

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Modifikasi ukuran pori dapat dilakukan melalui destruksi dengan NaOH, dilanjutkan proses hidrotermal dengan penambahan molekul pengarah dan proses kalsinasi. Zeolit hasil modifikasi dianalisis dengan difraksi sinar-x (XRD), spektroskopi Inframerah (FTIR) dan adsorpsi gas N₂ untuk menentukan kristalinitas, tipe struktur dan ukuran pori. Zeolit hasil modifikasi selanjutnya digunakan untuk mengamobilisasi enzim dengan banyaknya enzim yang teradsorpsi pada pori zeolit ditentukan dengan mengukur kadar protein sebelum dan sesudah amobilisasi menggunakan metode Lowry. Uji aktivitas enzim yang teramobilisasi ditentukan dengan mengukur kadar glukosa hasil hidrolisis amilum dengan metode Nelson-Somougyi

3.1 Variabel Penelitian

3.1.1 Variabel yang dikonstankan

- a. Waktu agitasi
- b. Suhu hidrotermal
- c. Waktu hidrotermal
- d. Temperatur kalsinasi
- e. Waktu kalsinasi

3.1.2 Variabel yang diubah

Konsentrasi molekul pengarah CTMABr

3.1.3 Variabel yang dinilai

- a. Ukuran pori zeolit hasil modifikasi
- b. Kadar protein sebelum dan sesudah amobilisasi
- c. Kadar glukosa hasil hidrolisis amilum

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat yang digunakan

Alat yang digunakan adalah timbangan analitis, ayakan, *blender*, *sentrifuge*, pengaduk magnetik, seperangkat alat gelas, alumunium foil, oven, cawan porselin, cawan nikel, spatula, kertas saring, botol semprot, buret, statif, klem, pH meter, autoklaf, *furnace* dan peralatan analisis (spektrofotometer UV-Vis, XRD, FTIR dan Quantachrome Corporation NOVA Data analysis Package Ver.2.00).

3.2.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah zeolit asal Wonosari, akuades, HF 37 %, NaOH padatan, Na-silikat, H₂SO₄ 1:1, TBASCN, CTMABr, enzim α -amilase, folin, bovin serum albumin (BSA), glukosa, amilum, NaHCO₃, Na₂SO₄ anhidrat, Ba(OH)₂ · 8H₂O, ZnSO₄ · 7H₂O, ammonium molibdat, Na-arsenat.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Persiapan/Preparasi

- a. Persiapan sampel zeolit alam asal wonosari, DI Yogyakarta.
Zeolit kering ditumbuk dan diayak dengan ayakan ukuran 200 mesh, kemudian dicuci dengan akuades dan dikeringkan
- b. Pembuatan larutan HF 1% dari 40%.
10 mL HF 40% diencerkan menjadi 40 mL HF 1 %.
- c. Pembuatan larutan TBASCN 0,2 M.
3,0055 gram TBASCN dilarutkan dalam akuades hingga volume 50 mL.
- d. Pembuatan larutan CTMABr 0.3 M.
28,42 gram CTMABr dilarutkan dalam akuades hingga volume 250 mL.
- e. Pembuatan larutan Na-silikat 1:1.
10 mL Na-silikat dilarutkan dalam akuades hingga 10 mL.
- f. Pembuatan reagen Lowry
 1. Lowry A: 2 g Na_2CO_3 + 0,4 g NaOH + 0,02 g KNa-tartrat dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL.
 2. Lowry B: 0,015 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam akuades hingga 25 mL.
 3. Lowry C: 50 bagian Lowry A + 1 bagian Lory B.
 4. Lowry D: 1 bagian larutan folin + 1 bagian akuades (baru).
- g. Pembuatan larutan standar BSA dengan variasi konsentrasi 0,06; 0,12; 0,18; 0,24 dan 0,3 mg/mL.

h. Pembuatan amilum 1%

1 g amilum dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL.

i. Pembuatan larutan glukosa dengan variasi konsentrasi 0,2; 0,6; 1,0; 1,4; dan 1,8 mg/100 mL.

j. Pembuatan reagen Nelson-Soumogyi

1. 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 dalam akuades hingga 80 mL disertai pemanasan.

2. Reagen Nelson B: 2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + Na_2SO_4 anhidrat dilarutkan dalam akuades hingga 100mL.

