

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Tahap-tahap yang telah dilakukan pada penelitian ini meliputi: preparasi ekstrak kasar, pemurnian enzim melalui fraksinasi dengan garam amonium sulfat, dialisis, adsorpsi dengan menggunakan bentonit, kristalisasi, penentuan kadar protein enzim heksokinase, dan penentuan aktivitas enzim heksokinase setelah penambahan insektisida karbofuran.

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat

- Timbangan Elektrik (Mettler AT 200)
- Sentrifuse (Centrif-228)
- pH-meter (Orion-420 A)
- Inkubator (Hammert)
- Lemari Pendingin (Sharp)
- Magnetik stirer (Quart)
- Membran Selofan
- Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-12010)
- Peralatan gelas

3.1.2. Bahan-bahan

- Limbah fermentasi pisang
- Dinatrium hidrogen Fosfat (p.a)
- Amonium sulfat (p.a)

- Barium klorida (p.a)
- Amonium sulfat (p.a)
- Asam asetat (p.a)
- Bentonit (p.a)
- Buffer tris (p.a)
- Kalium dihidrogen Fosfat (p.a)
- Folin ciocalteau (p.a)
- Kasein (p.a)
- Kalium natrium tartat (p.a)
- Natrium karbonat (p.a)
- Glisil glisin (p.a)
- Glukosa (p.a)
- Kresol merah (p.a)
- Natrium hidroksida (p.a)
- Magnesium diklorida heksahidrat (p.a)
- Tembaga sulfat (p.a)
- Dinatrium adenin trifosfat.(p.a)
- Kalium hidrogen fosfat
- Akuades

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel yang diukur

- Aktivitas enzim heksokinase
- Aktivitas spesifik enzim heksokinase

3.2.2. Variabel bebas

- Konsentrasi karbofuran

3.2.3. Variabel yang dikonstankan

- Konsentrasi substrat
- Volume substrat dan enzim
- Suhu sentrifugasi 4 °C

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi Larutan

a. Larutan Na_2HPO_4 0,1 M

Ditimbang 1,42 g Na_2HPO_4 anhidrat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.

b. Larutan Na_2HPO_4 0,2 M

Ditimbang 2,48 g Na_2HPO_4 anhidrat dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.

c. Larutan CH_3COOH 3 N

Diencerkan 42,6 mL CH_3COOH pekat (17,6 M) dengan akuades sehingga diperoleh 250 mL larutan.

d. Larutan Bufer fosfat 0,1 M

Ditimbang 1,74 g K_2HPO_4 dan 0,68 g KH_2PO_4 dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.

e. Larutan Bufer fosfat 0,05 M

Ditimbang 5,31 g K_2HPO_4 dan 2,66 g KH_2PO_4 dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1000 mL larutan

- f. Larutan Tris 0,05 M
Ditimbang 0,057 g Tris (BM = 121,14) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1000 mL.
- g. Larutan NaOH 0,1 M
Ditimbang 2 g NaOH (BM = 40) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 500 mL larutan.
- h. Larutan NaOH 0,01 M
Ditimbang 0,4 g NaOH dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1000 mL larutan.
- i. Larutan Na₂(EDTA) 0,002 M
Ditimbang 0,744 g Na₂(EDTA) (BM = 372,25) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 1000 mL larutan.
- j. Larutan Na₂(EDTA) 0,001 M
Ditimbang 0,372 g Na₂(EDTA) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.
- k. Larutan KH₂PO₄ 1 M
Ditimbang 13,609 g KH₂PO₄ (BM = 136,089) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.
- l. Larutan Kresol merah 0,006 %
Ditimbang 0,09 g kresol merah dilarutkan dengan 0,01 N NaOH sehingga diperoleh 1500 mL larutan Homogen

m. Larutan $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,6 %

Ditimbang 1,6 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 100 mL larutan.

n. Larutan Na_2ATP 0,1 M

Ditimbang 0,551 g Na_2ATP (BM = 551,15) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 10 mL larutan.

o. Larutan Glukosa 0,2 M

Ditimbang 0,9 g glukosa anhidrat (BM = 180,16) dilarutkan dengan akuades sehingga diperoleh 25 mL larutan.

p. Larutan Glisil glisin 0,1 M NaOH pH 7

Ditimbang 0,33 g glisil glisin dilarutkan dengan 15 mL akuades dan ditambah NaOH 0,1 M sampai pH 9 kemudian diencerkan sehingga diperoleh 25 mL larutan.

q. Pembuatan Reagen Lowry

- Lowry A

Sebanyak 2 g Na_2CO_3 ; 0,4 g NaOH dan 0,02 g KNa-Tartat dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL

- Lowry B

Sebanyak 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan akuades hingga 25 mL.

- Lowry C

Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B

- Folin

Sebanyak 1 bagian folin ciocalteau ditambah 1 bagian akuades.

- Pembuatan Larutan Penguji

Dibuat campuran 7 mL kresol merahi 0,006 % $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,6 % lalu ditambahkan 1,5 mL ATP 0,1 M dan dinetralkan dengan NaOH 0,1 M.

