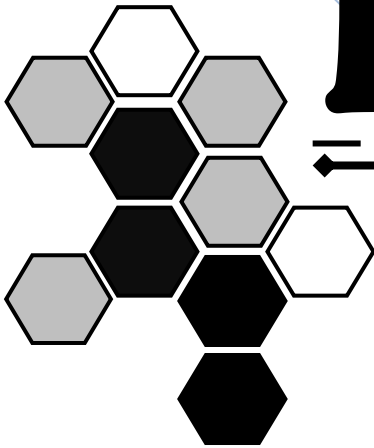


PENUNTUN PRAKTIKUM

BIOKIMIA



Tim Penyusun:
Dr. Pintaka Kusumaningtyas, S.Pd., M.Si.
Dr. H. Usman, S.Si., M.Si.



Photo
3 x 4 cm

NAMA :
NIM :
KELOMPOK :
PROG. STUDI : PENDIDIKAN KIMIA
KELAS : REGULER PAGI / SORE / A / B



LABORATORIUM KIMIA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS MULAWARMAN

2022

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur senantiasa kami panjatkan kehadirat Allah subhanahuwata'ala, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga Penuntun Biokimia Edisi Revisi ini dapat terselesaikan. Penuntun praktikum ini disusun berdasarkan penuntun yang ada sebelumnya, namun terdapat beberapa perubahan pada metode yang digunakan dalam percobaan. Setiap percobaan berisi teori singkat sebagai pengantar untuk memahami percobaan, prosedur kerja dan lembar pengamatan. Tim penyusun menyadari bahwa buku penuntun praktikum Biokimia ini masih memiliki kekurangan. Untuk itu, dengan senang hati kami akan menerima kritik dan saran dari pembaca guna perbaikan dan revisi pada masa mendatang. Akhirnya, kami berharap semoga buku ini bermanfaat dan dapat dipahami mahasiswa guna kelancaran dalam penyerapan ilmu pengetahuan sebagai upaya memajukan pendidikan khususnya ilmu kimia.

Samarinda, Januari 2022

Tim Penyusun

KATA PENGANTAR -----	1
DAFTAR ISI -----	2
TATA TERTIB PRAKTIKUM -----	3
PETUNJUK KESELAMATAN KERJA DI LABORATORIUM -----	4
LAMBANG ZAT -----	5
PERCOBAAN I ANALISA KUALITATIF KARBOHIDRAT -----	6
PERCOBAAN II ANALISA KUANTITATIF KARBOHIDRAT -----	12
PERCOBAAN III ANALISA KUALITAS LIPIDA -----	19
PERCOBAAN IV PENENTUAN KANDUNGAN LIPID -----	22
PERCOBAAN V ANALISA KUALITATIF PROTEIN -----	25
PERCOBAAN VI ANALISA KUANTITATIF PROTEIN -----	28
PERCOBAAN VII PENENTUAN AKTIVITAS ENZIM -----	32
PEMBUATAN BEBERAPA PEREAKSI KHUSUS -----	37
DAFTAR PUSTAKA -----	38
TENTANG LAPORAN -----	39

Kehadiran

1. Praktikan diwajibkan melaksanakan seluruh praktikum.
2. Praktikan diwajibkan datang 10 menit sebelum praktikum dimulai, dan yang terlambat tanpa alasan yang jelas dianggap absen dan tidak diperbolehkan mengikuti praktikum pada hari itu.
3. Praktikan yang berhalangan hadir karena sakit maka diwajibkan melaporkan diri secepatnya kepada asisten praktikum dengan membawa surat keterangan dari dokter.
4. Praktikan diwajibkan mengisi presensi setiap praktikum.

