

PETUNJUK PRAKTIKUM

BIOKIMIA



UBAYA
UNIVERSITAS SURABAYA

**LABORATORIUM PURIFIKASI DAN BIOLOGI
MOLEKULER
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI**

UNIVERSITAS SURABAYA
TAHUN 2024

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan atas tersusunnya Petunjuk Praktikum Biokimia ini yang dapat digunakan oleh mahasiswa sebagai landasan untuk persiapan dan pelaksanaan praktikum biokimia di lingkungan Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya.

Petunjuk Praktikum ini berisi informasi terkait tata cara, persiapan, pelaksanaan dan pelaporan hasil praktikum biokimia yang dilakukan oleh mahasiswa peserta praktikum.

Petunjuk praktikum ini disusun dan ditulis oleh dosen yang menangani praktikum biokimia dengan mengikuti kaidah ilmiah

Dengan membaca petunjuk praktikum ini sebelum pelaksanaan praktikum, diharapkan mahasiswa peserta praktikum dapat memahami dengan baik tata cara, persiapan, pelaksanaan, dan pelaporan hasil praktikum, sehingga praktikum untuk setiap modul dapat berlangsung dengan baik dan dilaporkan dengan baik. Praktikan mendapatkan manfaat yang maksimal atas pemahaman dan implementasi tiap-tiap modul yang disediakan.

Akhir kata, petunjuk praktikum ini akan selalu diperbaiki dari waktu ke waktu manakala diidentifikasi terdapat peluang pelaksanaan yang lebih baik dengan hasil yang lebih baik pula.

Selamat mempersiapkan dan menjalankan praktikum biokimia dengan baik.

Surabaya, 3 Februari 2024

Penyusun,

Prof. Tjie Kok, Ph.D.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	2
TATA CARA PELAKSANAAN PRAKTIKUM BIOKIMIA.....	3
MODUL I : UJI MINYAK ATAU LEMAK I.....	5
MODUL II : UJI MINYAK ATAU LEMAK II	8
MODUL III : UJI KUALITATIF KARBOHIDRAT	11
MODUL IV : UJI KUANTITATIF KARBOHIDRAT I.....	14
MODUL V : UJI KUANTITATIF KARBOHIDRAT II	17
MODUL VI : BUFFER (LARUTAN PENYANGGA)	20
MODUL VII : ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM	23
MODUL VIII : AKTIVITAS ENZIM I.....	26
MODUL IX : AKTIVITAS ENZIM II.....	30
MODUL X : UJI KUALITATIF PROTEIN.....	34
MODUL XI : UJI KUANTITATIF PROTEIN.....	37

TATA CARA PELAKSANAAN PRAKTIKUM BIOKIMIA

1. Keterlambatan datang dan menyelesaikan praktikum berdampak pada pengurangan nilai cara kerja. Partner kelompok memulai praktikum tanpa menunggu mahasiswa yang terlambat. Tidak ada tes awal susulan.
2. Tidak ada praktikum susulan bagi mahasiswa yang tidak hadir karena sakit/izin khusus. Mahasiswa tersebut harus memberitahu dosen dan asisten dosen sebelum pelaksanaan praktikum, serta membuat surat tertulis kepada penanggung jawab mata kuliah/praktikum (PJKM). Mahasiswa yang bersangkutan tetap diharuskan membuat laporan (data hasil pengamatan dapat dipinjam dari partner kelompoknya).
3. *Lab safety* HARUS diperhatikan, antara lain: selama praktikum berlangsung mahasiswa harus mengenakan jas laboratorium dengan benar dan sepatu tertutup, tidak makan dan minum di dalam laboratorium, menggunakan lemari asam jika memakai bahan-bahan yang tertentu yang berpotensi membahayakan kesehatan.
4. Mahasiswa yang tidak sedang melakukan kegiatan praktikum atau sudah selesai praktikum dan tidak berkepentingan tidak diperkenankan berada dalam laboratorium.
5. Pemakaian alat-alat khusus harus disertai pengisian *logbook*.
6. Di awal praktikum, mahasiswa harus memeriksa kelengkapan alat yang diperoleh (mencocokkannya dengan daftar peralatan yang tersedia). Jika dalam waktu 15 menit awal setelah pengerjaan tes awal tidak ada pelaporan ketidaksesuaian, maka peralatan yang diberikan dianggap lengkap dan dalam keadaan baik. Di akhir praktikum, peralatan harus kembali dalam keadaan lengkap dan baik. Kehilangan atau kerusakan peralatan menjadi tanggungan kelompok yang bersangkutan.

Barang yang wajib dibawa Praktikan :

Tissue gulung
Kertas label/spidol
Serbet
Pipet Pasteur
Sampel (sesuai modul yang dipraktikumkan)

Komposisi Penilaian:

NTS/NAS = 70% nilai praktikum + 30% nilai UTS/UAS

NA = 40% NTS + 60% NAS

A. Nilai praktikum

1. **Pre-tes** (20%), penilaian oleh Dosen
2. **Cara Kerja** (35%), penilaian oleh Asisten (nilai 50 – 100)
3. **Laporan** (45%), penilaian oleh Asisten (nilai 0 – 100)

Format:

- Cover
- Tujuan 2 poin
- Pendahuluan (maksimal 2 halaman) 15 poin

- Alat Bahan 2 poin
- Skema kerja 8 poin
- Data Hasil Pengamatan dan Perhitungan 10 poin
- Pembahasan dan Tugas 50 poin
- Kesimpulan 8 poin
- Daftar Pustaka 5 poin
- Lampiran (Bonus) 5 poin

Mahasiswa harus mempersiapkan form laporan sementara sesuai dengan modul yang akan dipraktikkan, yang digunakan untuk pengisian data pengamatan praktikum. Laporan dikumpulkan minggu berikutnya, sebelum pre-test.

B. Nilai ujian tulis (UTS/UAS), penilaian oleh Dosen

MODUL I

UJI MINYAK ATAU LEMAK I

TUJUAN :

1. Menentukan tingkat kelarutan minyak/lemak dalam beberapa macam pelarut
2. Menentukan angka penyabunan dari minyak/lemak

DASAR TEORI

Lemak dan minyak tergolong sebagai senyawa trigliserida atau yang dikenal dengan istilah trigliserol. Lemak dan minyak termasuk dalam golongan senyawa ester yang akan menghasilkan gliserol serta asam lemak apabila terhidrolisis. Di dalam temperatur ruangan, lemak berwujud padat, sedangkan minyak berwujud cair. Lemak dan minyak terdiri atas campuran trigliserida dengan rangkaian berbagai asam lemak yang berbeda. Sifat kimia maupun fisik trigliserida bergantung pada komponen asam lemak penyusunnya yang merupakan bagian utama penyusun molekul minyak. Oleh karena itu, jenis minyak maupun lemak yang berbeda memiliki sifat kimia maupun fisik yang berbeda pula. Kualitas dan sifat dari suatu sampel lemak ataupun minyak dapat ditentukan melalui serangkaian uji laboratorium. Tiap uji yang dilakukan menunjukkan sifat tertentu dari sampel.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT:

1. Tabung Reaksi
2. Penjepit kayu
3. Gelas Ukur 10 mL
4. Kondensor dengan asah + selang air + Klem
5. Hotplate stirrer
6. Penangas air
7. Magnetic bar
8. Buret + Klem
9. Beaker glass 50 mL, 100 mL, 500 mL
10. Labu iod 250 mL
11. Corong

BAHAN:

1. Aqua deionisasi
2. Larutan HCl 2N
3. Etanol 96%
4. Chloroform
5. Aseton
6. Lar. HCl standard 0,5 N
7. Lar. KOH dalam etanol (40g/L)
8. Larutan pp 1%
9. Eter
10. Sampel (minyak curah, minyak kelapa, lemak, dan minyak ikan)

Barang yang harus dibawa: Kertas HVS

CARA KERJA

A. Uji Kelarutan Minyak dan Lemak

1. Tambahkan 10 tetes minyak sawit curah pada:
Tabung 1 : 2 mL air

- Tabung 2 : 2 mL HCl 2N
- Tabung 3 : 2 mL etanol dingin
- Tabung 4 : 2 mL etanol panas
- Tabung 5 : 2 mL chloroform
- Tabung 6 : 2 mL aseton dingin
- Tabung 7 : 2 mL aseton panas
- Tabung 8 : 2 mL eter

2. Digojok sampai terdispersi dan tunggu sampai setimbang (\pm 1-2 menit).
3. Ambil 1 tetes bagian dengan pelarut dan teteskan di atas kertas.
4. Keringkan kertas dan amati bekas minyak pada kertas.
5. Ulangi langkah 1-5 untuk sampel 10 tetes minyak kelapa, 10 tetes lemak, 10 tetes minyak ikan.

