

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Variabel Penelitian

3.1.1 Variabel yang dikendalikan

1. Waktu agitasi
2. Suhu kalsinasi
3. Waktu kalsinasi
4. Suhu inkubasi
5. Tingkat fraksinasi
6. pH enzim
7. Konsentrasi HCl

3.1.2 Variabel yang diubah

Ukuran zeolit

3.1.3 Parameter yang dinilai

1. Luas permukaan zeolit hasil modifikasi
2. Keasaman zeolit hasil modifikasi
3. Kadar protein sebelum dan sesudah amobilisasi
4. Kadar glukosa



3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitis, ayakan, blender, sentrifuse, kantong selofan, pengaduk magnetik, seperangkat alat gelas, aluminium foil, pH meter, stopwatch, kompor listrik, furnace, oven, cawan porselin, spatula, kertas saring, refrigerator, inkubator, desikator, dan peralatan analisis (spektrofotometer UV-Vis dan BET).

3.2.2 Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan adalah zeolit alam asal Wonosari, HCl 37 %, HF 40 %, NH_4OH , ubi jalar, $(\text{NH})_4\text{SO}_4$, BaCl_2 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , NaOH , KNa-tartrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, folin, BSA, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, amilum, NaHCO_3 , Na_2SO_4 anhidrat, $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NH_4 -molibdat, $\text{H}_2\text{SO}_4\text{p}$, $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan H_2O .

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan beberapa tahap:

3.3.1 Modifikasi zeolit alam

1. Dealuminasi zeolit dengan HCl 6 N.

Zeolit alam Wonosari direndam dalam HF 1 %, kemudian dinetralkan dan dilanjutkan perendaman dengan HCl 6 N.

2. Proses kalsinasi.

Zeolit terdealuminasi dikalsinasi pada suhu 400 °C.

3.3.2 Karakterisasi hasil

1. Uji keasaman.

Zeolit hasil modifikasi diuji keasaman menggunakan gas NH_3 .

2. Analisis BET.

Zeolit hasil modifikasi dianalisis dengan BET untuk mengetahui luas permukaan.

3.3.3 Isolasi enzim α -amilase dari ubi jalar

1. Ekstraksi.

Enzim diekstraksi secara mekanik, dengan pemblenderan.

2. Fraksinasi.

Fraksinasi dilakukan pada tingkat kejenuhan 30-50%.

3. Dialisis.

Dialisis dilakukan dengan menggunakan kantong selofan sebagai membran semipermeabel.

3.3.4 Amobilisasi α -amilase pada zeolit hasil modifikasi

Zeolit hasil modifikasi direndam dalam larutan enzim dan diagitasi selama 24 jam.

3.3.5 Penentuan aktivitas α -amilase yang teramobilisasi

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan penentuan kadar glukosa dalam enzim amobil menggunakan metode Nelson–Somougyi.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Persiapan/Preparasi

1. Persiapan sampel zeolit alam asal Wonosari, DI Yogyakarta.
Zeolit kering ditumbuk dan diayak dengan ayakan mesh ukuran 30, 60, 90 mesh, kemudian dicuci dengan akuades dan dikeringkan.
2. Pembuatan larutan HF 1 % dari HF 40 %.
3. Pembuatan larutan HCl dengan konsentrasi 6 N dari HCl 37 %.
4. Pembuatan buffer fosfat 0,2 M, pH 6,1.
 - a. Larutan A: 0,2 M larutan Na–fosfat monobasis (7,8 g dalam 1000 mL).
 - b. Larutan B: 0,2 M larutan Na–fosfat dibasis (52,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ atau 71,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dalam 1000 mL).
5. Pembuatan Reagen Lowry
 - a. Lowry A: 2 g Na_2CO_3 + 0,4 g NaOH + 0,02 g KNa–tartrat dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL.
 - b. Lowry B: 0,015 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam akuades hingga 25mL.
 - c. Lowry C: 50 bagian Lowry A + 1 bagian Lowry B.
 - d. Lowry D: 1 bagian larutan folin + 1 bagian akuades (baru).