Sebelum Praktikum

5. Praktikan sudah memahami dan menguasai materi praktikum yang akan dilaksanakan yang dinyatakan lulus responsi dan diwajibkan telah menyelesaikan laporan dari tujuan hingga prosedur kerja pada buku laporan praktikum.
6. Praktikan diwajibkan membawa pulpen, penghapus pulpen, pensil, penghapus pensil, penggaris, kalkulator, buku penuntun praktikum dan buku laporan praktikum.
7. Setiap kelompok diwajibkan membawa lap kasar (2), lap halus (2), tissue gulung (2), sikat tabung (2) dan pipet tetes (12).
8. Setiap kelompok diwajibkan mengisi bon alat dan meminjam alat yang dibutuhkan kepada koordinator asisten praktikum atau laboran.
9. Setiap kelompok diwajibkan memeriksa kelengkapan alat dan bahan praktikum, bila ada kekurangan/kerusakan laporkan pada asisten praktikum.

Praktikum

10. Praktikan diwajibkan memakai jas lab, identitas (nama dada), sarung tangan dan masker.
11. Praktikan tidak diperbolehkan mengenakan sandal/sepatu sandal, sepatu hak tinggi, kaos oblong, pakaian yang sempit, perhiasan dan memelihara kuku yang panjang.
12. Praktikan dilarang merokok, makan dan minum, serta membuat keributan atau hal-hal yang dapat mengganggu praktikum.
13. Praktikan wajib bersikap tenang dan sopan.
14. Nada dering Hp dinonaktifkan dan tidak diperbolehkan menggunakan Hp sebagai alat hitung dan lain sebagainya.
15. Praktikan hanya diperbolehkan menggunakan alat dan bahan yang ada di meja masing-masing dan dilarang mengambil &/ menukar alat &/ bahan dari &/ ke meja lain tanpa izin/ sepengetahuan dari asisten praktikum.
16. Kelompok yang merusakkan/memecahkan alat diwajibkan mengganti alat tersebut paling lambat dua pekan setelah tanggal pemecahan sesuai surat pernyataan (dapat diminta pada asisten/koordinator asisten/laboran).
17. Praktikan harus menjaga meja agar supaya tidak kotor, basah atau penuh dengan barang-barang yang tidak perlu.
18. Praktikan dilarang membuang sampah/bahan padatan ditempat cuci, *buanglah sampah pada tempatnya*.
19. Praktikan dilarang meninggalkan laboratorium tanpa seizin asisten praktikum.

Usai Praktikum

20. Praktikan diwajibkan mencuci/membersihkan peralatan praktikum dan mengembalikannya kepada koordinator asisten praktikum / laboran dalam keadaan baik, bersih dan kering.
21. Praktikan diwajibkan membersihkan dan merapikan meja praktikum masing-masing, merapikan botol-botol zat dan tempat duduk pada keadaan semula.
22. Setiap kelompok diwajibkan membersihkan ruangan sesuai dengan jadwal piket yang telah ditentukan oleh asisten praktikum.
23. Setiap kelompok diwajibkan membuat laporan sementara yang disahkan oleh asisten praktikum dan salinannya diserahkan kepada asisten praktikum.

Sanksi

24. Pelanggaran dari ketentuan-ketentuan di atas dapat mengakibatkan sanksi akademis (skorsing praktikum, tidak diperbolehkan mengikuti ujian semester dan lain-lain).