Tugas:

1. Bagaimanakah hasil-hasil pengamatan kelarutan di atas?
2. Pelarut apa saja yang melarutkan minyak dan lemak?
3. Apakah yang disebut emulgator?
4. Zat-zat apa saja yang disebut emulgator?
5. Apakah emulsi minyak dalam air stabil?

B. Penentuan angka penyabunan

- **Sampel**

1. Timbang 2 g minyak sawit curah dalam labu iod 250 mL.
2. Tambahkan 20 mL larutan KOH.
3. Masukkan *magnetic bar*, tutup dengan pendingin balik, didihkan selama 30 menit.
4. Dinginkan dan tambahkan beberapa tetes indikator phenolphthalein 1% (PP).
5. Titrasi kelebihan larutan KOH dengan larutan standar HCl 0,5 N.
6. Ulangi langkah 1-5 pada sampel lemak

- **Blanko**

1. Masukkan 20 mL larutan KOH awal.
2. Titrasi dengan larutan standar HCl 0,5 N.

Angka penyabunan dinyatakan sebagai banyaknya mg KOH yang dibutuhkan untuk penyabunan sempurna 1 g minyak atau lemak.

$$\text{Angka penyabunan} = \frac{28,05 \times mL_{\text{titrasi}}(\text{blanko} - \text{sampel})}{\text{berat sampel(g)}}$$

Tugas:

Apakah yang dimaksud dengan angka penyabunan?

Resep pembuatan reagen:

Larutan KOH dalam etanol (40 gr/L): 4 gram KOH dilarutkan dalam 100 mL etanol 96%.

MODUL II

UJI MINYAK ATAU LEMAK II

TUJUAN

1. Menentukan angka peroksida dari minyak/lemak
2. Menentukan angka asam dari minyak/lemak
3. Menentukan angka iodium dari minyak/lemak

DASAR TEORI

Minyak terdiri atas campuran trigliserida dengan rangkaian berbagai asam lemak yang berbeda. Sifat kimia maupun fisik trigliserida bergantung pada komponen asam lemak penyusunnya yang merupakan bagian utama penyusun molekul minyak. Kualitas minyak dipengaruhi oleh beberapa parameter, salah satunya adalah ketengikan. Ketengikan merupakan proses rusaknya minyak akibat degradasi minyak oleh rembesan air dari proses hidrolisis maupun kerusakan komponen minyak akibat adanya proses oksidasi. Ketengikan berbasis hidrolisis dan oksidasi memicu timbulnya senyawa baru yang bukan termasuk molekul triasilgliserol serta menimbulkan cita rasa dan bau yang kurang sedap. Kualitas dan sifat dari suatu sampel lemak atau minyak dapat ditentukan melalui serangkaian uji laboratorium. Tiap uji yang dilakukan menunjukkan sifat tertentu dari sampel.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT :

1. Gelas Ukur 10 mL
2. Kondensor dengan asah + selang air.
3. Hotplate stirrer
4. Penangas air
5. Magnetic bar
6. Buret 50 mL
7. Beker gelas 50 mL, 250 mL
8. Labu iod 250 mL
9. Botol akuades
10. Filler
11. Corong

BAHAN :

1. Minyak/lemak
2. Aquadest
3. Asam asetat
4. Chloroform
5. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
6. Larutan amilum 1 %
7. Larutan pp 1%
8. Alkohol 96 %
9. KI jenuh
10. KI 15 %
11. Reagen hanus (iod-bromida)
12. KOH Standar

CARA KERJA

A. Penentuan tingkat ketengikan (Penentuan angka peroksida)

1. Timbang sekitar 2,5 g minyak sawit curah dalam labu iod 250 mL.
2. Tambahkan 15 mL larutan asam asetat-khloroform (3:2) dan homogenkan.
3. Tambahkan 0,25 mL larutan jenuh KI.
4. Diamkan selama 1 menit dengan kadangkala digoyang .
5. Tambahkan 15 mL aquades.
6. Titrasi dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N sampai warna kuning hampir hilang.
7. Tambahkan 0,25 mL larutan amilum 1% dan lanjutkan titrasi sampai warna biru hilang.
8. Ulangi langkah 1-7 untuk sampel minyak tengik.

Angka peroksida dinyatakan dalam mili-equivalen dari peroksida dalam setiap 1000 gram bahan.

$$\text{Angka peroksida} = \frac{\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times \text{N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 1000}{\text{berat bahan (g)}}$$

B. Penentuan angka asam

1. Timbang sekitar 10 g minyak sawit curah dalam labu iod 250 mL.
2. Tambahkan 25 mL alkohol 95%.
3. Masukkan magnetic bar dan tutup dengan pendingin balik, didihkan selama 15 menit.
4. Dinginkan dan tambahkan beberapa tetes indikator phenolphthalein 1% (PP).
5. Larutan minyak di titrasi dengan larutan KOH 0,1N hingga terbentuk warna merah muda yang tidak hilang selama setengah menit.
6. Ulangi langkah 1-5 untuk sampel minyak tengik.

Perhitungan

$$\text{Angka asam} = \frac{\text{mL KOH} \times \text{N KOH} \times 56,1}{\text{berat bahan (g)}}$$

C. Penentuan angka iodium

- Sampel

1. Timbang minyak kelapa sebanyak 0,1 g dalam labu iod bertutup.
2. Tambahkan 2 mL khloroform dan 5 mL reagen iodium-bromida
3. Biarkan di tempat gelap selama 30 menit dengan kadangkala digojog.
4. Tambahkan 2 mL larutan KI 15% dan 20 mL aquades yang telah dididihkan

5. Segera titrasi dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N sampai larutan berwarna kuning pucat
6. Tambahkan 0,4 mL larutan amilum 1%.
7. Titrasi dilanjutkan sampai warna biru hilang.
8. Ulangi langkah 1-7 untuk sampel minyak ikan.

- **Blanko**

1. Campurkan 5 mL reagen iodium-bromida dan 2 mL chloroform dan diamkan di tempat gelap dengan sesekali digojog.
2. Tambahkan 2 mL larutan KI 15% dan 20 mL aquades yang telah dididihkan.
3. Titrasi larutan blanko dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N hingga berwarna kuning pucat.
4. Tambahkan 0,4 mL larutan amilum 1%.
5. Titrasi dilanjutkan hingga warna biru hilang.

Banyaknya natrium thiosulfat yang diperlukan untuk titrasi blanko dikurangi titrasi sampel merupakan ekuivalen iodium yang bereaksi dengan minyak.

Perhitungan:

$$\text{Angka iodium} = \frac{\text{mL titrasi (blanko-sampel)} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 12,691}{\text{berat bahan (g)}}$$

Tugas:

1. Jelaskan apa arti atau makna angka asam dan angka iodium.
2. Dari mana asalnya angka 12,691 pada rumus perhitungan?

Resep pembuatan reagen:

Larutan KI jenuh : sejumlah padatan KI dilarutkan dalam 2 mL aquades hingga jenuh.

