkan dengan akuades sampai 80 mL, kemudian ditambah 4,2 mL H_2SO_4 (p) sambil diaduk (sebagai larutan I).

- Sebanyak 0,6 g Natrium arsenat dilarutkan dengan 5 mL akuades (sebagai larutan II).

- Larutan II dituang ke larutan I dan disimpan dalam botol berwarna coklat pada temperatur 37°C selama 48 jam.

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

Sebanyak 0,3153 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL.

i. Larutan ZnSO_4 0,01 M

Sebanyak 0,2874 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL.

j. Pembuatan bufer fosfat

- Larutan A adalah 0,2 M larutan Natrium fosfat monobasis (27,89 g dalam 1000 mL)
- Larutan B adalah 0,2 M larutan Natrium fosfat dibasis (52,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ atau 71,79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dalam 1000 mL).

Larutan dengan pH 6,1 dibuat dengan cara mencampurkan 85 mL larutan A dengan 15 mL larutan B, kemudian diencerkan sampai dengan 200 mL

k. Larutan CaCl_2 0,01 M

Sebanyak 0,088 g CaCl_2 dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL.

l. Pembuatan larutan asam askorbat

Dibuat variasi konsentrasi larutan asam askorbat sebagai berikut:

0,0; 0,2; 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; 2,2; 2,6; 3,0 mM.

m. Pembuatan larutan asam oksalat

Dibuat variasi konsentrasi larutan asam oksalat sebagai berikut:

0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0 mM.

n. Pembuatan larutan asam fitat

Dibuat variasi konsentrasi larutan asam fitat sebagai berikut:

0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 mM.

3.3.2. Isolasi Enzim

Sebanyak 500 g ubi jalar yang sudah dibersihkan, dipotong kecil-kecil dan dihomogenisasi dengan 250 mL buffer fosfat pH 6,1 dalam blender selama 15 menit. Campuran dibiarkan selama 1 sampai 2 jam pada temperatur 5°C. Homogenat selanjutnya disaring dengan kain dan filtrat disentrifugasi pada 3400 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar (*crude enzim*). Ekstrak kasar ini kemudian diuji aktivitasnya dengan metode Nelson-Somougyi. Selanjutnya dilakukan pemurnian secara bertingkat dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.3.3. Pemurnian Enzim

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

- Amonium sulfat ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan untuk tingkat fraksinasi 0-10%, 10-30% dan 30-50%. Diketahui dari penelitian sebelumnya bahwa pada fraksi 30-50% mempunyai aktivitas spesifik enzim α -amilase tertinggi yaitu pada 11,8662 U/mg^[4].
- Amonium sulfat yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam supernatan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan magnetik stirer secara perlahan dan dilakukan dalam tempat yang direndam dalam es.
- Campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama 2 jam lalu disentrifugasi hingga diperoleh endapan dan filtrat.

- Endapan yang diperoleh dari fraksi tersebut dilarutkan dengan bufer fosfat 0,2 M dengan pH 6,1.

b. Proses Dialisis

- Kantong selofan direbus selama 30 menit lalu dicuci dengan akuades.
- Salah satu ujung selofan diikat lalu diisi dengan larutan enzim. Kemudian ujung yang satu diikat dengan hati-hati untuk menghindari penggelembungan.
- Selofan diikat dengan benang lalu dimasukkan dalam beker gelas yang sudah berisi larutan bufer fosfat 0,002 M dengan pH 6,1.
- Bufer diaduk dengan magnetik stirer dan diganti tiap 2 jam sekali.
- Bufer yang diganti diuji kandungan amonium sulfatnya dengan menggunakan larutan BaCl_2 .

3.3.4. Penentuan Aktivitas Enzim α -Amilase

- Sebanyak 1 mL larutan substrat amilum 1%, 0,1 mL enzim, 3,9 mL bufer fosfat 0,2 M dengan pH 6,1 dimasukkan dalam tabung reaksi.
- Campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit.
- Sebanyak 0,1 mL larutan hasil inkubasi ditambah 0,2 mL larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,01 M dan 0,2 mL larutan ZnSO_4 0,01 M.
- Campuran digojog, disentrifugasi, dan diambil supernatannya.
- Supernatan ditambah dengan 1 mL reagen Nelson-Somougyi lalu digojog dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit.

- Kemudian tabung didinginkan dan ditambah dengan 1 mL reagen arsenomolibdat. Larutan ini didiamkan beberapa menit lalu diukur absorbansinya pada λ optimum.

Sebagai larutan standar digunakan larutan glukosa standar dengan konsentrasi bervariasi dari 0,2 – 2,0 mg/100 mL.

3.3.5. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

- Sejumlah 0,1 mL larutan enzim ditambah dengan 3 mL reagen Lowry C lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit.
- Campuran ditambah 0,3 mL larutan Folin dengan cepat dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar sambil sesekali digojog.
- Ditentukan λ optimum untuk larutan standar protein. Untuk kurva standar disiapkan larutan kasein dengan konsentrasi bervariasi dari 5–200 μ g/mL.

3.3.6. Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim α -Amilase

Setelah tahap isolasi selesai maka dilakukan tahap penentuan aktivitas spesifik enzim α -amilase. Enzim tersebut dibuat pada kondisi optimumnya, kemudian dilakukan penambahan substrat amilum 1% yang mengandung asam askorbat, fitat dan oksalat sebagai inhibitor pada berbagai variasi konsentrasi. Kondisi optimum enzim α -amilase dari penelitian sebelumnya diperoleh pada temperatur optimum 65°C, pH optimum 6,1 dan waktu inkubasi optimum 30 menit [4].