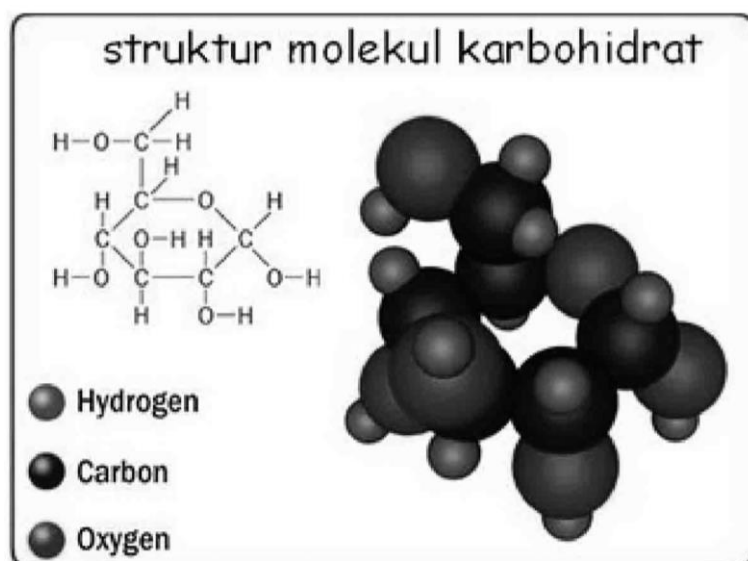
PETUNJUK KESELAMATAN KERJA DI LABORATORIUM

1. Semua pekerjaan dan penggunaan bahan-bahan kimia berbahaya dengan uap beracun atau merangsang harus dilakukan di dalam almari asam.
2. Hati-hati dengan semua pekerjaan pemanasan. Hindarkan percikan cairan atau terhisapnya uap selama bekerja.
3. Jauhkan semua senyawa organik yang mudah menguap, seperti: **alkohol, eter, kloroform, aseton, dan spirtus**, dari api secara terbuka karena bahan-bahan demikian mudah terbakar. Sebaiknya, gunakan pemanasan dengan *waterbath*.
4. Bila pemanasan menggunakan api terbuka, nyalakan lampu pembakar spirtus dengan korek api biasa. Jangan menyalakan api spirtus dengan lampu spirtus lain yang sudah menyala untuk menghindari terjadinya letupan api.
5. Matikan api pada lampu spirtus dengan menutup sumbunya. Jangan mematikan lampu dengan meniup untuk mencegah terjadinya kebakaran atau letupan api.
6. Jangan mencoba mencicipi bahan kimia atau mencium langsung asap atau uap dari mulut tabung. Namun, kipaslah terlebih dahulu uap ke arah muka.
7. Jangan sekali-kali menghisap pipet melalui mulut untuk mengambil larutan asam atau basa kuat, seperti: **HNO₃, HCl, H₂SO₄, Asam asetat glasial, NaOH, NH₄OH**, dan lain-lain. Gunakan pipet dengan bola isap untuk memindahkan bahan-bahan demikian atau bahan beracun lainnya ke dalam alat yang akan digunakan.
8. Segera tutup kembali bahan kimia yang disediakan dalam botol tertutup untuk mencegah terjadinya inhalasi bahan-bahan.
9. Jangan sampai menumpahkan bahan-bahan kimia, terutama asam atau basa pekat, di meja kerja atau pada lantai. Bila hal ini terjadi, segera laporkan pada dosen atau asisten.
10. Bila terjadi kontak dengan bahan-bahan kimia **berbahaya; korosif; atau beracun**, segera bilas dengan air sebanyak-banyaknya. Selanjutnya, segera laporkan kepada dosen atau asisten.
11. Jangan menggosok-gosok mata atau anggota badan lain dengan tangan yang mungkin sudah terkontaminasi bahan kimia.
12. Berhati-hatilah bila bekerja dengan bahan uji yang berasal dari bahan biologis, seperti saliva, karena mungkin dapat terinfeksi kuman atau virus berbahaya seperti hepatitis.
 - a. Sebaiknya, gunakan sarung tangan karet sekali pakai, terutama bila ada luka.
 - b. Cuci segera tangan atau anggota badan yang kontak atau terpecik bahan tersebut.
 - c. Cuci alat-alat praktikum dengan sabun dan sterilisasi dengan merendamnya dalam larutan Natrium hipoklorit 0,5% selama 30 menit.
 - d. Bersihkan meja laboratorium dengan air sabun dan dengan larutan natrium hipoklorit 0,5%.
13. Buanglah cairan atau larutan yang telah selesai digunakan untuk percobaan melalui bak pencuci. Selanjutnya, bilas dan cuci dengan air hingga bersih.
14. Penanganan jika terjadi kebakaran, kebakaran tergolong menjadi 4 jenis, yaitu:
 - a. **Kebakaran A**, yaitu kebakaran akibat bahan yang mudah terbakar seperti kayu, kertas dan plastik. Kebakaran jenis ini dapat dipadamkan dengan air atau pemadam kebakaran lainnya.
 - b. **Kebakaran B**, yaitu kebakaran yang diakibatkan oleh zat cair yang mudah terbakar seperti alkohol dan minyak tanah. Kebakaran jenis ini dapat dipadamkan dengan selimut, pemadam CO₂, pemadam serbuk seperti pasir. Tidak diperbolehkan memadamkan kebakaran ini dengan air.
 - c. **Kebakaran C**, kebakaran akibat arus listrik. Langkah yang dilakukan adalah memutuskan aliran listrik dan memadamkan kebakaran dengan pemadam jenis CO₂.
 - d. **Kebakaran D**, kebakaran akibat logam. Kebakaran ini dengan cara menghentikan ketersediaan bahan yang bereaksi dengan logam (oksigen), dapat dipadamkan dengan pemadam serbuk.

