

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Pada penelitian ini dilakukan penentuan prosentase penghambatan ion Cu^{2+} dan EDTA terhadap aktivitas enzim selulase rayap. Tahap penelitian ini meliputi :

1. Tahap isolasi enzim

- a. Ekstraksi
- b. Fraksinasi
- c. Dialisis

2. Tahap karakterisasi

- a. Penentuan aktivitas enzim selulase
- b. Penentuan kadar protein enzim selulase
- c. Penentuan aktivitas spesifik enzim selulase
- d. Penentuan aktivitas spesifik enzim selulase setelah ditambah berbagai variasi konsentrasi Cu^{2+} dan EDTA

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat yang digunakan

- a. Alat-alat gelas
- b. Spektrofotometer UV-VIS
- c. Sentrifuga Centrifuc -228
- d. Membran selofan

- e. pH-meter
- f. Pengaduk magnetik
- g. Kompor listrik
- h. Lemari Pendingin (Sharp)

3.1.2. Bahan-bahan yang digunakan

- a. Amonium sulfat kristal (pa)
- b. Asam asetat (pa)
- c. Natrium asetat (pa)
- d. Natrium klorida (pa)
- e. Karboksi metil selulosa (pa)
- f. Glukosa
- g. Kalium natrium tartrat (pa)
- h. Natrium karbonat (pa)
- i. Natrium sulfat (pa)
- j. Tembaga sulfat pentahidrat (pa)
- k. Amonium molibdat
- l. Natrium arsenat heptahidrat (pa)
- m. Folin cioucalteufenol(pa)
- n. Barium hidroksida heksahidrat (pa)
- o. Seng sulfat heptahidrat (pa)
- p. Aquades

- q. Reagen Lowry A
- r. Reagen Lowry B
- s. Reagen Lowry C
- t. Reagen Lowry D
- u. Asam sulfat
- v. Reagen Nelson-Somougyi
- w. Es batu
- x. Natrium bikarbonat
- y. Rayap
- z. EDTA (pa)

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang diukur

- a. Aktivitas enzim selulase
- b. Aktivitas spesifik enzim selulase

3.2.2. Variabel yang dikendalikan

- a. Derajat keasaman (pH)
- b. Waktu inkubasi
- c. Temperatur
- d. Volume enzim selulase

- e. Konsentrasi substrat
- f. Volume substrat

3.2.3. Variabel bebas

- a. Konsentrasi Cu^{2+} .
- b. Konsentrasi EDTA.

3.2. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi Larutan

1. Pembuatan larutan CH_3COONa 0,05 M^[26]

Sebanyak 6,8 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan aquades hingga diperoleh 1 liter larutan.

2. Larutan CH_3COOH 0,05 M^[26]

Sebanyak 2,9 mL asam asetat glasial dilarutkan dengan aquades hingga diperoleh 1 liter larutan.

3. Larutan Substrat CMC 0,5 %^[26]

Sebanyak 0,5 g CMC ditambah dengan buffer asetat 0,05 M dengan pH yang bervariasi hingga diperoleh 100 mL larutan.

4. Larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,01 M^[26]

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

5. Larutan standar glukosa^[9]

Sebanyak 10 mg glukosa dilarutkan dengan aquades hingga diperoleh 100 mL larutan (10 mg/100 mL). Kemudian diencerkan untuk membuat larutan glukosa standar dengan variasi konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 mg/100 mL^[11].

6. Larutan standar kasein.

Sebanyak 0,1 g kasein dilarutkan dengan aquades hingga diperoleh 100 mL larutan (1000 µg/mL), kemudian diencerkan untuk membuat larutan standar kasein dengan variasi konsentrasi 50, 100, 200, 300, 400 dan 500 µg/mL.