Larutan KI 15% : 6 gram KI dilarutkan dalam 40 mL akuades.

Larutan amilum 1% : 0,2 gram amilum dilarutkan dalam 20 mL akuades dan dipanaskan hingga jernih.

MODUL III

UJI KUALITATIF KARBOHIDRAT

TUJUAN

1. Menentukan adanya karbohidrat melalui uji kualitatif.
2. Menentukan jenis karbohidrat dalam suatu bahan.

DASAR TEORI

Karbohidrat merupakan golongan makronutrien yang terdiri dari berbagai jenis dan struktur yang berbeda. Berbagai jenis karbohidrat dapat diidentifikasi keberadaannya melalui reaksi spesifik antara karbohidrat tersebut dengan senyawa atau reagen yang ditambahkan. Reaksi yang terjadi akan menyebabkan perubahan warna tertentu yang bersifat spesifik sehingga jenis karbohidrat dapat diidentifikasi. Berbagai metode yang dilakukan dalam identifikasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui jenis karbohidrat dalam suatu produk yang dibutuhkan dalam penulisan informasi nilai gizi kemasan yang wajib dicantumkan.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT:

1. Tabung reaksi
2. Rak tabung reaksi
3. Beaker glass 50 mL, 100 mL
4. Waterbath
5. Erlenmeyer
6. Gelas Ukur 10 mL, 50 mL
7. Corong
8. Pisau
9. Botol putih 100 mL
10. Batang pengaduk
11. Plat tetes
12. Corong
13. Penjepit kayu
14. Botol semprot
15. Hotplate stirrer
16. Blender

BAHAN:

1. Lar. Fehling A
2. Lar. Fehling B
3. Lar. Karbohidrat 1% masing-masing: Glukosa, Galaktosa, Fruktosa, Maltosa, Sukrosa, Amilum
4. Lar. Benedict's
5. Reagen Barfoed
6. NaOH 2%
7. Reagen Seliwanoff
8. α -Naftol 1%
9. HCl pekat
10. Reagen Bial
11. Reagen Molisch
12. Iod
13. NaOH 2N
14. HCl 2N
15. Na₂CO₃
16. Sari buah
17. Etanol 96%

Sampel yang harus dipersiapkan: sari buah kemasan/jus buah

CARA KERJA

Uji kualitatif karbohidrat standar

Ujilah masing-masing larutan karbohidrat yang telah disediakan dengan berbagai jenis analisa berikut ini. Kemudian tulislah hasil pada tabel.

		JENIS ANALISA								
		Fehling	Benedict	Barfoed	Moor	Selliwa noff	Rapid furfural	Bial	Molisch	Iod
K A R B O H I D R A T	Glukosa 1%									
	Fruktosa 1%									
	Galaktosa 1%									
	Maltosa 1%									
	Sukrosa 1%									
	Amilum 1%									
	Ekstrak Buah									

Prosedur analisa kualitatif karbohidrat

1. **Test Fehling:** campurkan masing-masing 1 mL larutan Fehling A dan Fehling B dalam tabung reaksi. Tambahkan 5 tetes larutan sampel dan didihkan hingga terjadi perubahan warna. Larutan positif jika berwarna kuning atau terbentuk endapan merah pekat.
2. **Test Benedict:** masukkan 2 mL larutan benedict dan 5 tetes larutan sampel dalam tabung reaksi. Didihkan hingga terjadi perubahan warna, kemudian dinginkan larutan. Larutan positif jika berwarna kuning, orange atau terbentuk endapan merah pekat.
3. **Test Barfoed:** tambahkan 2 mL reagent Barfoed dalam 1 mL larutan sampel dalam tabung reaksi. Didihkan hingga terjadi perubahan warna dan diamkan. Larutan positif jika terbentuk warna orange dan lama kelamaan akan terbentuk endapan warna merah.
4. **Test Moor:** tambahkan 1 mL NaOH 2% pada 1 mL larutan sampel pada tabung reaksi dan didihkan hingga terjadi perubahan warna. Larutan positif jika berwarna kuning dan lama kelamaan akan menjadi merah kecoklatan.

5. **Test Selliwanoff:** tambahkan 2 tetes larutan sampel pada 2 mL reagent Selliwanoff pada tabung reaksi. Didihkan hingga terjadi perubahan warna. Larutan positif jika pada saat mendidihkan akan terbentuk warna orange dan akan menjadi orange tua jika didihkan lebih lanjut.
6. **Test Rapid furfural:** tambahkan 6 tetes 1% α -Naftol dan 5 mL HCl pekat dalam 2 mL sampel pada tabung reaksi. Didihkan larutan hingga terjadi perubahan warna. Larutan akan menjadi ungu pada saat mulai dididihkan selama beberapa menit.
7. **Test Bial:** tambahkan 2-3 mL larutan sampel dalam 5 mL reagen Bial pada tabung reaksi. Didihkan larutan hingga terjadi perubahan warna. Larutan akan berwarna biru kehijauan, orange atau ungu.
8. **Test Molisch:** tambahkan 2 tetes reagen Molisch ke dalam 2 mL larutan sampel pada tabung reaksi, campurkan larutan dan tambahkan 0,5 mL asam sulfat pekat perlahan-lahan melewati dinding tabung sampai terbentuk cincin ungu.
9. **Test Iod:** Tambahkan 1 tetes larutan sampel dan 1 tetes iod pada plat tetes, amati perubahan yang terjadi. Kemudian tambahkan 1 tetes NaOH 2N, amati perubahan yang terjadi. Kemudian teteskan HCl 2N, amati perubahan yang terjadi.

Tugas:

Tentukan jenis karbohidrat apa yang terdapat pada sampel.

Resep pembuatan reagen:

Reagen Bial : 150 mg orcinol dilarutkan dalam 50 mL HCl pekat 37%.

Reagen Molisch : 0,5 gram α -Naftol dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%.

Larutan α -Naftol 1% : 0,1 gram α -Naftol dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%.

Larutan NaOH 2% : 4 ml larutan NaOH 2N dilarutkan dalam 16 ml akuades.

MODUL IV

UJI KUANTITATIF KARBOHIDRAT I

TUJUAN :

Menentukan kadar amilum dari bahan yang mengandung karbohidrat sebelum dan setelah hidrolisis.

DASAR TEORI

Karbohidrat merupakan polihidroksi aldehida atau keton, atau senyawa yang menghasilkan senyawa ini bila dihidrolisa. Secara umum terdapat tiga macam karbohidrat berdasarkan dapat tidaknya terhidrolisis, yaitu monosakarida, oligosakarida, dan polisakarida. Amilum merupakan senyawa polisakarida yang tersusun atas beberapa unit monosakarida dengan ikatan glikosida. Penentuan kadar amilum dilakukan sebelum dan setelah hidrolisis menggunakan senyawa HCl yang ditentukan dengan metode spektrofotometri. Metode spektrofotometri akan mengukur absorbansi yang berbanding lurus dengan konsentrasi amilum. Berbagai uji telah dikembangkan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif karbohidrat, mulai dari analisis untuk membedakan jenis-jenis karbohidrat secara umum sampai pada analisis yang mampu membedakan jenis-jenis karbohidrat secara spesifik.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT:

1. Labu ukur 25 mL
2. Waterbath
3. Beaker glass 50 mL, 500 mL
4. Pipet ukur 1 mL, 5 mL
5. Tabung reaksi + Rak
6. Bola hisap
7. Batang pengaduk
8. Spektrofotometer
9. Kuvet
10. Penjepit kayu
11. Botol bening
12. Batu didih

BAHAN:

1. Aquades
2. Iodine
3. HCl 2N
4. NaOH 2N
5. Amilum

Sampel yang harus dipersiapkan: pisang kepok yang belum masak (mentah).