LAMBANG ZAT

Zat yang terdapat di laboratorium kimia sering disertai dengan lambang tertentu pada label/etiket kemasannya, terutama dimaksudkan pada bahaya atau akibat yang dapat ditimbulkan oleh zat yang bersangkutan. Beberapa lambang yang sering dijumpai pada berbagai macam kemasan zat adalah sebagai berikut:

 <p>E (explosive); dapat meledak</p>	 <p>F (highly flammable); mudah menyala/terbakar</p>
 <p>O (oxidant substance); pengoksidasi</p>	 <p>T (toxic); racun</p>
 <p>C (corrosive); korosif/dapat merusak jaringan hidup</p>	 <p>Lambang N (dangerous for the environment); berbahaya bagi beberapa komponen dalam lingkungan kehidupan</p>
 <p>Xi (irritant); berbahaya menyebabkan iritasi terhadap jaringan atau organ tubuh</p>	 <p>Xn (harmful); berbahaya dapat melukai jaringan atau organ tubuh</p>



A. Tujuan

1. Mengidentifikasi monosakarida, disakarida, dan polisakarida menggunakan reaksi warna,
2. Melakukan hidrolisis disakarida dan polisakarida serta mengidentifikasi monosakarida penyusunnya.

B. Teori Singkat

Karbohidrat adalah polihidroksi aldehida dan keton atau turunan dari keduanya. Karbohidrat secara umum mempunyai rumus empiris CH_2O ; misalnya glukosa dengan rumus molekul $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (enam kali CH_2O). Karbohidrat umumnya digolongkan menurut strukturnya yaitu monosakarida, oligosakarida dan polisakarida. Beberapa senyawa yang termasuk kelompok karbohidrat terbagi dalam 4 golongan, yaitu monosakarida, disakarida, oligosakarida, dan polisakarida.

Monosakarida adalah satuan karbohidrat sederhana yang tidak dapat dihidrolisis menjadi molekul karbohidrat yang lebih kecil. Contoh monosakarida yang lazim adalah; glukosa disebut juga gula darah (karena terdapat dalam darah), gula anggur (karena dijumpai dalam anggur) atau dektrosa (karena memutar bidang polarisasi ke kanan), fruktosa atau dikenal juga dengan nama levulosa (karena memutar bidang polarisasi ke kiri) dan galaktosa yang merupakan hasil hidrolisis dari laktosa.

Disakarida adalah karbohidrat yang terdiri dari dua unit berulang monosakarida yang dihubungkan oleh ikatan 1,4- α atau 1,4- β tergantung pada stereokimia pada karbon glikosidanya. Contoh: maltosa yang terdiri dari dua satuan D-glukopiranososa yang dihubungkan oleh ikatan glikosida 1,4- α selobiosa terdiri dari satuan D-glukopiranososa yang dihubungkan ikatan 1,4- β laktosa yang terdiri dari satu unit D-galaktopiranososa dan satu unit D-glukopiranososa yang dihubungkan dengan ikatan glikosida 1,4- β sukrosa terdiri dari satu unit D-glukopiranososa dan satu unit D-fruktopiranososa yang dihubungkan oleh ikatan glikosida 1,2- α .

