

BAB III

METODOLOGI

Dalam penelitian ini meliputi tiga metode kerja yaitu isolasi untuk memperoleh enzim bromelin dari kulit, buah dan bonggol nanas, kemudian metode kerja yang kedua karakterisasi untuk mengetahui sifat atau karakter enzim bromelin dari segi waktu inkubasi, suhu dan pH. Metode kerja yang ketiga amobilisasi enzim yaitu untuk menjerat enzim agar bisa dipakai beberapa kali.

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat yang digunakan

1. Blender (Maspion 1000 mL)
2. Sentrifuge (Centrif-228 3400 rpm)
3. pH meter (Orion-420 A)
4. Timbangan elektrik (Mettler AT200)
5. Thermometer
6. Pengaduk magnet
7. Refrigerator
8. Kantong selofan
9. Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1201)
10. Inkubator (Memmert)
11. Alat-alat gelas untuk analisis

3.1.2. Bahan-bahan yang digunakan

1. Kulit, bonggol dan buah nanas
2. Kasein **p.a**
3. Trikloroasetat **p.a**
4. Tirosin **p.a**
5. Natrium klorida **p.a**
6. Karrageenan
7. Buffer fosfat **p.a**
8. Ammonium sulfat **p.a**
9. Folin ciocalteu **p.a**
10. Natrium kalium tartrat **p.a**
11. Kupri sulfat pentahidrat **p.a**
12. Natrium karbonat **p.a**
13. Aquades
14. Kalium klorida **p.a**

3.2. Variabel Penelitian

3.2.1. Variabel yang diukur

1. Aktivitas enzim bromelin
2. Aktifitas spesifik enzim bromelin
3. Stabilitas enzim amobil

3.2.2. Variabel bebas

1. Derajat keasaman (pH)
2. Suhu
3. Waktu inkubasi

3.2.3. Variabel tetap

1. Konsentrasi substrat
2. Volume enzim
3. Volume substrat

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Preparasi Larutan

a. Pembuatan trikloroasetat 1 M

Sebanyak 16,339 g trikloroasetat dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL

b. Pembuatan substrat kasein

Sebanyak 0,2 g kasein dilarutkan dalam 20 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7.

Kemudian dipanaskan \pm 15 menit pada penangas air lalu didinginkan.

c. Pembuatan standar kasein

Sebanyak 30 mg kasein dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 100 mL. Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (0,06 ; 0,12 ; 0,18 ; 0,24 ; 0,3 mg/mL)

d. Pembuatan standar tirosin

Sebanyak 20 mg tirosin dilarutkan dalam akuades hingga volume 100 mL. Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (3,0; 5,0; 10; 15; 20 mg/100mL)

e. Pembuatan NaCl 25 %

Sebanyak 12,5 g NaCl dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 50 mL.

f. Pembuatan buffer fosfat pH 7,5

Larutan A: Pembuatan larutan kalium fosfat monobasis 0,2 M

Sebanyak 2,74 g KH_2PO_4 dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL

Larutan B: Pembuatan larutan kalium fosfat dibasis 0,2 M

Sebanyak 0,4 g $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ dilarutkan dalam akuades hingga volumenya menjadi 100 mL.

(16 mL larutan A + 84 mL larutan B) lalu diencerkan sehingga volume 200 mL dan diperoleh larutan buffer fosfat pH 7,5 yang dikontrol dengan pH meter.

g. Pembuatan reagen Lowry

- Reagen Lowry A

Sebanyak 2 g Na_2CO_3 ditambah 0,4 g NaOH dan 0,02 g Natrium kalium tartrat kemudian dilarutkan dalam akuades sampai volumenya 100 mL.

- Reagen Lowry B

Sebanyak 0,15 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dilarutkan dalam akuades sampai volumenya 25 mL.

- Reagen Lowry C

50 mL Lowry A ditambah 1 mL Lowry B

- Reagen Lowry D

Folin Ciocalteu 1 bagian ditambah akuades 1 bagian.

3.3.2. Penentuan λ_{max} kasein

Kasein 0,3 mg/mL dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis Simadzu.

3.3.3. Penentuan λ_{max} tirosin

Tirosin 3 mg/mL dibaca serapannya pada berbagai panjang gelombang dengan alat spektrofotometer UV-Vis Simadzu.

3.3.4. Pembuatan kurva standar kasein

Kasein dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada λ 760 nm dengan alat spektrofotometer UV-Vis Simadzu.

3.3.5. Pembuatan kurva standar tirosin

Tirosin dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada λ 290 nm dengan alat spektrofotometer UV-Vis Simadzu.

3.3.6. Isolasi enzim bromelin dari kulit, bonggol dan buah nanas^[4]

Masing-masing kulit, bonggol dan buah nanas dibersihkan dari kotoran kemudian dipotong kecil-kecil, kemudian diblender \pm 10 menit. Selama proses blender berlangsung ditambahkan buffer fosfat pH 7,5 dingin sedikit demi sedikit sebanyak 1:1. Larutan enzim kasar dipisahkan dengan sentrifugasi pada 3000 g selama \pm 15 menit suhu 15 °C sehingga diperoleh ekstrak bromelin kasar.