CARA KERJA

A. Isolasi amilum pada sampel (ekstraksi dari buah)

1. Timbang ± 10 gr pisang mentah, potong tipis dan kecil, kemudian masukan ke dalam labu alas bulat.
2. Tambahkan 50 mL etanol 96% dan refluks dalam waterbath dengan suhu 80°C selama 1 jam.
3. Saring dengan kertas saring.
4. Endapan dilarutkan dengan 20 mL air.
5. Didihkan larutan selama 10 menit sampai mengalami gelatinisasi.

B. Pembuatan kurva kalibrasi amilum

1. Buat 20 mL larutan amilum 20 mg/mL.
2. Dari larutan amilum tersebut dilakukan pengenceran 2x, 4x, 8x, 16x, dan 32x.
3. 1 mL dari masing-masing hasil pengenceran ditambahkan dengan 1 mL larutan iodine pada labu ukur 50 mL.
4. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
5. Larutan amilum-iodine dituang ke dalam kuvet.
6. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
7. Buat kurva standar antara absorban dan konsentrasi amilum. r^2 yang diperoleh harus $>0,98$.
8. Larutan blanko dibuat dengan mengencerkan 1 mL iodin dengan akuades hingga 50 mL.

C. Penentuan kadar amilum pada sampel sebelum hidrolisis

1. Campurkan 1 mL sampel dan 1 mL iodine ke dalam labu ukur 50 mL
2. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
3. Larutan amilum-iodine dituang ke dalam kuvet.
4. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.

D. Hidrolisis Amilum

1. Campurkan 2 mL sampel dan 1 mL HCl pekat.
2. Panaskan pada penangas air selama 3 menit dalam lemari asam.
3. Netralkan larutan dengan Na_2CO_3 padat dan diukur dengan kertas pH indikator.
4. Uji kadar amilum seperti pada langkah C.

Tugas:

Bandingkan kadar amilum sebelum dan setelah hidrolisis.

Resep pembuatan reagen:

Larutan amilum 20 mg/ml: 0,4 gram amilum dilarutkan dalam 20 mL akuades dan dipanaskan hingga jernih.

MODUL V

UJI KUANTITATIF KARBOHIDRAT II

TUJUAN:

Menentukan kadar gula reduksi dari suatu bahan yang mengandung karbohidrat dengan metode DNS dan Nelson-Somogyi.

DASAR TEORI

Gula reduksi adalah monosakarida /disakarida yang mengandung gugus aldehid atau keton bebas. Metode DNS (*DiNitrosalicylic acid*) merupakan salah satu metode untuk menentukan gula reduksi dalam suatu bahan. Sampel gula reduksi akan mengalami oksidasi sedangkan gugus NO_2 pada senyawa DNS akan mengalami reduksi sehingga menghasilkan senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna merah kecoklatan. Metode Nelson-Somogyi juga merupakan salah satu metode penentuan gula reduksi yang melibatkan reagen Nelson A, Nelson B, dan arsenomolibdat. Namun, dasar reaksi metode ini berbeda dengan metode DNS. Pada metode Nelson-Somogyi, gula pereduksi pada sampel akan mereduksi ion Cu^{2+} dan terbentuk endapan Cu_2O berwarna merah bata. Kemudian, endapan Cu_2O akan mereduksi arsenomolibdat yang ditambahkan menjadi molibdene blue yang berwarna biru kehijauan.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT:

1. Waterbath
2. Beaker glass 50, 100, 500 mL
3. Pipet ukur 1 mL, 10 mL
4. Tabung reaksi + Rak
5. Bola hisap
6. Batang pengaduk
7. Spektrofotometer
8. Kuvet
9. Sendok besi

BAHAN:

1. Aquades
2. Glukosa
3. DNS
4. Larutan Kalium Natrium Tartrat 40 %
5. NaOH
6. Sodium sulfit
7. Nelson A
8. Nelson B
9. Arsenomolibdat

Sampel yang harus dipersiapkan: sari buah pisang (50 g buah pisang yang sudah masak + 100 mL air, diblender, lalu disaring, dan filtrat diambil).

CARA KERJA

A. Persiapan Larutan Induk Glukosa Standar

1. Buat 50 mL larutan induk glukosa standar (2000 ug/mL glukosa anhidrat).
2. Dari larutan glukosa standar tersebut dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi : 200, 400, 600, 800, 1000 dan 1200 $\mu\text{g/ mL}$.

B. Penyiapan Kurva Standar DNS

1. Masukkan masing-masing 3 mL larutan glukosa standar tersebut ke dalam tabung reaksi dan satu tabung diisi aquadest sebagai blanko.
2. Tambahkan 3 mL larutan DNS ke dalam masing-masing tabung reaksi, tutup dengan aluminium foil.
3. Panaskan campuran di atas air mendidih pada kompor, selama 5-15 menit sampai terbentuk warna merah kecoklatan.
4. Tambahkan 1 mL larutan sodium potassium tartrat (garam rochelle) 40% untuk menstabilkan warna.
5. Dinginkan dengan direndam di air sampai suhu ruang
6. Amati absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.
7. Buatlah kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan absorbansi.

C. Penyiapan Kurva Standar Nelson-Somogyi

1. Ambil 1 mL sampel larutan glukosa dari berbagai konsentrasi pada langkah A2 dan masing-masing diencerkan 10 kali.
2. Ambil masing-masing 1 mL larutan hasil pengenceran dan tambahkan 1 mL reagen Nelson (Nelson A : Nelson B = 25 : 1) pada tabung reaksi dan panaskan dalam air mendidih selama 20 menit.
3. Dinginkan dengan direndam di air sampai suhu ruang.
4. Tambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat dan kocok sampai semua endapan Cu_2O yang ada larut kembali.
5. Tambahkan 7 mL aquadest, kocok sampai homogen.
6. Amati absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.
7. Buatlah kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan absorbansi.

D. Pengukuran Kadar Gula Reduksi Sampel

1. Ulangi langkah B dan seterusnya dengan larutan glukosa standar diganti dengan sampel (Pengukuran dengan metode DNS).
2. Ulangi langkah C dan seterusnya dengan larutan glukosa standar diganti dengan sampel (Pengukuran dengan metode Nelson-Somogyi)

Tugas:

Bandingkan hasil pengukuran kadar gula reduksi dengan metode DNS dan Nelson-Somogy.

Resep pembuatan reagen:

- Larutan sodium potassium tartrat (garam Rochelle) 40 % : 8 gram garam Rochelle dilarutkan dalam 20 mL akuades.

MODUL VI

BUFFER (LARUTAN PENYANGGA)

TUJUAN :

1. Menentukan konstanta asam/basa lemah
2. Membuat buffer dengan pH tertentu

DASAR TEORI

Larutan buffer atau larutan penyangga merupakan larutan yang dapat mempertahankan harga pH-nya. Nilai pH larutan penyangga akan cenderung stabil dan tidak berubah meskipun diberi tambahan sedikit asam, basa, ataupun diencerkan. Larutan buffer memiliki komponen asam yang dapat menahan kenaikan pH dan komponen basah yang dapat menahan penurunan pH. Buffer digunakan untuk berbagai keperluan yang membutuhkan kondisi pH yang stabil. Larutan buffer mampu menghambat terjadinya perubahan pH pada proses tertentu. Kemampuan tersebut bergantung pada kapasitas buffer yang merupakan fungsi dari jenis dan konsentrasi ion-ion yang terkandung di dalamnya.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT :

1. Gelas ukur 10 mL, 100 mL
2. Pipet ukur 1 mL, 5 mL dan 10 mL
3. Beaker glass 100 mL dan 250 mL
4. Labu ukur 100 mL
5. Pengaduk
6. pH-meter
7. Bola hisap
8. Botol semprot
10. Botol bening 100 mL

BAHAN :

1. Asam asetat
2. Natrium asetat
3. Natrium dihidrogen fosfat
4. Dinatrium hidrogen fosfat
5. Natrium karbonat
6. Natrium bikarbonat
7. Aquadem

CARA KERJA

A. Membuat larutan dengan konsentrasi tertentu

Buatlah masing-masing 200 mL larutan asam asetat 0,2M; natrium asetat 0,2M; natrium dihidrogen sulfat 0,2M; dinatrium hidrogen sulfat 0,2M; natrium karbonat 0,2M dan natrium bikarbonat 0,2M.