3. Reagen Nelson-Soumogyi: 1 bagian A + 1 bagian B.

k. Pembuatan reagen Arsenomolibdat

1. Amonium molibdat sebanyak 5 g dilarutkan dalam akuades hingga 80 mL selanjutnya ditambah 4,2 mL H_2SO_4 sambil di aduk (I).

2. Na-arsenat 0.6 g dilarutkan dalam akuades hingga 5 mL(II)

3. Larutan II dituang ke larutan I dan disimpan dalam botol berwarna pada 37°C selama 48 jam.

l. Pembuatan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,01 M

0,3153 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL.

m. Pembuatan larutan ZnSO_4 0,01 M

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

3.3.2 Tahap Modifikasi

- a. Sebanyak 500 g zeolit ukuran 200 mesh direndam dengan HF 1% selama 10 menit
- b. Sampel disaring dan dicuci dengan akuades hingga pH filtrat mendekati netral.
- c. Zeolit dikeringkan dalam oven pada suhu 120 °C selama 4 jam.
- d. 10 g zeolit kering ditambah 20 g NaOH yang sudah halus, diaduk sampai rata kemudian dipanaskan pada suhu 500 °C selama 1 jam.
- e. Sampel didinginkan dan dilarutkan ke dalam 25 mL akuades.
- f. Larutan sampel disentrifus dan supernatan dipisahkan.
- g. Supernatan + 5 mL Na-silikat 1:1 + Surfaktan ((5 mL TBASCN 0,2 M + 5 mL CTMABr 0,3 M) selanjutnya disebut Z-CB1, (5 mL TBASCN 0,2 M + 10 mL CTMABr 0,3 M) selanjutnya disebut Z-CB2 dan (5 mL TBASCN 0,2 M + 20 mL CTMABr 0,3 M) selanjutnya disebut Z-CB3).
- h. Sampel diberi perlakuan hidrotermal pada suhu 120 °C selama 24 jam
- i. Sampel hasil perlakuan hidrotermal dikeringkan dalam oven pada suhu 120 °C selama 4 jam.
- j. Sampel kering dikalsinasi pada suhu 550 °C selama 1 jam menggunakan aliran gas N₂ dan 3 jam menggunakan aliran gas O₂.

3.3.3 Karakterisasi Hasil

- a. *Analisis XRD*. Zeolit hasil modifikasi dikarakterisasi menggunakan XRD yang bertujuan untuk mengetahui kekristalan zeolit hasil modifikasi.
- b. *Analisis IR*. Zeolit hasil modifikasi dikarakterisasi menggunakan IR untuk mengetahui tipe struktur dari zeolit hasil modifikasi. Pengukuran dilakukan dengan berdasarkan vibrasi molekul.
- c. *Analisis BET*. Zeolit hasil modifikasi dikarakterisasi menggunakan persamaan BET yang bertujuan untuk menentukan luas permukaan dari data adsorpsi. Pengukuran pori dapat dilakukan dengan mengaplikasikan adsorpsi gas secara fisisorpsi, dengan kecepatan adsorpsi sama dengan kecepatan desorpsi.

3.3.4 Amobilisasi α -amilase pada Zeolit Hasil Modifikasi

A. Tahap Amobilisasi

1. Sebanyak 2 g zeolit hasil modifikasi dimasukkan dalam gelas beker, kemudian ditambah 3 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. Filtrat yang diperoleh ditentukan kadar proteinnya menggunakan metode Lowry.

B. 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 maksimumnya.
4. Sebagai larutan standar digunakan larutan BSA dengan berbagai konsentrasi (0,06; 0,12; 0,18; 0,24; dan 0,3 mg/mL).

3.3.5 Penentuan Aktivitas Enzim α -amilase yang Teramobilisasi

A. Persiapan Sampel

1. Zeolit endapan yang sudah dicuci dengan buffer fosfat 0,2 M, sebanyak 1 g ditambah larutan amilum 1 % selanjutnya ditambah 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-Soumogyi.

B. Penentuan Kadar Glukosa

1. Sebanyak 0,1 mL filtrat ditambah dengan 0,2 mL larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,01 M, selanjutnya ditambah dengan 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 ditambah 1 mL reagen Nelson-Soumogyi sampai terbentuk endapan merah bata.
4. Endapan dilarutkan dengan arsenomolibdat kemudian ditentukan absorbansi pada panjang gelombang maksimumnya.
5. Sebagai larutan standar digunakan larutan glukosa dengan berbagai konsentrasi (0,2; 0,6; 1,0; 1,4 dan 1,8 mg/100 mL).