Enzim kasar yang diperoleh difraksinasi dengan ammonium sulfat dengan kejenuhan F_1 (0 – 10 %) ; F_2 (10 – 30 %) ; F_3 (30 – 50 %) dan F_4 (50 – 70 %). Suspensi hasil fraksinasi dibiarkan pada suhu 4 °C selama 1 – 2 jam. Homogenat dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 3000 g selama 15 menit suhu 15 °C dan supernatan dipisahkan. Endapan segera ditambah buffer fosfat pH 6 sehingga diperoleh suspensi enzim.

Langkah selanjutnya suspensi enzim dimasukkan dalam kantong selofan dan dilakukan dialisa dalam almari pendingin suhu 4 °C. Dialisis dilakukan selama 24 jam. Pada 4 jam pertama, setiap 1 jam dilakukan penggantian buffer fosfat pH 6 (diencerkan 1000 kali) yang berada di luar selofan. Untuk mengetahui garam ammonium sulfat telah keluar dari selofan maka dapat diuji dengan

penambahan BaCl_2 pada buffer fosfat. Enzim hasil dialisis disimpan dalam almari pendingin.

3.3.7. Uji aktivitas enzim bromelin^[4]

Sebanyak 2,5 mL substrat ditambah 0,5 mL larutan enzim yang telah diencerkan 10 kali. Diinkubasi pada suhu $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 10$ menit, larutan TCA 1 M ditambahkan sebanyak 3 mL. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 40$ menit, lalu disentrifugasi 3000 rpm ± 20 menit. Setelah disentrifugasi supernatan dibaca serapannya pada λ 290 nm dengan spektrofotometer UV-Vis simadzu.

3.3.8. Penentuan kadar protein

Sebanyak 0,3 mL larutan enzim yang telah diencerkan ditambah 1,5 mL reagen lowry C dikocok-kocok lalu dibiarkan ± 20 menit. Reagen Lowry D 0,15 mL ditambahkan dengan cepat dan didiamkan ± 45 menit pada suhu kamar dengan sesekali digojog. Serapannya dibaca pada λ 760 nm dengan spektrofotometer UV-Vis simadzu.

3.3.9. Penentuan waktu inkubasi optimum enzim bromelin bebas

Enzim bromelin diuji aktivitasnya pada suhu $37\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7 dan waktu inkubasi yang bervariasi (5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 menit).

3.3.10. Penentuan suhu optimum enzim bromelin bebas

Enzim bromelin diuji aktivitasnya pada waktu inkubasi optimum, pH 7 dan suhu yang bervariasi (33 ; 35 ; 37 ; 41 ; 43 $^\circ\text{C}$)

3.3.11. Penentuan pH optimum enzim bromelin bebas

Enzim bromelin diuji aktivitasnya pada waktu inkubasi optimum, suhu optimum dan pH yang bervariasi (6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 ; 8,0).

3.3.12. Amobilisasi enzim bromelin bonggol nanas^[22]

Karrageenan 500 mg dilarutkan pada 15 mL NaCl 25 % dipanaskan pada suhu 70 °C kemudian didinginkan menjadi 40 °C. Enzim bromelin bonggol nanas (telah diencerkan 10 kali) sebanyak 0,5 mL ditambah dengan 10 mL NaCl 25 % kemudian dipanaskan pada suhu 40 °C.

Setelah keduanya mencapai suhu 40 °C dicampurkan sambil diaduk hingga homogen. Setelah rata didinginkan pada suhu kamar. Dicuci dengan larutan NaCl 25 %, dipotong-potong dengan ukuran (3 x 3 x 3) mm.

3.3.13. Uji aktivitas enzim bromelin bonggol nanas amobil

Sebanyak 2,5 mL substrat ditambah 0,5 mL larutan enzim amobil yang telah diencerkan 10 kali. Diinkubasi pada suhu 35 °C ± 5 menit. Supernatan dipisahkan dari enzim amobil.

Sebanyak 3 mL Larutan TCA 1 M ditambahkan ke dalam supernatan. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C ± 40 menit. Disentrifugasi 3000 rpm ± 20 menit. Setelah disentrifugasi supernatan dibaca serapannya pada λ 290 nm dengan spektrofotometer UV-Vis simadzu.

3.3.14. Penentuan waktu inkubasi optimum enzim bromelin bonggol nanas amobil

Enzim bromelin diuji aktivitasnya pada suhu 35 °C, pH 6 dan waktu inkubasi yang bervariasi (5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 menit).

3.3.15. Penentuan suhu optimum enzim bromelin bonggol amobil

Enzim bromelin diuji aktivitasnya pada waktu inkubasi optimum, pH 6 dan suhu yang bervariasi (33 ; 35 ; 37 ; 41 ; 43 °C)

3.3.16. Penentuan pH optimum enzim bromelin bonggol amobil

Enzim bromelin diuji aktivitasnya pada waktu inkubasi optimum, suhu 33 °C dan pH yang bervariasi (6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 ; 8,0).

3.3.17. Penentuan stabilitas enzim bromelin bonggol nanas amobil

Enzim bromelin bonggol diuji aktivitasnya untuk beberapa kali pemakaian. Setelah itu dibandingkan dengan aktivitas spesifik pertama kali enzim dipakai.