B. Menentukan konstanta asam lemah (pKa)

1. Penentuan pKa asam asetat

Siapkan larutan asam asetat 0,2M dan natrium asetat 0,2M, campurkan kedua larutan tersebut menurut perbandingan dalam tabel di bawah ini dan encerkan hingga volume 100 mL.

Asam asetat	46 mL	30 mL	5 mL
Natrium asetat	4 mL	20 mL	45 mL

Dari hasil yang diperoleh, ukurlah pH campuran menggunakan pH-meter dan tentukan nilai pKa asam asetat.

2. Penentuan pKa₂ asam fosfat

Siapkan larutan natrium dihidrogen sulfat 0,2M dan dinatrium hidrogen sulfat 0,2M, campurkan kedua larutan tersebut menurut perbandingan dalam tabel di bawah ini dan encerkan hingga volume 100 mL.

Natrium dihidrogen fosfat	44 mL	20 mL	4 mL
Dinatrium hidrogen fosfat	6 mL	30 mL	46 mL

Dari hasil yang diperoleh, ukurlah pH campuran menggunakan pH-meter dan tentukan nilai pKa₂ asam fosfat.

3. Penentuan pKa₂ asam karbonat

Siapkan larutan natrium karbonat 0,2M dan natrium bikarbonat 0,2M, campurkan kedua larutan tersebut menurut perbandingan dalam tabel di bawah ini dan encerkan hingga volume 100 mL.

Natrium karbonat	31 mL	28 mL	25 mL
Natrium bikarbonat	19 mL	22 mL	25 mL

Dari hasil yang diperoleh, ukurlah pH campuran menggunakan pH-meter dan tentukan nilai pKa₂ asam karbonat.

C. Pembuatan Buffer dengan pH tertentu

Dari hasil percobaan B, buatlah masing-masing 100 mL larutan buffer dengan nilai pH berikut:

- 1) pH = 3,5
- 2) pH = 4,8
- 3) pH = 6,5
- 4) pH = 7,1
- 5) pH = 8,0

6) pH = 10,1

Simpan larutan buffer yang Anda buat pada botol kaca untuk digunakan pada praktikum selanjutnya (diberi label nama kelompok, pH buffer, dan tanggal pembuatan).

MODUL VII

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM

TUJUAN

Mempelajari isolasi enzim serta mengetahui aktivitas enzim.

DASAR TEORI

Enzim adalah protein yang punya aktivitas mengkatalisis suatu reaksi. Bila dilakukan analisis secara kimia, maka komposisi kimia suatu enzim, enzim yang aktif maupun yang tidak aktif adalah sama. Karena itu keaktifan suatu enzim tidak dapat ditentukan hanya dengan analisis atau penentuan komposisi kimia saja.

Keaktifan enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia yang melibatkan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut, dan secara kuantitatif aktivitas enzim dapat ditentukan dengan mengukur laju reaksinya. Karena itu jumlah enzim lebih banyak dinyatakan dalam bentuk keaktifan enzim dan dinyatakan dalam satuan atau unit enzim.

Amilase merupakan enzim yang berfungsi memecah amilum atau glikogen. Enzim amilase terdapat pada beberapa bahan seperti pada kecambah. Untuk uji aktivitas, enzim perlu diisolasi terlebih dahulu. Aktivitas amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi amilum per satuan waktu tertentu (dalam praktikum ini adalah 10, 20 atau 30 menit), biasanya dari penurunan kadar amilum yang larut atau dari kadar dektrinnya dengan menggunakan substrat jenuh. Berkurangnya substrat dapat diukur dengan pengurangan derajat pewarnaan iodine terhadap substrat.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT :

1. Blender
2. Labu Ukur 50 mL
3. Gelas ukur 50 mL
4. Mikropipet 1 mL atau Pipet ukur 1 dan 5 mL
5. Tabung reaksi dan rak
6. Beaker 100 mL, 250 mL, 500 mL
7. Vortex
8. Waterbath
9. Kain saring
10. Pengaduk
11. Sentrifuge
12. Kuvet

BAHAN:

1. Aquades
2. Amilum
3. HCl 1M
4. Iodine
5. Sodium Chloride 2%
6. Kecambah

13. Spektrofotometer

Sampel yang harus dipersiapkan: kecambah

CARA KERJA

A. Isolasi enzim amilase dari kecambah

1. Timbang 100 g kecambah dan tambahkan 20 ml NaCl 2%.
2. Blender halus selama 5 menit, kemudian dinginkan dan aduk selama 5 menit.
3. Ulangi langkah 2 sebanyak 2 kali lagi, sehingga total waktu 30 menit.
4. Saring menggunakan kain saring.
5. Sentifuge filtrat dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit.
6. Ambil supernatant.
7. Suspensi enzim diencerkan 2x, 5x, 10x, dan 20x dengan menggunakan akuades.

B. Pembuatan kurva kalibrasi

1. Buat 20 mL larutan amilum 20 mg/mL.
2. Dari larutan amilum tersebut dilakukan pengenceran 2x, 4x, 8x, 16x, dan 32x.
3. 1 mL dari masing-masing hasil pengenceran ditambahkan dengan 1 mL larutan iodine pada labu ukur 50 mL.
4. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
5. Larutan amilum-iodine dituang ke dalam kuvet.
6. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
7. Buat kurva standar antara absorban dan konsentrasi amilum. r^2 yang diperoleh harus $>0,98$.
8. Larutan blanko dibuat dengan mengencerkan 1 mL iodine dengan akuades hingga 50 mL.

C. Uji Aktifitas Enzim Amilase (Sampel: 4, Kontrol: 4, Blanko: 4)

• Sampel

1. Masukkan masing-masing 1 mL larutan sampel dengan berbagai pengenceran ke dalam tabung reaksi.
2. Masing-masing tabung ditambah amilum hasil pengenceran 2x sebanyak 1 mL.
3. Inkubasikan selama 10 menit pada suhu 37°C.
4. Pindahkan ke labu ukur 50 mL dan tambahkan 1 mL HCl 1M.
5. Tambahkan 1 mL iodine.
6. Kemudian encerkan dengan akuades hingga tanda batas.

7. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.

• **Kontrol**

1. Masukkan masing-masing 1 mL larutan sampel dengan berbagai pengenceran ke dalam tabung reaksi.
2. Masing-masing tabung ditambah 1 mL HCl 1M.
3. Inkubasikan selama 10 menit pada suhu 37⁰C.
4. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
5. Tambahkan 1 mL amilum hasil pengenceran 2x.
6. Kemudian encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
7. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.

• **Blanko**

1. Masukkan masing-masing 1 mL larutan sampel dengan berbagai pengenceran ke dalam tabung reaksi.
2. Masing-masing tabung ditambah 1 mL HCl 1M.
3. Inkubasikan selama 10 menit pada suhu 37⁰C.
4. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
5. Kemudian encerkan dengan akuades hingga tanda batas.

