

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah Faktorial Eksprimen yaitu suatu penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim alfa-amilase dalam hidrolisis karbohidrat.

B. Tempat Dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Dilaksanakan di Laboratorium Kimia Klinik program studi Teknologi Laboratorium medis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2025 dan waktu pengambilan dan pengukuran sampel pada bulan Februari sampai Maret 2025.

C. Variabel Penelitian

Variabel yang ada dalam Penelitian ini yaitu :

1. variabel bebas : untuk mengukur pengaruh suhu dan pH
2. variabel terikat: aktivitas enzim α -amilase dalam proses hidrolisis karbohidrat
3. variabel kontrol : konsentrasi enzim α -amilase

D. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Alfa-amilase sebagai enzim dan amilum 2% sebagai substrat.

Rancangan percobaan akan ditentukan dengan langkah – langkah berikut:

1. Faktor 1: pH: Terdapat 3 tingkat perlakuan

Amilosa Control

pH 2 (asam)

pH 7 (netral)

pH 10 (basa)

2. Faktor 2: Suhu: Terdapat 5 tingkat perlakuan

Amilosa (control)

10°C

25°C

37°C

80°C

Jumlah Perlakuan dihitung dengan menggunakan rumus

$$N(h \times n) + 1$$

Keterangan :

h: kelompok

n: jumlah perlakuan

kelompok (h) yaitu suhu dan ph yang berarti ada 2 dan jumlah perlakuan (n)

ada suhu ada 4 : 10°C; 25°C; 37°C dan 80°C di luar kontrol. pH ada 3 : 2 ; 7

dan 10 di luar kontrol lalu di jumlah kan $3+4 = 6$

$$N(3 \times 6) + 1$$

$$= 18 + 1$$

$$= 19$$

Jadi ada 19 perlakuan

E. Teknik sampel

Cara atau teknik sampling yang digunakan pada penelitian ini adalah *Random*

Sampling berdasarkan variasi suhu dan pH larutan terhadap enzim

F. Definisi operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional

No	Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Variasi	Skala
1	Suhu	Tingkat panas atau dinginya suatu sistem	Menggunakan 3 hermometer, mengatur dan mengukur suhu	Termometer dan waterbath	Suhu control Amilosa Suhu perlakuan 25°C, 37°C, 80°C dan 10°C	Interval
2	pH	Derajat keasaman atau kebebasan suatu larutan	Menggunakan pH meter atau kertas pH	Kertas pH	pH control Amilosa pH perlakuan 2;7 dan 10	Interval
3	Aktivitas enzim alfa-amilase	Kecepatan enzim mengkatalisis reaksi hidrolisis pati	Pengamatan perubahan warna Larutan Iodin dan Benedict	Larutan iodin dan benedict	Benedict : kuning-merah bata (positif) Iodin : biru-jernih (positif)	Ordinal

G. Prosedur Penelitian

1. Tahap persiapan

- a. Membuat kode etik.
- b. Mengajukan permohonan ijin penelitian, untuk melakukan penelitian.
- c. Mempersiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.

2. Tahap pelaksanaan

a. Pra Analitik

Persiapan alat dan bahan

1) Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

- a) Temperatur
- b) Hot Plate
- c) Spritus
- d) Tabung reaksi
- e) Kertas lakmus
- f) Rak tabung
- g) Pipet tetes
- h) Stopwacth
- i) Erlenmeyer

2) Bahan

- a) Enzim Alfa-amilase 0,09g
- b) Amilum sedian murni 2%
- c) Amilosa 1% (control)
- d) Larutan yang pH HCl (pH 2), aquades (pH 7), Na_2CO_3 (pH 10)
- e) Reagen Iodin
- f) Reagen Benedict

b. Analitik

1. Pembuatan larutan Amilum sediaan murni 2%

- a. Ditimbang 1 gram amilum menggunakan neraca analitik.
- b. Dimasukkan amilum ke dalam erlenmeyer 100 mL
- c. Ditambahkan 10 mL aquades ke dalam erlenmeyer lalu aduk hingga amilum terdispersi dengan baik dan tidak mengumpal.
- d. Ditambahkan 40 mL aquades lalu dipanas diatas lampu spritus sambil terus diaduk menggunakan batang pengaduk, hingga larutan menjadi jernih dan homogen. Pastikan pemanasan tidak yang berlebihan atau tidak sampai mendidih

e. Setelah larutan jernih dan homogen, dinginkan hingga suhu ruangan.