6. Pembuatan larutan standar BSA dengan variasi konsentrasi 0,06; 0,12; 0,18; 0,24 ; dan 0,3 mg/mL.
7. Pembuatan larutan amilum 1 %
Satu gram amilum dilarutkan dalam akuades 100 mL.
8. Pembuatan larutan glukosa dengan variasi konsentrasi 0,2; 0,6; 1,0; 1,4 dan 1,8 mg/100 mL.
9. Pembuatan reagen Nelson–Somougyi
 - a. Reagen Nelson A : 1,2 g KNa–tartrat + 1,6 g Na-bikarbonat + 14,4 g Na-sulfat anhidrat + 2,4 g Na-karbonat anhidrat dilarutkan dengan akuades sampai 80 mL disertai pemanasan.
 - b. Reagen Nelson B : 2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + Na_2SO_4 anhidrat dilarutkan dengan akuades sampai 100 mL.
 - c. Reagen Nelson–Somougyi: 1 bagian A + 1 bagian B.
10. Pembuatan reagen arsenomolibdat
 - a. Lima gram amonium molibdat dilarutkan dengan akuades sampai 80 mL selanjutnya ditambah 4,2 mL H_2SO_4 p sambil diaduk (I).
 - b. Nol koma enam gram Na-arsenat dilarutkan dengan 5 mL akuades (II).
 - c. Larutan II dituang ke larutan I dan disimpan dalam botol berwarna pada suhu 37°C selama 48 jam.
11. Pembuatan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,01 M
Sebanyak 0,3153 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan akuades sampai 100 mL.

12. Pembuatan larutan ZnSO_4 0,01 M

Sebanyak 0,2871 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan akuades sampai 100mL.

3.4.2 Tahap modifikasi

1. Sebanyak zeolit 400 gram masing-masing ukuran 30, 60, dan 90 mesh dimasukkan ke dalam gelas beaker kemudian ditambahkan 800 mL larutan HF 1 %.
2. Campuran direndam selama 10 menit.
3. Sampel disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan akuades hingga pH filtrat mendekati netral.
4. Zeolit dikeringkan dalam oven pada suhu $120\text{ }^\circ\text{C}$ selama 4 jam.
5. Zeolit dimasukkan gelas beaker, kemudian direndam dengan larutan HCl 6 N selama 4 jam dengan pengadukan setiap $\frac{1}{2}$ jam.
6. Ulangi perlakuan 3 dan 4.
7. Zeolit dikalsinasi pada suhu $400\text{ }^\circ\text{C}$ selama 4 jam.

3.4.3 Karakterisasi hasil

1. Uji keasaman.

Zeolit hasil modifikasi diuji keasaman menggunakan gas NH_3 . Krus porselin ditimbang dan dinyatakan dengan W_0 . Sebanyak 1 g sampel zeolit dimasukan dalam krus porselin, kemudian dipanaskan pada suhu $120\text{ }^\circ\text{C}$ selama 2 jam dan didinginkan dalam desikator. Sebelum dimasukkan dalam

desikator sampel dan krus porselin ditimbang sebagai W_1 , setelah itu dialiri gas NH_3 yang berasal dari NH_4OH yang dipanaskan. Pengaliran gas dilakukan sampai terlihat adanya uap di desikator kemudian dibiarkan selama 24 jam. Sampel diangin-angin selama 15 menit, kemudian dilakukan penimbangan dan diperoleh berat W_2 .

2. Analisis BET.

Zeolit hasil modifikasi dikarakterisasi menggunakan BET yang bertujuan untuk menentukan luas permukaan dari data adsorpsi. Pengukuran luas permukaan dapat dilakukan dengan mengaplikasikan adsorpsi gas secara adsorpsi fisik, dimana kecepatan adsorpsi sama dengan kecepatan desorpsi.