7. Larutan arsenomolibdat^[26]

Sebanyak 5 g amonium molibdat dilarutkan dengan 80 mL aquades dan ditambah dengan 4,2 mL H₂SO₄ pekat. 0,6 g NaHAsO₄·7.H₂O dilarutkan dengan 5 mL aquades. Kedua larutan dicampur kemudian disimpan dalam botol coklat dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam.

8. Larutan buffer asetat 0,05 M dengan pH = 5,2^[26]

Larutan CH₃COOH 0,05 M:

Sebanyak 3,3 mL CH₃COOH dilarutkan dengan aquades hingga 1000 mL.

Larutan CH₃COONa 0,05 M:

Sebanyak 6,8 g CH₃COONa.3.H₂O dilarutkan dengan aquades hingga 1000 mL.

14,8 mL larutan CH₃COOH 0,05 M ditambah 35,2 mL larutan CH₃COONa 0,05 M, lalu diencerkan hingga volume 100 mL.

9. Reagen Lowry^[27]

Lowry A: Sebanyak 10 g Na₂CO₃ ditambah 2 g NaOH dan 0,2 g natrium kalium tartrat dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 500 mL.

Lowry B: Sebanyak 0,6 g CuSO₄.5.H₂O dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL.

Lowry C: Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B.

Lowry D: Folin ciocalteufenol 1 bagian ditambah aquades 1 bagian.

10. Pembuatan ZnSO₄.7.H₂O 0,01 M^[26]

Melarutkan 0,28738 g ZnSO₄.7.H₂O dalam 100 mL aquades sambil diaduk hingga larut semua.

11. Pembuatan Reagen Nelson-Somogyi^[27]

Reagen A: Sebanyak 1,20 g kalium natrium tartrat 2,4 g Na₂CO₃; 1,6 g NaHCO₃; 14,4 g Na₂SO₄ anhidrat

dilarutkan dengan aquades hingga 80 mL disertai sedikit pemanasan.

Reagen B: Sebanyak 2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 18 g Na_2SO_4 anhidrat dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL.

Reagen Nelson-Somougyi didapat dengan mencampurkan 1 bagian reagen A ditambah 1 bagian reagen B. Pencampuran dilakukan pada saat akan digunakan.

12. Pembuatan Larutan NaCl 1 % dingin^[26]

Sebanyak 5 g NaCl dilarutkan dengan aquades hingga diperoleh 500 mL, kemudian didinginkan.

13. Pembuatan Larutan Inhibitor Cu^{2+} ^[26]

Dibuat variasi konsentrasi larutan Cu^{2+} sebagai berikut:

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

14. Pembuatan Larutan Inhibitor EDTA^[26]

Dibuat variasi konsentrasi larutan EDTA sebagai berikut:

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 Selulase^[9]

Sebanyak 35 g rayap ditambah dengan 500 mL larutan NaCl 1 % dingin sedikit demi sedikit lalu diblender pada pH = 7 selama 10 menit. Hasil pemblenderan disaring dengan kain pada suhu kamar. Filtrat yang diperoleh didialisis untuk membebaskan ekstrak kasar dari garam NaCl

selama 10 – 12 jam dengan buffer asetat 0,0005 M dalam temperatur 10 °C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3400 rpm selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya dengan substrat yaitu CMC. Selanjutnya dilakukan pemurnian enzim secara bertingkat dengan amonium sulfat.

