

## BAB III

### METODE PENELITIAN

Tahap-tahap penelitian untuk mendapat enzim peroksidase meliputi ekstraksi, sentrifugasi, fraksinasi bertingkat, dialisis dilanjutkan dengan penentuan aktivitas spesifik dan karakterisasi enzim.

#### 3.1. Variabel Penelitian

Penentuan aktivitas spesifik enzim menggunakan variabel berubah berupa temperatur dan pH, sedangkan variabel yang dikonstantakan terdiri dari konsentrasi enzim, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi.

#### 3.2. Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat-alat berupa blender (Sanken) yang berfungsi memecah dinding sel biji kedelai sehingga enzim dapat keluar dari dalam sel, sentrifuse (Centrif-228) untuk memisahkan partikel-partikel yang berbeda berat jenis, ukuran dan bentuk berdasarkan gaya sentrifugal, membran selofan, pengaduk magnetik (Quart), timbangan elektrik (Mettler AT 200), pH-meter (Orion), inkubator (Hammert), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1201) dan peralatan gelas untuk analisis.

##### 3.2.2. Bahan

Bahan-bahan untuk penelitian adalah biji kedelai, natrium hidroksida 0,1 M (p.a), asam klorida 0,1 M (p.a), hidrogen peroksida 30 % (p.a), dikalium hidrogen fosfat (p.a), kalium dihidrogen fosfat (p.a), amonium sulfat kristal (p.a), tembaga

sulfat (p.a), natrium karbonat (p.a), natrium kalium tartrat (p.a), bufer tris (p.a), kasein (p.a), folin (p.a), 4-aminoantipirin (p.a), barium klorida (p.a) dan aquades.

### 3.3. Metode Kerja

#### 3.3.1. Preparasi larutan

Larutan bufer fosfat pH = 6 dibuat dengan cara melarutkan 1,74 g  $K_2HPO_4$  dalam akuades dengan labu takar 100 mL hingga diperoleh 100 mL larutan, kemudian larutan  $K_2HPO_4$  dicampur dengan larutan  $KH_2PO_4$  sampai pH sebesar 6.

Bufer tris dibuat dengan melarutkan 2,42 g bufer tris dengan akuades sehingga diperoleh 1000 mL larutan dan diatur pH menjadi 7 dengan HCl.

Larutan standar kasein 0,18; 0,16; 0,14; 0,12; 0,10; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02  $mg \cdot mL^{-1}$  dibuat dengan melarutkan sebanyak 0,02 g kasein kedalam akuades hingga 100 mL, kemudian diencerkan untuk membuat konsentrasi kasein tersebut.

Larutan Lowry A dibuat dengan melarutkan 2 g  $Na_2CO_3$ , 0,4 g NaOH dan 0,02 g natrium kalium tartrat kedalam akuades dalam labu takar 100 mL sehingga diperoleh 100 mL larutan. Pembuatan larutan Lowry B dengan cara melarutkan 0,15 g  $CuSO_4$  dalam akuades dalam labu takar 100 mL sehingga diperoleh 100 mL larutan dan larutan Lowry C dengan cara mencampurkan Lowry A sebanyak 50 bagian dengan 1 bagian Lowry B.

Larutan 4-AAP-fenol dibuat dengan cara 0,81 g fenol dan 0,025 g 4-aminoantipirin dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 50 mL.

### **3.3.2. Isolasi Enzim**

#### **3.3.2.1. Ekstraksi**

Sebanyak 250 g kedelai bersih, dihomogenasi dengan  $K_2HPO_4$  0,1 M dalam blender selama 20 menit. Campuran dibiarkan kurang lebih selama 1 - 2 jam pada suhu 5 °C. Homogenat disaring dengan kertas saring, filtratnya disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapat merupakan enzim kasar.

#### **3.3.2.2. Fraksinasi dengan garam amonium sulfat**

Amonium sulfat ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan untuk tiap fraksinasi (dari tabel pada lampiran). Amonium sulfat yang sudah ditimbang dengan kejenuhan 0 – 10 % (F1) dimasukkan kedalam supernatan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan pengaduk magnet secara perlahan pada suhu rendah agar enzim tidak terdenaturasi.

Campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama 2 jam, lalu disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm hingga diperoleh endapan dan filtrat. Filtrat difraksinasi dengan tingkat kejenuhan amonium sulfat 10 – 20 % (F2), lalu diperlakukan sama untuk kejenuhan amonium sulfat 20 – 40 % (F3) dan 40 – 65 % (F4). Endapan yang diperoleh tiap fraksi dilarutkan dalam 0,2 M buffer tris dengan pH sebesar 7.

#### **3.3.2.3. Dialisis**

Kantong selofan direbus selama 30 menit lalu dicuci dengan aquades. Salah satu ujung selofan diikat lalu diisi dengan larutan enzim kemudian ujung yang lain diikat dengan hati-hati untuk menghindari pengembangan. Selofan diikat dengan

benang lalu dimasukkan dalam gelas beker yang sudah terisi larutan bufer tris 0,002 M dengan pH sebesar 7.

Bufer diaduk dengan pengaduk magnetik dan diganti tiap 2 jam sekali. Bufer yang diganti diuji kandungan amonium sulfat dengan penambahan  $\text{BaCl}_2$  sehingga tidak terbentuk endapan.

#### **3.3.2.4. Penentuan Aktivitas Enzim Peroksidase**

Sebanyak 0,1 mL supernatan ekstrak kasar dan hasil dialisis pada F1, F2, F3, F4 masing-masing ditambah dengan bufer fosfat 0,1 M pH sebesar 6 sebanyak 4 mL,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % 0,5 mL dan 0,4 mL larutan 4-aminoantipirin-fenol sehingga volume total menjadi 5 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 60 °C selama 5 menit. Setelah terjadi perubahan warna, masing-masing larutan ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm<sup>[16]</sup>.

#### **3.3.2.5. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry**

Sebanyak 0,1 mL supernatan ekstrak kasar dan hasil fraksinasi pada F1, F2, F3 dan F4, masing-masing ditambah dengan reagen Lowry C sebanyak 3 mL, didiamkan selama 20 menit pada suhu kamar. Folin sebanyak 0,3 mL ditambahkan dengan cepat dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali digojog. Pada pembuatan kurva standar, disiapkan larutan kasein dengan konsentrasi bervariasi dari 0,18 – 0,02 mg.mL<sup>-1</sup>. Absorbansinya dibaca pada panjang gelombang maksimum sebesar 740 nm<sup>[17]</sup> dengan spektrofotometer UV-Vis.

#### **3.3.2.6. Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Peroksidase**

Aktivitas spesifik enzim adalah perbandingan antara unit aktivitas dengan kadar protein enzim. Nilai aktivitas spesifik enzim peroksidase masing-masing fraksi

diperoleh melalui perhitungan dari data penentuan aktivitas enzim dan penentuan kadar protein.

### 3.3.2.7. Karakterisasi Enzim Peroksidase

Sebanyak 0,1 mL hasil dialisis pada F2 (fraksi dengan kemurnian enzim tertinggi) ditambah dengan 4 mL bufer fosfat 0,1 M dengan variasi pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 dan 0,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % serta 0,4 mL larutan 4-Aminoantipirin-fenol sehingga volume total menjadi 5 mL. Larutan dimasukkan ke dalam inkubator pada temperatur 30 °C selama 5 menit. Prosedur tersebut dilakukan lagi untuk variasi temperatur 40, 50, 60, 70 dan 80 °C. Setelah terjadi perubahan warna, masing-masing larutan ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm<sup>161</sup> dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga dapat ditentukan unit aktivitas enzim.

