

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Asparaginase dapat ditemukan dalam berbagai macam sumber seperti tumbuhan, hewan, dan mikroba. Untuk memperoleh enzim tersebut perlu dilakukan isolasi yang meliputi beberapa tahap yaitu ekstraksi, fraksinasi, dialisis dan penentuan aktivitas. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi asparaginase dari daun benalu petai kering dan basah. Isolasi dilanjutkan dengan karakterisasi yang meliputi penentuan suhu dan waktu inkubasi optimum asparaginase. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro.

3.1. Variabel Penelitian

3.1.1. Variabel yang Diukur

- Aktivitas asparaginase
- Aktivitas spesifik asparaginase

3.1.2. Variabel Bebas

- Suhu
- Waktu Inkubasi

3.1.3. Variabel yang Dikonstankan

- Konsentrasi substrat
- Volume Enzim
- Volume Substrat
- Derajat Keasaman (pH)

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Sentrifuga (Centrifug-228), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), inkubator (Mettler), blender (Panalux), neraca analitik (Kern 870), pH-meter (Orain-420A), magnetik stirer (Quart), membran selofan, lumpang dan penumbuk porselin, botol semprot, alat-alat gelas untuk analisis.

3.2.2. Bahan

Daun benalu petai, asparagin, amonium sulfat, akuades, Bovine Serum Albumin (BSA), merkuri (II) klorida, folin-ciocalteau, trikloro asetat (TCA), BaCl_2 , bufer Tris-hidroksimetil aminometan, HCl, Na_2CO_3 , kalium natrium tartrat, NaOH, KI, CuSO_4 yang semuanya berkualitas p.a. dan kertas saring.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Preparasi Larutan

- a. Larutan 0,2 M bufer Tris-hidroksimetil aminometan pH 8,6

Kristal Tris-hidroksimetil aminometan 24,22 g ditambah akuades sampai volume 1 L, kemudian ditambahkan HCl hingga pH 8,6

- b. Larutan 0,002 M bufer Tris-hidroksimetil aminometan pH 8,6

Larutan 0,2 M bufer Tris-hidroksimetil aminometan pH 8,6 sebanyak 1 mL diencerkan dengan akuades hingga volumenya menjadi 100 mL

- c. Larutan 0,01 M BaCl_2

Kristal BaCl_2 0,2083 g ditambah akuades sampai volumenya 100 mL

- d. Larutan 1,5 M TCA

Kristal TCA 24,5085 g ditambah akuades sampai volumenya 100 mL

e. Reagen Lowry

-Lowry A

Na_2CO_3 sebanyak 2 g ditambah 0,4 g NaOH, 0,04 g kalium natrium tartrat, dan akuades sampai volumenya 100 mL

-Lowry B

CuSO_4 0,15 g ditambah akuades sampai volumenya 25 mL

-Lowry C

Lowry A 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B

-Lowry D

Folin-Ciocalteu 1 bagian ditambah 1 bagian akuades

f. Reagen Nessler

Kristal KI sebanyak 5 g ditambah akuades 5 mL, larutan HgCl_2 (1 : 20 atau 1 g HgCl_2 dalam 20 mL akuades) sampai terbentuk endapan merah yang tidak hilang lagi. Kemudian disaring dengan kertas saring, filtrat yang diperoleh ditambah 15 g NaOH dalam 30 mL akuades lalu diencerkan sampai volumenya 100 mL, didiamkan kemudian disaring dan diambil yang jernih.

g. Pembuatan Larutan Substrat Asparagin

Kristal asparagin 2,5 g ditambah akuades sampai volumenya menjadi 100 mL

h. Pembuatan Larutan Standar Amonium Sulfat 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Kristal amonium sulfat 0,03 g ditambah akuades sampai volume 100 mL

i. Pembuatan Larutan Standar BSA 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

BSA 0,05 g ditambah akuades sampai volumenya 100 mL

3.3.2 Isolasi

Dalam rangka mendapatkan daun benalu kering, maka daun benalu segar dibiarkan pada suhu kamar selama 2 hari. Daun benalu petai segar dan kering masing-masing 250 g dipotong-potong kemudian dihomogenisasi dengan 125 mL 0,2 M bufer Tris-hidroksimetil aminometan pH 8,6 dalam blender selama 20 menit. Campuran dibiarkan 1 – 2 jam pada suhu 5 °C, lalu disaring. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi pada 3400 rpm selama 10 menit. Filtrat merupakan ekstrak kasar.

3.3.3. Fraksinasi

Amonium sulfat ditimbang sesuai fraksi yang dikehendaki 0 – 20 % dari tabel, lalu dimasukkan ke dalam ekstrak kasar sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnetik dalam penangas es. Campuran didiamkan selama satu malam dalam keadaan dingin, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 50 menit. Endapan dipisahkan dan disuspensi dengan 0,2 M bufer Tris-hidroksimetil aminometan pH 8,6. Endapan tersebut merupakan fraksi 0 – 20 % (F1).

Filtrat diperlakukan sama dengan diatas sehingga diperoleh fraksi dengan tingkat kejenuhan 20 – 40 %, 40 – 60 %, 60 – 80 %, 80 – 100 %.

3.3.4. Dialisis

Dialisis dilakukan dengan menggunakan membran selofan yang telah direbus selama 30 menit dan dicuci dengan akuades. Selofan yang berisi enzim direndam dalam bufer Tris-hidroksimetil amino metan pH 8,6 dengan konsentrasi 100 kali lebih kecil dalam keadaan dingin dan tiap 2 jam bufer diganti serta diuji kandungan amonium sulfatnya dengan BaCl_2 sampai tidak terbentuk endapan putih.

3.3.5. Penentuan Aktivitas Enzim

Larutan substrat asparagin 0,5 mL ditambah 0,1 mL enzim dan 0,4 mL bufer Tris-hidroksimetil aminometan 0,2 M pH 8,6 diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan larutan TCA 1,5 M sebanyak 1 mL dan disentrifugasi pada kecepatan 3400 rpm selama 15 menit untuk memisahkan endapan.

Sebanyak 0,25 mL filtrat diambil lalu ditambahkan 4,25 mL akuades dan 0,5 mL pereaksi Nessler, kemudian absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang optimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Sebagai kontrol adalah 0,1 mL enzim yang telah dihilangkan aktivitasnya (dengan menambahkan 1 mL TCA 1,5 M) ditambah 0,4 mL bufer Tris-hidroksimetil aminometan 0,2 M pH 8,6 dan 0,5 mL asparagin. Aktivitas enzim ditentukan secara regresi linear terhadap kurva standar amonium sulfat.

3.3.6. Penentuan Kadar Protein Enzim

Larutan enzim sebanyak 0,3 mL ditambah 2 mL larutan Lowry C, diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,2 mL larutan Lowry D dengan cepat, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar sambil sesekali dikocok. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang optimum BSA dengan spektrofotometer UV-Vis. Kadar protein ditentukan secara regresi linear terhadap kurva standar BSA.

3.3.7. Karakterisasi Enzim

3.3.7.1. Penentuan Suhu Optimum Enzim

Asparaginase diuji aktivitasnya pada suhu yang bervariasi, yaitu: 29°C, 33°C, 37°C, 41°C, 45°C.

3.3.7.2. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Enzim

Asparaginase diuji aktivitasnya dengan variasi waktu inkubasi 10, 20, 30, 40, dan 50 menit.