Tugas

1. Tentukan aktivitas enzim pada masing-masing konsentrasi.
2. Buatlah kurva [enzim] vs aktivitas enzim.

Rumus Perhitungan:

$$Aktivitas\ enzim = \frac{[amilum\ kontrol] - [amilum\ sampel]}{Waktu\ inkubasi} \times \frac{Volume\ Uji}{Volume\ Enzim}$$

Resep pembuatan reagen:

Larutan amilum 20 mg/ml: 0,4 gram amilum dilarutkan dalam 20 mL akuades dan dipanaskan hingga jernih.

MODUL VIII

AKTIVITAS ENZIM I

TUJUAN

Mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim yaitu suhu dan pH.

DASAR TEORI

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama adalah substrat, suhu, keasaman, kofaktor dan inhibitor. Tiap enzim memerlukan suhu dan pH (tingkat keasaman) optimum yang berbeda-beda karena enzim adalah protein, yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan keasaman berubah. Jika suhu dan pH tidak optimum lalu terjadi perubahan bentuk, enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau bahkan strukturnya akan mengalami kerusakan. Hal ini dapat mengakibatkan hilangnya fungsi enzim. Kerja enzim dapat dipengaruhi oleh adanya molekul lain.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT :

1. Labu Ukur 50 mL
2. Gelas ukur 10, 50 mL
3. Mikropipet 1 mL atau Pipet ukur 5 dan 1 mL
4. Tabung reaksi dan rak
5. Beaker mL dan 250 mL
6. Bola hisap
7. Waterbath
8. Termometer
9. Pengaduk
10. Sentrifuge
11. Kuvet
12. Spektrofotometer
13. Botol Semprot

BAHAN:

1. Aquades
2. Amilum
3. HCl 1M
4. Iodine
5. Kecambah
6. Larutan buffer pH 3,5 ; 4,8 ; 6,5; 8

Sampel yang harus dipersiapkan: saliva

CARA KERJA

A. Pembuatan kurva standar

1. Buat 20 mL larutan amilum 20 mg/mL.
2. Dari larutan amilum tersebut dilakukan pengenceran 2x, 4x, 8x, 16x, dan 32x.

3. 1 mL dari masing-masing hasil pengenceran ditambahkan dengan 1 mL larutan iodine pada labu ukur 50 mL.
4. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
5. Larutan amilum-iodine dituang ke dalam kuvet.
6. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
7. Buat kurva standar antara absorban dan konsentrasi amilum. r^2 yang diperoleh harus $>0,98$.
8. Larutan blanko dibuat dengan mengencerkan 1 mL iodin dengan akuades hingga 50 mL.

B. Persiapan Sampel

1. Ambil 1 mL saliva, encerkan 5x, 25x, dan 100x dengan akuades.

C. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim (Sampel: 5, Kontrol: 1, Blanko: 1)

• Sampel

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam lima tabung reaksi
2. Tambahkan 1 mL larutan buffer dibawah ini:
 - Tabung 1: larutan buffer pH 3,5
 - Tabung 2: larutan buffer pH 4,8
 - Tabung 3: larutan buffer pH 6,5
 - Tabung 4: larutan buffer pH 8
 - Tabung 5: akuades
3. Masing-masing tabung ditambahkan substrat amilum 1 mL pengenceran 2x
4. Inkubasi selama 2 menit pada suhu 37°C di waterbath.
5. Tambahkan 1 mL HCl 1 M
6. Tambahkan 1 mL iodine.
7. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
8. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
9. Ulangi langkah 1-8 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

• Kontrol

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL akuades.
3. Tambahkan 1 mL HCl 1M.
4. Inkubasikan selama 2 menit pada suhu 37°C .

5. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
6. Tambahkan 1 mL amilum hasil pengenceran 2x.
7. Encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
8. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
9. Ulangi langkah 1-8 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar

- **Blanko**

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL akuades.
3. Tambahkan 1 mL HCl 1M.
4. Inkubasikan selama 2 menit pada suhu 37⁰C.
5. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
6. Kemudian encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
7. Ulangi langkah 1-6 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

D. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim (Sampel: 4, Kontrol: 1, Blanko: 1)

- **Sampel**

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam empat tabung reaksi
2. Masing-masing tabung ditambahkan 1 mL substrat amilum pengenceran 2x.
3. Inkubasi selama 2 menit pada kondisi:
 - Tabung 1: 0°C (dalam air es)
 - Tabung 2: suhu ruang
 - Tabung 3: 47°C
 - Tabung 4: 75°C
4. Tambahkan 1 mL HCl 1 M
5. Tambahkan 1 mL iodine.
6. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
7. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
8. Ulangi langkah 1-7 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

- **Kontrol**

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL HCl 1M.
3. Inkubasikan selama 2 menit pada suhu ruang.
4. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
5. Tambahkan 1 mL amilum hasil pengenceran 2x.
6. Encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
7. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
8. Ulangi langkah 1-7 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar

- **Blanko**

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL akuades.
3. Tambahkan 1 mL HCl 1M.
4. Inkubasikan selama 2 menit pada suhu ruang.
5. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
6. Encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
7. Ulangi langkah 1-6 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

Tugas:

Buat kurva (a) pH vs aktivitas enzim dan (b) suhu vs aktivitas enzim.

Rumus Perhitungan:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{amilum kontrol}] - [\text{amilum sampel}]}{\text{Waktu inkubasi}} \times \frac{\text{Volume Uji}}{\text{Volume Enzim}}$$

MODUL IX

AKTIVITAS ENZIM II

TUJUAN

Mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim yaitu konsentrasi substrat dan aktivator & inhibitor.

DASAR TEORI

Enzim adalah suatu katalisator protein (biokatalisator) yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup. Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi spontan pada temperatur fisiologik. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah suhu, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor. Konsentrasi substrat yang semakin banyak dapat mempercepat aktivitas enzim, tetapi aktivitasnya juga dapat dipengaruhi oleh konsentrasi enzim itu sendiri. Aktivator dan inhibitor juga dapat mengubah aktivitas enzim, contohnya seperti logam berat.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT :

1. Labu Ukur 50 mL
2. Gelas ukur 50 mL
3. Pipet ukur 1 mL
4. Tabung reaksi dan rak
5. Beaker 50, 250 mL
6. Waterbath
7. Pengaduk
8. Bola hisap
9. Kuvet
10. Spektrofotometer
11. Penjepit kayu

BAHAN:

1. Aquades
2. Amilum
3. HCl 1M
4. Iodine
5. Kecambah
6. Lar. NaCl
7. Lar. MgSO₄
8. Lar. PbNO₃
9. Lar. AgNO₃
10. Lar. CaCl₂

Sampel yang harus dipersiapkan: saliva

CARA KERJA

A. Pembuatan kurva standar

1. Buat 20 mL larutan amilum 20 mg/mL.
2. Dari larutan amilum tersebut dilakukan pengenceran 2x, 4x, 8x, 16x, dan 32x.

3. 1 mL dari masing-masing hasil pengenceran ditambahkan dengan 1 mL larutan iodine pada labu ukur 50 mL.
4. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
5. Larutan amilum-iodine dituang ke dalam kuvet.
6. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
7. Buat kurva standar antara absorban dan konsentrasi amilum. r^2 yang diperoleh harus $>0,98$.
8. Larutan blanko dibuat dengan mengencerkan 1 mL iodin dengan akuades hingga 50 mL.

