

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Pada penelitian ini enzim heksokinase diisolasi dari limbah 'fermentasi alkohol' yang berasal dari pembuatan anggur dari pisang biji. Isolasi enzim heksokinase dari limbah 'fermentasi alkohol' meliputi beberapa tahapan yaitu preparasi ekstrak kasar, fraksinasi amonium sulfat, dialisis, adsorpsi dengan menggunakan bentonit dan kristalisasi. Setelah enzim heksokinase berhasil diisolasi maka penelitian dilanjutkan dengan menentukan pengaruh penambahan klorpirifos pada aktivitas enzim heksokinase tersebut dalam suasana asam, netral dan basa dengan berbagai variasi konsentrasi.

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat

- Spektrometri 20 D
- Sentrifus Beckman model Tj-6
- Inkubator
- Membran dialisis
- Pengaduk magnet
- pH meter
- Neraca
- Ruang dingin

- Alat gelas untuk analisis

3.1.2. Bahan-bahan

- Limbah 'fermentasi alkohol' dari pembuatan anggur pisang biji
- Dinatrium hidro fosfat (p.a.)
- Amonium sulfat (p.a.)
- Asam Asetat (p.a.)
- Dinatrium EDTA (p.a.)
- Bentonit (teknis)
- Kasein (p.a.)
- Glukosa (p.a.)
- Natrium karbonat (p.a.)
- "Folin ciocalteau" (p.a.)
- Tris (p.a.)
- Kresol merah (p.a.)
- Magnesium klorida heksa hidrat (p.a.)
- Dinatrium ATP (p.a.)
- Natrium hidroksida (p.a.)
- Glisil glisin (p.a.)
- Dikaliun hidro fosfat (p.a.)
- Kalium dihidro fosfat (p.a.)
- Tembaga sulfat penta hidrat (p.a.)
- Kalium natrium tartat (p.a.)

- Akuades

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang diukur

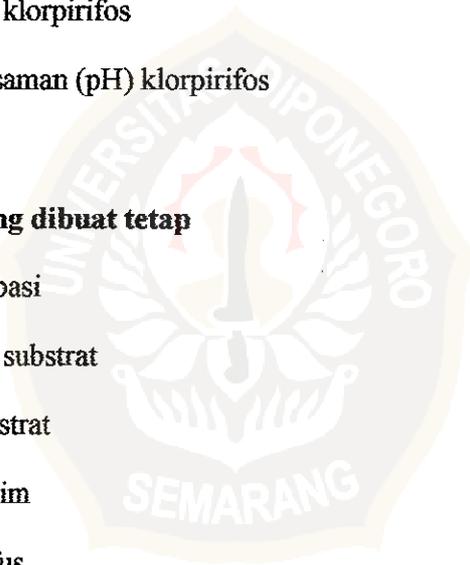
- Unit enzim heksokinase
- Kadar protein enzim heksokinase
- Aktivitas spesifik enzim heksokinase

3.2.2. Variabel bebas

- Konsentrasi klorpirifos
- Derajat keasaman (pH) klorpirifos

3.2.3. Variabel yang dibuat tetap

- Waktu inkubasi
- Konsentrasi substrat
- Volume substrat
- Volume enzim
- Suhu sentrifus



3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi Larutan

- Dinatrium hidro fosfat 0,2 M

Sebanyak 2,48 g Dinatrium hidro fosfat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.

- Asam asetat 3 N

Sebanyak 42,6 mL asam asetat pekat (17,6 M) diencerkan dengan akuades sehingga diperoleh 250 mL larutan.

- Buffer fosfat 0,1 M

Sebanyak 2,90 g Dikalium hidro fosfat dan 1,13 g Kalium dihidro fosfat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 250 mL larutan.

- Tris 0,05 M

Sebanyak 6,057 g Tris (BM= 121,14) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1.000 mL larutan.

- Natrium hidroksida 0,1 M

Sebanyak 2 g Natrium hidroksida (BM= 40) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 500 mL larutan.

- Dinatrium EDTA 0,002 M

Sebanyak 0,744 g Dinatrium EDTA dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1.000 mL larutan.

- Kalium dihidro fosfat 1 M

Sebanyak 13,609 g Kalium dihidro fosfat (BM = 136,089) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.

- Kresol merah 0,006 % dan Magnesium klorida heksa hidrat 1,6 %
Sebanyak 0,006 g kresol merah dan 1,6 g Magnesium klorida heksa hidrat dilarutkan dengan 5 mL etanol lalu dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.
- Dinatrium ATP 0,1 M
Sebanyak 0,551 g Dinatrium ATP (BM = 551,15) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 10 mL larutan.
- Glukosa 0,2 M
Sebanyak 0,9 g glukosa (BM = 180,16) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 25 mL larutan.
- Glisilglisin 0,1 M Natrium hidroksida, pH = 9
Sebanyak 0,33 g glisilglisin dilarutkan dengan 15 mL akuades dan ditambah Natrium hidroksida 0,1 M sampai pH = 9 kemudian diencerkan sehingga diperoleh 25 mL larutan.
- Lowry A
Sebanyak 2 g Natrium karbonat; 0,4 g Natrium hidroksida dan 0,02 g Kalium Natrium Tartrat dilarutkan dengan akuades hingga diperoleh 100 mL larutan.
- Lowry B
Sebanyak 0,15 g Tembaga sulfat penta hidrat dilarutkan dengan akuades hingga diperoleh 25 mL larutan.