2. Pembuatan Larutan Benedict

a. Larutan A

Na.sitrat 86,5 g; Na_2CO_3 50 g; Auadest 400 ml

Larutan Na.sitrat dan Na_2CO_3 dalam air (dibantu dengan pemanasan), Hasilnya disaring dengan kertas saring dan diencerkan dengan aquades hingga volume menjadi 425 ml.

b. Larutan B

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8,65 g; Auades 50 ml

Larutkan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam aquades hingga larutan dengan sempurna. Tuangkan larutan A sambil diaduk pelan-pelan, tambahkan auades hingga volume menjadi 500 ml

3. Pembuatan Larutan Iodin 0,01N

Larutkan 2 g kalium iodide dalam 30 ml aquades. Sebanyak 1,27 g iodium ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Setelah semua kristal iodium larut, dilakukan pengenceran hingga volume menjadi 1.000 ml. Larutan iodium berwarna orange pekat, bersifat muda rusak dan cepat menguap sehingga harus di simpan dalam botol gelap serta tertutup rapat.

4. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

- a. Disediakan 3 tabung reaksi bersih, kemudian isi lah masing masing tabung 2 ml larutan dengan pH 2 (asam), 10 (basah) dan 7 (netral) sebagai control
- b. Dalam setiap tabung ditambahkan 2 mL larutan amilum 2% dan 0,09 g serbuk alfa-amilase

- c. Dicampur hingga homogen, kemudian biarkan selama 15 menit
 - d. Selanjutnya, uji dengan pereaksi iodium dan pereaksi benedict.
 - e. Diamati dan catat perubahan warna yang terjadi
5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim
- a. Disiapkan 4 tabung reaksi yang bersih dan kering, masing-masing isilah dengan 2 mL larutan amilum 2%
 - b. Ditambahkan 0,09 g enzim amilase pada setiap tabung
 - c. Dimasukkan tabung ke dalam waterbath dengan suhu 25°C, 50°C, 65°C dan ditempatkan pada wadah berisi ice pack untuk perlakuan suhu 10°C
 - d. Dibiarkan masing-masing tabung pada tempatnya selama 3-5 menit
 - e. Selanjutnya diuji dengan pereaksi iodium dan benedict
 - f. Dicatat dan amati perubahan warna yang terjadi
 - g. Dilakukan pengamatan dalam waktu yang sama dan sesuai dengan kondisi percobaan pada tiap tabung. Jangan menambahkan enzim secara serentak pada kelima tabung agar memudahkan sewaktu
 - h. Pengujiannya

4. Pengujian

a. Uji Iodium:

- 1) Dimasukan 3 tetes sampel pada setiap tabung dan ditambahkan 2 tetes pereaksi iodium.

- 2) Diamati perubahan warna yang terjadi . Warna biru tua menunjukkan adanya pati, sedangkan warna kuning pucat atau tidak berwarna tidak menunjukkan adanya pati

Tabel 3.2 Interpretasi hasil Iodin

Warna	Hasil
Biru - hitam	Positif
Kuning	Negatif
Coklat	Negatif
Bening	Negatif

- b. Uji Benedict:
- a. Dimasukan 5 tetes sampel pada setiap tabung dan ditambahkan 15 tetes pereaksi Benedict, lalu dihomogenkan.
 - b. Dimasukan larutan yang sudah dicampurkan ke dalam waterbath atau api bunsen jangan sampai mendidih selama 5 menit
 - c. Diamati perubahan warna atau endapan merah bata menunjukkan adanya gula reduksi (produk hidrolisis pati).

Tabel 3.3 Interpretasi hasil Benedik

Warna	Penilaian	Konsentrasi
Biru	–	–
Hijau	1	Kurang dari 0,5%
Kuning	2	0,5-1,0%

Oranye	3	1,0-2,0%
Merah bata	4	Lebih dari 2%

H. Analisis hasil

Penelitian ini hanya melakukan pengukuran kualitatif aktivitas enzim α -amilase berdasarkan perubahan warna pada uji iodium dan Benedict, tanpa pengukuran kuantitatif aktivitas enzim. Kesimpulannya didasarkan pada interpretasi perubahan warna tersebut, bukan pada data numerik yang lebih akurat.