Oligosakarida adalah karbohidrat yang terdiri dari 3 – 10 unit berulang monosakarida yang dihubungkan oleh ikatan glikosida. Contoh: rafinosa, yang terdiri dari 3 molekul monosakarida, yaitu galaktosa-glukosa-fruktosa. Polisakarida terdiri atas banyak satuan monosakarida yang dihubungkan oleh ikatan glikosida. Contohnya; selulosa, pati (amilum, amilopektin, dan glikogen) dan kitin.

Monosakarida dan beberapa disakarida mempunyai sifat dapat mereduksi, terutama dalam suasana basa. Sifat sebagai reduktor ini dapat digunakan untuk keperluan identifikasi karbohidrat maupun analisis kuantitatif. Sifat mereduksi ini disebabkan oleh adanya gugus aldehid

atau keton bebas dalam molekul karbohidrat. Sifat ini tampak pada reaksi reduksi ion-ion logam, misalnya ion Cu^{2+} dan ion Ag^+ yang terdapat pada pereaksi-pereaksi tertentu. Hidrolisis disakarida dan polisakarida akan menghasilkan monosakarida. Untuk menentukan hasil hidrolisis disakarida dan polisakarida menjadi monosakarida penyusunnya dapat dilakukan dengan mereaksikan disakarida dan polisakarida yang telah dihidrolisis dengan pereaksi-pereaksi yang digunakan dalam uji monosakarida. Jika bereaksi positif, maka akan menunjukkan jenis monosakarida penyusun disakarida dan polisakarida.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
- b. Pipet tetes
- c. Pipet volume
- d. Drop Plate
- e. Gelas kimia 250 ml
- f. Penangas air
- g. Bunsen

2. Bahan

- a. Sampel karbohidrat (glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, laktosa, amilum)
- b. Larutan α -naftol 2% (fresh)
- c. Pereaksi Selliwanoff
- d. Pereaksi Benedict
- e. Pereaksi Barfoed
- f. Larutan Iodium
- g. Larutan HCl 3%
- h. Larutan H_2SO_4 pekat

D. Prosedur Kerja

1. Uji Molisch :

- a. Masukkan 1 ml larutan sampel ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 1 tetes pereaksi Molisch (2% α -naftol dalam etanol 96%). Campur homogen.
- b. Tambahkan 1 mL H_2SO_4 pekat secara perlahan melalui dinding tabung.
- c. Adanya cincin ungu pada bidang batas menunjukkan adanya karbohidrat.

2. Uji Benedict :

- a. Sebanyak 5 ml pereaksi Benedict ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 8 tetes (0,5 ml) larutan sampel, kemudian vortex (campur homogen).
- b. Panaskan langsung selama 1 menit atau masukkan ke dalam penangas air mendidih selama 5 menit.
- c. Reaksi positif menunjukkan adanya gula reduksi bila terjadi endapan Cu_2O yang berwarna hijau/kuning/merah bata (tergantung konsentrasi gula reduksi).

3. Uji Selliwanoff :

- a. Masukkan 1 ml larutan sampel ke dalam 5 ml pereaksi, lalu tempatkan ke dalam air mendidih selama 10 menit.
- b. Adanya warna merah menunjukkan adanya ketosa.

4. Uji Barfoed:

- a. Tambahkan 5 ml pereaksi Barfoed ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 8 tetes ($\pm 0,5$ ml) sampel.
- b. Masukkan ke dalam penangas air mendidih selama 5 menit
- c. Reaksi positif mengandung monosakarida dan disakarida bila terjadi endapan Cu_2O yang berwarna hijau/kuning/merah bata (tergantung konsentrasi gula). Monosakarida menunjukkan hasil lebih cepat daripada disakarida.