B. Persiapan Sampel

1. Ambil 1 mL saliva, encerkan 5x, 25x, dan 100x dengan akuades.

C. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim (Sampel: 5, Kontrol: 5, Blanko:

1)

• Sampel

1. Ambil masing-masing 1 mL amilum berbagai konsentrasi dan masukkan ke dalam tabung reaksi.
2. Masing-masing tabung ditambah dengan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x.
3. Inkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C .
4. Tambahkan 1 mL HCl 1M
5. Tambahkan 1 mL iodine.
6. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
7. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
8. Ulangi langkah 1-7 dengan menggunakan sampel saliva dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

• Kontrol

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL HCl 1M.
3. Inkubasikan selama 20 menit pada suhu 37°C .
4. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
5. Tambahkan 1 mL amilum berbagai pengenceran.
6. Encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
7. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
8. Ulangi langkah 1-7 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x)

jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

- **Blanko**

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL HCl 1M.
3. Inkubasikan selama 20 menit pada suhu 37°C.
4. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
5. Kemudian encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
6. Ulangi langkah 1-5 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

D. Pengaruh Logam Alkali dan Logam Berat terhaap Aktivitas Enzim (Sampel: 6, Kontrol: 1, Blanko: 1)

- **Sampel**

1. Masukkan 1 mL amilum pengenceran 2x ke dalam 6 tabung reaksi.
2. Tambahkan 2 tetes larutan dibawah ini:
 - Tabung 1: larutan NaCl.
 - Tabung 2: larutan CaCl₂.
 - Tabung 3: larutan MgSO₄.
 - Tabung 4: larutan PbNO₃.
 - Tabung 5: larutan AgNO₃.
 - Tabung 6: akuades
3. Masing-masing tabung ditambah dengan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x.
4. Inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang.
5. Tambahkan 1 mL HCl 1M
6. Tambahkan 1 mL iodine.
7. Encerkan dengan akuades hingga 50 mL.
8. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
9. Ulangi langkah 1-7 dengan menggunakan sampel saliva dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

- **Kontrol**

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL HCl 1M.

3. Inkubasikan selama 20 menit pada suhu 37⁰C.
4. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
5. Tambahkan 1 mL amilum pengenceran 2x.
6. Encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
7. Amati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.
8. Ulangi langkah 1-7 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar

- **Blanko**

1. Masukkan 1 mL sampel saliva pengenceran 5x ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL HCl 1M.
3. Inkubasikan selama 20 menit pada suhu 37⁰C.
4. Tambahkan 1 mL iodine pada labu ukur 50 mL.
5. Kemudian encerkan dengan akuades hingga tanda batas.
6. Ulangi langkah 1-5 dengan menggunakan sampel dengan pengenceran lain (25x dan 100x) jika hasil absorbansi diatas kurva standar.

Tugas:

1. Buat kurva [substrat] vs aktivitas enzim.
2. Tentukan pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim.

Rumus Perhitungan:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{amilum kontrol}] - [\text{amilum sampel}]}{\text{Waktu inkubasi}} \times \frac{\text{Volume Uji}}{\text{Volume Enzim}}$$

MODUL X

UJI KUALITATIF PROTEIN

TUJUAN

1. Menentukan adanya protein melalui uji kualitatif
2. Menentukan jenis protein dalam suatu bahan

DASAR TEORI

Protein adalah makromolekul polipeptida yang tersusun oleh monomer asam amino. Makromolekul ini berperan penting dalam perkembangan jaringan sehingga analisis keberadaannya pada berbagai bahan penting dilakukan. Keberadaan protein dalam suatu bahan/sampel dapat diidentifikasi melalui reaksi-reaksi spesifik antara protein tersebut dengan senyawa/reagen tertentu yang ditambahkan ke dalam larutan sampel. Reaksi-reaksi spesifik ini akan menunjukkan keberadaan protein dengan jenis yang sesuai dengan tujuan dan prinsip uji yang dilakukan, misalnya untuk deteksi asam amino tertentu. Keberadaan protein ini akan ditunjukkan oleh fenomena seperti perubahan warna, kemunculan cincin, dan sebagainya.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT :

1. Pipet tetes
2. Tabung reaksi + rak
3. Penangas air
4. Tabung falcon
5. Beaker glass 50, 100, 250, 500 mL
6. Waterbath
7. Corong Buchner
8. Pipet ukur 1 mL, 5 mL
9. Bola hisap
10. Batang pengaduk
11. Gelas ukur 10 mL, 100 mL
12. Sentrifuge
13. pH-meter

BAHAN :

1. Tirosin, Glisin, Urea, Gelatin
2. Putih telur, susu cair
3. Ninhidrin
4. Asam nitrat pekat
5. NaOH
6. Asam asetat glacial
7. H₂SO₄ pekat
8. CuSO₄
9. Etanol 96%
10. Etil eter
11. Lar. Buffer Asetat pH=4,8

Sampel yang harus dipersiapkan: susu putih *plain* dan putih telur

CARA KERJA

A. Isolasi kasein dari susu

1. Masukkan 20 mL susu putih plain dalam beaker glass 500 mL
2. Masukkan magnetic bar dan panaskan pada suhu 40°C.
3. Panaskan juga 20 mL buffer asetat (pH 4,8) pada suhu yang sama,
4. Tambahkan perlahan-lahan ke dalam susu.
5. Cek pH dengan pH-meter, campuran harus menunjukkan pH = 4,8.
6. Tambahkan larutan asam asetat/natrium asetat untuk mengatur pH.
7. Dinginkan campuran hingga mencapai suhu kamar
8. Masukkan ke dalam 4/8 falcon sama berat dan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4.000 rpm
9. Saring dengan kertas saring dan ambil endapannya.

B. Analisa Kualitatif

Ujilah masing-masing larutan sampel yang telah dibuat dengan berbagai jenis analisa berikut ini. Kemudian tulislah hasil pada tabel yang disediakan.

Protein atau Asam Amino	Jenis Analisa			
	Ninhidrin	Xantoproteic	Biuret	Hopkins-Cole
Tirosin 1%				
Glisin 1%				
Urea 1%				
Gelatin 1%				
Kasein 1%				
Putih telur 1%				

Prosedur analisa kualitatif protein

1. **Uji Ninhidrin:** ambil 1 mL dari masing-masing sampel yang disediakan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 1 mL reagen Ninhidrin 1% lalu panaskan 1-2 menit. Amati perubahan warnanya.
2. **Uji Xantoproteic:** tambahkan 1 mL asam nitrat pekat ke dalam 1 mL larutan asam amino, dinginkan dan amati perubahan warna. Tambahkan 1 mL NaOH 40% untuk membuat larutan alkali kuat. Amati perubahan warna yang terjadi.
3. **Uji Biuret:** tambahkan 3 mL dari larutan protein dalam tabung reaksi dan tambahkan 3 mL 10% NaOH. Homogenkan dan tambahkan 3 mL tetes demi tetes CuSO_4 1%. Amati perubahan warnanya.

4. Uji Hopkins-Cole: campurkan 2 mL larutan protein dengan 2 mL reagen glyoxylic. Miringkan tabung dan tambahkan secara hati-hati 2-4 mL H₂SO₄ pekat lewat dinding tabung. Amati perubahannya.

Resep pembuatan reagen:

- Tirosin 1% dibuat dengan melarutkan 0,25 gr tirosin dalam 10 mL buffer fosfat pH 7,1 yang Anda buat pada modul VI. Genapkan larutan dengan air sampai volume 25 mL.
- Glisin, urea, gelatin, kasein, dan putih telur dilarutkan dengan akudes dan dibuat masing-masing sebanyak 20 mL
- Ninhidrin dilarutkan dengan etanol 96% dan dibuat sebanyak 10 mL.
- NaOH 40% dibuat sebanyak 10 mL.
- NaOH 10% dibuat sebanyak 25 mL.
- Reagen glyoxylic dibuat dengan memanaskan 20 mL asam asetat glasial di bawah sinar matahari selama minimal 15 menit.