Larutan campuran yang terbentuk ditambahkan 3 mL glisil glisin 0,1 M NaOH pH 9 kemudian dilarutkan dengan akuades hingga 30 mL.

Larutan harus disiapkan baru setiap kali dipakai.

- Pembuatan larutan karbofuran

Dibuat variasi konsentrasi larutan karbofuran sebagai berikut : 0,1; 0,5; 1 ; 2; dan 2,5 mg/L

3.3.2. Isolasi enzim heksokinase

3.3.2.1. Preparasi ekstrak kasar

Limbah fermentasi alkohol disentrifuse pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Kemudian endapan dipisahkan. Endapan sebanyak 33,3 g disuspensi dengan 100 mL Na_2HPO_4 0,2 M kemudian campuran diinkubasi selama 3 jam. Campuran disentrifuse pada 14.000 rpm selama 30 menit, selanjutnya ekstrak kasar bersih dipisahkan.

3.3.2.2. Fraksi ammonium sulfat

Ekstrak kasar ditambah CH_3COOH 3 N sampai pH 4,4. Dan selanjutnya disentrifuse pada 10.000 rpm selama 10 menit, endapan yang terbentuk dipisahkan. Kemudian kedalam 100 mL supernatan secara perlahan ditambahkan 17,6 g amonium sulfat padat (0-30 %), larutan disentrifuse pada 10.000 rpm

selama 10 menit, endapan yang terbentuk dipisahkan. Kemudian pada 120 mL supernatan hasil sentrifuse ditambahkan secara perlahan 24,3 g ammonium sulfat padat, larutan kemudian disentrifuse pada 10.000 rpm selama 10 menit, endapan yang terbentuk dipisahkan. Kemudian pada 135 mL larutan supernatan hasil sentrifuse secara perlahan ditambahkan 34,6 g amonium sulfat, larutan kemudian disentrifuse pada 10.000 rpm, endapan yang terbentuk dipisahkan. Masing-masing endapan yang terbentuk dari 0-30; 30-65 dan 65-100 % jenuh dilarutkan dengan akuades dingin hingga volume 4 mL. Ketiga larutan hasil ditempatkan dalam membran dialisis yang telah dicuci bersih dengan akuades pada suhu 60 °C dan didialisis dengan 300 mL bufer fosfat 0,05 M pH 7 selama 4 jam dan tiap 4 jam sekali larutan bufer diganti dengan yang baru. Setelah dialisis, kemudian larutan disentrifuse pada 10.000 rpm selama 10 menit kemudian endapan dipisahkan. Larutan supernatan dilarutkan dengan 4 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7.

3.3.2.3. Adsorpsi dengan menggunakan bentonit

Larutan supernatan ditambah dengan 0,288 g bentonit dan diaduk selama 1 jam selanjutnya disentrifuse pada 14.000 rpm selama 10 menit. Residu bentonit yang mengandung heksokinase dicuci dalam 300 mL bufer fosfat 0,05 M pH 7 dan disentrifuse pada 14.000 rpm selama 10 menit. Residu bentonit bersih disuspensi dalam campuran 300 mL tris 0,05 M dan Na₂(EDTA) 0,001 M dengan perbandingan 1:1. Larutan disentrifuse pada 14.000 rpm selama 30 menit kemudian larutan supernatan dipisahkan.

3.3.2.4. Kristalisasi

Larutan supernatan ditambah dengan larutan KH_2PO_4 hingga pH 4,4. Untuk setiap 100 mL larutan ditambah 51,6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ padat jenuh dan disentrifuse pada 14.000 rpm selama 10 menit, endapan yang terjadi dikumpulkan. Endapan dilarutkan dalam 5 mL bufer fosfat 0,1 M $\text{Na}_2(\text{EDTA})$ 0,002 M pH 7 dan disentrifuse pada 14.000 rpm selama 30 menit. Untuk kristalisasi larutan supernatan bersih ditambah dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hingga jenuh. Larutan diaduk selama 1,5 jam dan ditempatkan pada suhu 4 °C hingga terbentuk kristal enzim heksokinase .

3.3.3 Uji aktivitas

3.3.3.1. Uji aktivitas enzim Heksokinase

Sebanyak 2,5 mL larutan uji ditambahkan 0,4 mL larutan glukosa 0,2 M dan 0,1 mL enzim pada 30 °C kemudian diukur serapannya pada 560 nm. Untuk tiap-tiap langkah dalam preparasi enzim dilakukan pengujian terhadap aktivitas enzim.

3.3.3.2. Uji aktivitas enzim dengan penambahan karbofuran

Sebanyak 2,5 mL larutan enzim ditambahkan dengan 0,4 mL glukosa 0,2 M, 0,1 mL enzim serta 0,1 mL larutan karbofuran (dengan variasi konsentrasi 0,1; 0,5; 1; 2 dan 2,5 mg/L) kemudian diukur serapannya pada 560 nm.

3.3.4. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

Sebanyak 0,6 mL larutan sampel ditambahkan 3 mL Lowry C. Diinkubasikan selama 20 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan 0,3 mL

larutan folin dengan cepat dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali digojog.

Campuran diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum dari kasein dengan menggunakan spektrofotometer.