5. Uji Iodium :

- a. Tambahkan 1 tetes larutan sampel ke dalam *drop plate* dan tambahkan 1 tetes larutan iodium. Adanya warna spesifik menunjukkan adanya polisakarida (warna biru-kehitaman menunjukkan amilum, merah-lembayung menunjukkan amilopektin, warna merah coklat menunjukkan dekstran dan glikogen).

6. Hidrolisis Disakarida

- a. Isi sebuah tabung reaksi dengan 5 mL larutan sukrosa dengan 1 tetes tymol biru sebagai indikator dan 1 atau 2 tetes asam klorida sampai tymol birunya menjadi merah muda.
- b. Bagilah larutan menjadi 2 bagian ke dalam 2 buah tabung reaksi, dididihkan selama 30 menit, lalu dinginkan dibawah air ledeng.
- c. Kedua tabung dinetralkan dengan natrium bikarbonat 2% sampai tymol biru menjadi biru kembali, satu tabung ditambahkan pereaksi Benedict dan tabung yang lainnya dengan pereaksi Seliwanoff, panaskan lalu amati apa yang terjadi.
- d. Ulangi percobaan di atas dengan mengganti larutan sukrosa dengan larutan maltosa dan laktosa

7. Hidrolisis polisakarida

a. Hidrolisis amilum :

- 1) Tambahkan 3 mL larutan pati 1% ke dalam tabung reaksi yang berisi 3 mL HCl, panaskan dalam penangas air.

2) Uji hidrolisis:

- a) Sebelum pemanasan larutan dalam tabung diambil 1 tetes dan diperiksa pada plat tetes dengan menambahkan 1 tetes iodium.
- b) Setelah 3 menit pemanasan, diambil 1 tetes dan diperiksa sama seperti di atas.

- c) Pengujian dilakukan setiap 3 menit sampai warna berubah menjadi coklat kekuningan (sama dengan warna iodium), maka hidrolisa dihentikan.
- d) Kemudian hidrosilat dibagi ke dalam 2 tabung reaksi yang masing-masing ditambah 1 mL NaOH 1M (sampai pH 7) lalu masing-masing ditambahkan pereaksi Benedict dan Seliwanoff, panaskan dan amati apa yang terjadi.

b. Hidrolisis selulosa:

- 1) Sepotong kertas saring dilarutkan dengan asam sulfat pekat dingin, caranya adalah membasahi kertas saring di dalam mortar dengan asam sulfat sampai semuanya larut (pemberian asam sulfat sedikit demi sedikit dan sampai melebihi dari yang dibutuhkan).
- 2) Lakukan sebagaimana hidrolisis amilum

E. Hasil Pengamatan

1. Identifikasi Karbohidrat

Tabel 1.1. Hasil identifikasi karbohidrat

No	Sampel	Pereaksi yang menunjukkan hasil positif	Kesimpulan
1	A		
2	B		
3	C		
4	D		
5	E		
6	F		
7	G		

2. Hidrolisa disakarida

Tabel 1.2. Hasil uji hidrolisis disakarida

No	Sampel	Hasil Tes Seliwanoff	Hasil Tes Benedict
1	Hidrolisat Sukrosa		
2	Hidrolisat Laktosa		
3	Hidrolisat Maltosa		

3. Hidrolisa polisakarida

a. Hidrolisis amilum :

Tabel 1.3. Hidrolisis amilum

No	Waktu Pemanasan (menit)	Hasil Tes Iodium
1	0	
2	3	
3	6	
4	9	
5	12	
...	...	

Tabel 1.4. Hasil uji hidrolisis amilum

No	Sampel	Hasil Tes Seliwanoff	Hasil Tes Benedict
1	Hidrosilat pati		

b. Hidrolisis selulosa :

Tabel 1.5. Hasil uji hidrolisis selulosa

No	Waktu Pemanasan (menit)	Hasil Tes Iodium
1	0	
2	3	
3	6	
4	9	
5	12	
...	...	