MODUL XI

UJI KUANTITATIF PROTEIN

TUJUAN:

Menentukan kadar protein terlarut dalam sampel dengan metode Lowry

DASAR TEORI

Analisis protein dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kuantitatif terdiri dari: metode Kjeldahl, metode kromatografi (cara fraksinasi), metode titrasi formol, metode Lowry, metode spektrofotometri visible (Biuret), metode spektrofotometri UV, dan metode Bradford. Pada percobaan ini dilakukan analisis protein secara kuantitatif. Metode pewarnaan yang bisa digunakan adalah metode Bradford dan Biuret/Lowry. Perubahan warna karena reaksi antar reagen dengan protein terlarut pada kedua uji ini dapat diukur secara kuantitatif dengan penggunaan spektrofotometri. Analisa kuantitatif penting untuk mengetahui jumlah komposisi atau kadar suatu zat pada suatu bahan, agar dapat digunakan untuk menyusun rancangan penggunaan bahan dalam suatu konsumsi atau pengolahan.

Di sini, silakan anda lanjutkan hingga diperoleh dasar teori yang memadai bagi bekal anda untuk melakukan dan memahami eksperimen.

ALAT DAN BAHAN

ALAT:

1. Mortar
2. Labu ukur 50 mL
3. Sentrifuge
4. Beaker glass 50 mL, 100 mL
5. Waterbath
6. Tabung reaksi
7. Batang pengaduk
8. Mikro pipet 100-1000 ul
9. Pipet ukur 10 mL
10. Bola hisap
11. Kuvet
12. Spektrofotometer
13. Tabung reaksi + Rak

BAHAN:

1. Biskuit bayi
2. NaCl
3. Standar protein
4. 2% Na₂CO₃
5. 0.1 N NaOH
6. CuSO₄ 2 %
7. Sodium potassium tartrat 2 %
8. Reagen Folin-ciocalteau
9. Aquades

Sampel yang harus dipersiapkan: biskuit bayi

CARA KERJA

I. Metode Lowry

A. Isolasi protein terlarut dari biskuit bayi

1. Timbang 10 gr sampel biskuit bayi.
2. Haluskan dengan mortar.
3. Tambahkan 50 mL NaCl 10%, campurkan secara merata.
4. Sentrifuge dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit.
5. Ambil supernatant dan dididihkan dalam waterbath selama 15 menit.
6. Dinginkan hingga mencapai suhu ruang.
7. Sentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.
8. Ambil supernatant dan genapkan volume dengan NaCl 10% sebanyak 50 mL.

B. Penyiapan Kurva Standar Metode Lowry

1. Buat 7 ml larutan protein standar (Bovine Serum Albumin/BSA) 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan mengencerkan dari BSA kadar 2 mg/mL.
2. Encerkan lebih lanjut BSA 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sesuai tabel berikut :

Tabung	mL larutan induk Protein	mL H ₂ O	μg protein/mL
1	0	1.0	0
2	0.1	0.9	30
3	0.2	0.8	60
4	0.3	0.7	90
5	0.4	0.6	120
6	0.5	0.5	150
7	0.6	0.4	180
8	0.7	0.3	210
9	0.8	0.2	240
10	1.0	0	300

3. Tambahkan ke dalam masing-masing tabung 8 mL reagen Lowry B, vortex, dan biarkan 10 menit.
4. Tambahkan 1 mL reagen Lowry A, vortex, dan biarkan 20 menit.
5. Bacalah OD pada panjang gelombang 600 nm.
6. Buatlah kurva standar yang menunjukkan hubungan antara OD dan konsentrasi.

C. Penyiapan Kurva Standar Metode Bardford

1. Buat masing-masing 1 mL larutan protein standar BSA dengan konsentrasi : 100, 200, 400, 600, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan mengencerkan dari BSA kadar 2 mg/mL

2. Masukkan masing-masing 100 μL larutan protein berbagai pengenceran tersebut ke dalam tabung reaksi dan tutup keseluruhan permukaan tabung reaksi dengan aluminium foil.
3. Tambahkan masing-masing tabung 2,5 mL reagen Bradford, vortex lalu diamkan selama 10 menit.
4. Bacalah absorbansi masing-masing larutan tersebut pada panjang gelombang 595 nm.
5. Buatlah kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi protein dan absorbansi.

D. Pengukuran Kadar Protein

1. Masukkan 1 mL sampel ke dalam tabung reaksi dan lanjutkan langkah B3 dan seterusnya (Pengukuran dengan metode Lowry).
2. Masukkan 100 μL sampel ke dalam tabung reaksi dan lanjutkan langkah C3 dan seterusnya (Pengukuran dengan metode Bradford).
3. Lakukan pengenceran jika absorbansi berada di atas kurva standar yang dibuat.

Tugas:

Hitung kadar protein dalam sampel (% b/b).

Resep pembuatan reagen:

- 100 mL Reagen Lowry B1: 2 gram Na_2CO_3 dan 0,4 gram NaOH dilarutkan hingga 100 mL.
- Reagen Lowry B yang digunakan: mencampur 100 mL reagen Lowry B1 + 1 mL reagen Lowry B2 + 0.5 mL reagen Lowry B3, homogenkan.
- Reagen Lowry A: 20 mL reagen Folin-ciocalteu ditambahkan dengan 20 mL akuades.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yazid Estien dan Lisda Nursanti. 2015. Biokimia Praktikum Analisis Kesehatan. Jakarta: EGC.
2. Tahar, N, F. M, dan D. N. A. 2017. Penentuan Kadar Protein Daging Ikan Terbang (*Hyrundichthys oxycephalus*) sebagai Substitusi Tepung dalam Formulasi Biskuit. *Jurnal Farmasi*, 5(36), 251–257.
3. Angelia, I. O. 2016. Analisis Kadar Lemak Pada Tepung Ampas Kelapa. *Jtech*. 4.(1): 19–23.
4. Elzagheid, M. I. 2018. Laboratory Activities to Introduce Carbohydrates Qualitative Analysis to College Students, 6(2), pp. 82-86. doi: 10.12691/wjce-6-2-1.
5. Hidayanto, A. P. 2017. Modul Praktikum. Jakarta: Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Esa Unggul.
6. Nocianitri, K. A. et al. 2015. Biokimia Pangan Dasar. Bali.
7. Nurfadilah, Yuntarso, A. and Herawati, D. 2019. Perbandingan Metode Standar Nasional Indonesia Dan Non Standar Nasional Indonesia Dalam Penentuan Kadar Karbohidrat Total, *Jurnal SainHealth*. 3.(2): 37-41
8. Puspitaningrum, R., Supriyatin and Fitri, A. L. 2018. Penuntun Praktikum Biokimia. Jakarta.
9. Yenrina, R. 2015. Metode Analisis Bahan Pangan dan Komponen Bioaktif, Persepsi Masyarakat Terhadap Perawatan Ortodontik Yang Dilakukan Oleh Pihak Non Profesional.
10. Yuliana, A. 2018. Biokimia Farmasi. Surabaya: Jakad Publishing.
11. Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham. 2023. Biochemistry, seventh edition, Cengage Learning, ISBN 978-0357728451.
12. David L. Nelson, Michael M Cox. 2021. Lehninger Principles of Biochemistry, eighth edition, W. H. Freeman, ISBN 978-1319228002.
13. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto, Jr., Lubert Stryer. 2019. Biochemistry, ninth edition, W.H. Freeman, ISBN 978-1319114671.
14. Roger L. Miesfeld, Megan M. McEvoy. 2021. Biochemistry, second edition, W. W. Norton & Company, ISBN 978-0393533521.
15. John Tymoczko, Jeremy Berg, Gregory Gatto Jr., Lubert Stryer. 2018. Biochemistry A Short Course, fourth edition, W. H. Freeman, ISBN 978-1319114794.

DIREKTORAT PENERBITAN DAN PUBLIKASI ILMIAH UNIVERSITAS
SURABAYA