- Lowry C

Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah dengan 1 bagian Lowry B (harus disiapkan baru).

- “Folin ciocalteau”

Folin 1 bagian dan akuades 1 bagian (harus disiapkan baru).

- Larutan Penguji

Sebanyak 7 mL campuran kresol merah 0,006% dan Magnesium klorida heksa hidrat 1,6 % ditambahkan dengan 1,5 mL Dinatrium ATP 0,1 M kemudian dinetralkan dengan Natrium hidroksida 0,1 M. Larutan campuran yang terbentuk ditambahkan 3 mL glisilglisin 0,1 M Natrium hidroksida, pH = 9 kemudian dilarutkan dengan akuades hingga 30 mL. Larutan harus disiapkan baru setiap kali dipakai.

3.3.2. Isolasi enzim heksokinase ^[4]

3.3.2.1. Preparasi Ekstrak Kasar

Limbah ‘fermentasi alkohol’ disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C kemudian endapan disuspensi dengan 100 mL Dinatrium hidro fosfat dengan konsentrasi 0,2 M kemudian campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 jam. Hasil yang diperoleh disentrifus 14.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C kemudian ekstrak kasar bersih dipisahkan.

3.3.2.2. Fraksinasi Amonium Sulfat

Pada ekstrak kasar, suhu dinaikan hingga 25 °C dan secara perlahan ditambah Asam Asetat 3 N sampai pH = 4,4. Lalu larutan didinginkan dalam air es dan disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C kemudian endapan yang terbentuk dipisahkan. Secara perlahan ditambahkan Amonium sulfat untuk fraksi I dengan tingkat kejenuhan 0 – 30 % kemudian larutan disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Endapan yang terbentuk merupakan fraksi 0 – 30 %. Supernatan hasil fraksinasi pertama diperlakukan sama hingga diperoleh fraksi dengan tingkat kejenuhan 30 – 65 % dan 65 – 100 %.

3.3.2.3. Dialisis

Membran selofan diisi dengan endapan yang diperoleh dari hasil fraksinasi yang telah dilarutkan dengan buffer fosfat. Kemudian didialisis dalam buffer fosfat 0,005 M pH = 7 dalam keadaan dingin. Tiap 4 jam sekali larutan buffer fosfat diganti dengan yang baru. Proses dialisis diakhiri dengan menguji larutan buffer fosfat tersebut dengan Barium klorida hingga tidak terbentuk endapan putih Barium sulfat lagi.

3.3.2.4. Adsorpsi dan Desorpsi dengan Menggunakan Bentonit

Larutan supernatan hasil dialisis ditambah dengan 3,6 g bentonit per 100 mL dan diaduk selama 1 jam. Selanjutnya disentrifus pada 14.000 rpm selama

10 menit pada suhu 4 °C. Residu bentonit yang mengandung heksokinase dicuci dalam 300 mL buffer fosfat 0,05 M pH = 7 dan disentrifus pada 14.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Residu bentonit bersih disuspensi dalam campuran 300 ml tris 0,05 M diNatrium EDTA 0,001 M dengan perbandingan 1 : 1. Lalu larutan disentrifus pada 14.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C kemudian larutan supernatan yang diperoleh dipisahkan.

3.3.2.5. Kristalisasi

Masing-masing larutan supernatan hasil adsorpsi dan desorpsi dengan menggunakan bentonit ditambah dengan larutan Kalium dihidro fosfat hingga pH = 4,4 lalu larutan disentrifus pada 14.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Endapan yang terjadi dilarutkan dalam 5 mL campuran buffer fosfat 0,1 M Dinatrium EDTA 0,002 M pH = 7 dan disentrifus pada 14.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Untuk kristalisasi, masing-masing larutan supernatan ditambah Amonium sulfat hingga jenuh. Lalu larutan diaduk selama 1,5 jam kemudian ditempatkan pada suhu 4 °C sampai terbentuk kristal.

3.3.2.6. Uji Aktivitas Enzim

Sebanyak 2,5 mL larutan uji ditambahkan 0,4 mL glukosa 0,2 M dan 0,1 mL enzim. Campuran diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit kemudian diukur serapannya pada 560 nm dengan spektrofotometer UV - VIS.

3.3.2.7. Penentuan Kadar Protein Lowry

Sebanyak 0,6 mL larutan sampel ditambah dengan 3 mL larutan Lowry C kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Campuran ditambah 0,3 mL larutan folin dengan cepat dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali digojog. Ditentukan panjang gelombang optimum untuk larutan standar protein dengan spektrofotometer UV - VIS. Untuk kurva standar disiapkan larutan standar kasein dengan variasi konsentrasi 0,00; 0,02; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08; 0,09; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18 dan 0,20 mg / L.

3.3.3. Pengaruh Klorpirifos terhadap Aktivitas Enzim Heksokinase

Sebanyak 2,5 mL larutan uji ditambahkan 0,4 mL glukosa 0,2 M, 0,1 mL enzim dan 0,1 mL larutan klorpirifos dengan variasi konsentrasi 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 mL / Liter larutan dalam 3 suasana yaitu suasana asam, netral dan basa. Campuran diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit kemudian diukur serapannya pada 560 nm dengan spektrofotometer UV – VIS.