3.4.4 Isolasi enzim α -amilase

A. Ekstraksi

1. Sebanyak 500 gram ubi jalar yang sudah dibersihkan, dipotong kecil-kecil dan dihomogenisasi dengan 250 mL akuades dalam blender selama 15 menit.
2. Campuran dibiarkan selama 1-2 jam pada suhu 4 °C.
3. Homogenat disaring dengan kain dan filtrat disentrifugasi pada 3400 rpm selama 1,87 menit (filtrat yang diperoleh merupakan enzim kasar).

B. Fraksinasi dengan garam ammonium sulfat

1. Ammonium sulfat ditimbang sesuai yang dibutuhkan (Lampiran B) kemudian dimasukkan ke dalam filtrat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnetik.
2. Kejenuhan fraksinasi dilakukan pada 30–50 %.
3. Campuran dibiarkan dalam keadaan dingin selama 1 malam lalu disentrifugasi sehingga diperoleh endapan dan filtrat.
4. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam buffer fosfat 0,2 M pada pH 6,1.

C. Proses Dialisis

1. Kantong selofan direbus dalam akuades selama 60 menit.
2. Larutan enzim dalam kantong selofan yang telah diikat dengan benang dimasukkan dalam buffer fosfat 0,002 M.
3. Buffer diaduk dengan pengaduk magnetik dan diganti tiap 2 jam sekali.
4. Buffer yang diganti diuji kandungan ammonium sulfatnya dengan penambahan BaCl_2 sampai tidak terbentuk endapan lagi.

3.4.5 Amobilisasi α -amilase pada zeolit hasil modifikasi.

3.4.5.1 Tahap amobilisasi

1. Sebanyak 4 g zeolit hasil modifikasi dengan ukuran masing–masing 30, 60, dan 90 mesh dimasukkan ke dalam gelas beaker, kemudian ditambahkan 6 mL larutan enzim α -amilase.
2. Campuran diagitasi pada suhu 4 °C selama 24 jam.

3. Sampel disaring dengan kertas saring sampai diperoleh filtrat dan endapan (zeolit).
4. Endapan dicuci dengan buffer fosfat 0,2 M.
5. Filtrat yang diperoleh ditentukan kadar protein menggunakan metode Lowry.

3.4.5.2 Penentuan kadar protein

1. Sebanyak 0,1 mL filtrat ditambahkan 3 mL reagen Lowry C.
2. Sampel diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit.
3. Sampel ditambahkan 0,3 mL reagen Lowry D kemudian ditentukan absorbansi pada panjang gelombang maksimum (Lampiran C, Tabel 1).
4. Sebagai larutan standar digunakan larutan BSA dengan berbagai konsentrasi (0,06; 0,12; 0,18; 0,24; dan 0,30 mg/mL).

3.4.6 Penentuan aktivitas α -amilase yang teramobilisasi

3.4.6.1 Persiapan sampel

1. Sebanyak 1g zeolit (endapan) 1g ditambah larutan amilum 1 % dan 4 mL buffer fosfat 0,2 M.
2. Campuran diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit.
3. Sampel disaring dengan kertas saring sampai diperoleh filtrat dan endapan.
4. Filtrat ditentukan kadar glukosa menggunakan metode Nelson–Somougyi.
5. Ulangi perlakuan 1 sampai 4 sebanyak 3 kali.

3.4.6.2 Penentuan kadar glukosa

1. Sebanyak 0,1 mL filtrat ditambahkan 0,2 mL larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,01 M, selanjutnya ditambahkan 0,2 mL larutan ZnSO_4 0,01 M.
2. Campuran digojog kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit.
3. Sampel didinginkan kemudian ditambahkan 1mL reagen Nelson–Somougyi sampai terbentuk endapan merah bata.
4. Endapan dilarutkan dengan reagen arsenomolibdat kemudian ditentukan absorbansi pada panjang gelombang maksimum (Lampiran C, Tabel 4).
5. Sebagai larutan standar digunakan larutan glukosa dengan berbagai konsentrasi (0,2; 0,6; 1,0; 1,4; dan 1,8 mg/100 mL).