3.3.3. Fraksinasi dengan Garam Amonium Sulfat

Kejenuhan fraksinasi enzim dengan amonium sulfat dilakukan dengan variasi 0 – 20 % (F1); 20 – 40 % (F2); 40 – 60 % (F3); 60 – 80 % (F4); dan 80 – 100 % (F5). Fraksinasi pada kejenuhan enzim 0 – 20 % (F1) dibutuhkan amonium sulfat sebanyak 24,05 g untuk 211 mL larutan enzim. Amonium sulfat yang sesuai dengan kejenuhan fraksi tersebut dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam filtrat sambil diaduk. Pengadukan dilakukan dengan pengaduk magnetik secara perlahan-lahan dan campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama 1 malam, lalu disentrifugasi hingga diperoleh endapan dan filtrat. Filtrat sebagai larutan enzim difraksinasi untuk fraksi selanjutnya. Volume filtrat yang diperoleh dijadikan sebagai pedoman untuk menghitung gram amonium sulfat yang dibutuhkan untuk fraksi selanjutnya. Amonium sulfat yang dibutuhkan untuk tiap fraksi dapat dilihat pada lampiran 10 dan fraksinasi untuk tiap fraksi yang lain dilakukan sesuai prosedur pada fraksi F1. Pada akhir proses fraksinasi didapatkan endapan dari fraksi F1, F2, F3, F4, dan F5.

Endapan tersebut disuspensikan ke dalam buffer asetat 0,05 M dengan pH = 5,2. Selanjutnya endapan tersebut didialisis.

3.3.4. Proses Dialisis^[9]

Proses dialisis dilakukan menggunakan kantong selofan yang telah direbus selama 30 menit dalam aquades. Selofan yang telah diisi larutan enzim hasil fraksinasi diikat kedua ujungnya dengan benang, lalu dimasukkan ke dalam gelas beker yang berisi buffer asetat 0,0005 M pada pH = 5,2. Buffer diaduk dengan pengaduk magnetik dan diganti setiap jam. Kandungan amonium sulfatnya diuji dengan menambahkan Ba(OH)₂ hingga tidak membentuk endapan putih lagi.

3.3.5. Penentuan Kadar Protein Enzim dengan Metode Lowry

Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah dengan 3 mL reagen Lowry C lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Setelah itu ditambah 0,3 mL larutan folin ciocalteufenol dan didiamkan selama 45 menit pada suhu kamar serta sesekali dikocok, kemudian ditentukan absorbansinya pada λ optimum kasein = 750 nm^[27]. Sebagai larutan standar digunakan larutan kasein dengan konsentrasi 0, 50, 100, 200, 300, 400, dan 500 $\mu\text{g/mL}$.

3.3.6. Penentuan Aktivitas Enzim^[7,9]

0,1 mL enzim ditambah 4,9 mL substrat CMC 0,5 % dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada pH = 5,2; T = 45 °C selama 45 menit. Hasil inkubasi ditentukan kadar gula pereduksinya memakai metode Nelson-Somougyi.

3.3.7. Penentuan Kadar Gula Pereduksi dengan Metode Nelson-Somougyi

Sebanyak 0,1 mL larutan hasil inkubasi (3.3.6) ditambah 0,2 mL larutan Ba(OH)₂ dan 0,2 mL larutan ZnSO₄, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Campuran dikocok, disentrifugasi dan diambil filtratnya. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang lain, kemudian ditambah dengan 1 mL reagen Nelson Somougyi, dikocok dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Larutan didinginkan, ditambah dengan 1 mL reagen arsenomolibdat, kemudian didiamkan beberapa menit. Larutan tersebut diencerkan sampai volume 5 mL dan diukur absorbansinya pada λ optimum glukosa = 750 nm^[27]. Sebagai larutan standar digunakan larutan glukosa dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 mg/100 mL^[9].

3.3.8. Penentuan Aktivitas Enzim dengan Adanya Inhibitor Cu^{2+} dan EDTA.

Penentuan pengaruh Cu^{2+} terhadap aktivitas enzim selulase rayap dilakukan dengan cara menambahkan inhibitor Cu^{2+} dengan konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; ...; 5,0 mM ke dalam larutan substrat. Pada saat penentuan aktivitas, volume enzim, volume substrat, dan konsentrasi substrat dikondisikan sama^[24]. Selanjutnya dilakukan sesuai prosedur 3.3.6 dan 3.3.7. Perlakuan yang sama dilakukan untuk inhibitor EDTA dengan variasi konsentrasi yang sama dengan inhibitor Cu^{2+} .