Tabel 1.6. Hasil uji hidrolisis selulosa

No	Sampel	Hasil Tes Seliwanoff	Hasil Tes Benedict
1	Hidrosilat selulosa		

4. Persamaan reaksi

...

A. Tujuan

Menentukan kadar karbohidrat secara kuantitatif dengan metode *Dinitrosalicylic acid* (DNS) dan Nelson-Somogyi.

B. Teori Singkat

Gula reduksi merupakan monosakarida/disakarida yang mengandung gugus aldehid atau keton bebas. DNS (*Dinitrosalicylic acid*) merupakan metode untuk menentukan gula reduksi dalam suatu bahan. Sampel gula pereduksi akan mengalami oksidasi sedangkan gugus NO₂ pada senyawa DNS mengalami reduksi. Metode Nelson-Somogyi juga merupakan salah satu metode penentuan gula pereduksi. Namun, dasar reaksi metode ini berbeda dengan DNS.

Analisa secara kuantitatif didasarkan pada hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa intensitas cahaya yang diserap berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa, atau dirumuskan: $A = \epsilon \times b \times c$, dengan ϵ adalah koefisien ekstingsi molar, b adalah tebal larutan (kuvet), c adalah konsentrasi larutan, dan A adalah absorban (Khopkar,1990).

Metode Nelson-Somogyi merupakan metode penetapan kadar gula pereduksi, dimana prinsipnya, gula pereduksi akan mereduksi ion Cu²⁺ menjadi Cu⁺, kemudian ion Cu⁺ akan mereduksi senyawa arsenomolibdat membentuk kompleks warna biru kehijauan (Nelson,1944; Sadasivam dan Manickam,1996). Metode Nelson-Somogyi lebih spesifik untuk menetapkan kadar gula pereduksi pada sampel yang memiliki senyawa gula campuran di dalamnya. Reaksi yang terjadi antara reagen Cu alkalis (Cu²⁺) spesifik dengan gula pereduksi menjadi Cu⁺ (endapan merah bata) kemudian ketika ditambahkan arsenomolibdat endapan tersebut akan larut dan membentuk kompleks $[AsMo_4VMo_8VIO_{40}]_7^-$ berwarna biru kehijauan (Cu⁺ diubah menjadi Cu²⁺). Gula-gula non pereduksi yang telah ada didalam sampel tidak mempengaruhi reaksi yang terjadi. Metode Nelson-Somogyi menyajikan presentase total karbohidrat didalam sampel (Kautsar,2011). Dilakukan pengukuran absorbansi pada $\lambda=540$ nm yang dinilai memberikan serapan optimal dari kompleks berwarna antara kuprooksida gula dan arsenomolybdate.

Reagen Nelson-Somogyi berfungsi sebagai oksidator antara kupri oksida yang bereaksi dengan gula pereduksi pada bahan dan memberuk endapan merah bata, merupakan pereaksi tembaga alkali yang mengandung Na₂PO₄ anhidrat dengan Kalium Natrium Tartrat (garam Rochelle). Pereaksi arsemonolybdate mengandung ammonium monolybdate H₂SO₄, NaHASO₄.7H₂O. kadar gula dapat ditentukan dengan mengukur serapan warna kompleks dan dibandingkan dengan standar (Fauzi,1994). Adaptasi reagen tembaga (1,2) Somogyi-Sheffer-Hartmann untuk penentuan glukosa digunakan untuk metode kolorimetrik dapat digunakan

dengan menghilangkan iodide dan iodat dalam persiapannya karena dapat mengganggu reagen warna monolibdat. KI menghambat autoreduksi tembaga karena tidak adanya hasil reagen yang tidak stabil. pereaksi mikro Somogyi yang digunakan dengan berbagai variasi reagen fosforolibdat, proporsitasitas yang baik dihasilkan pada kerapatan warna dan glukosa dari berbagai konsentrasi. Namun reagen fosfomolibdat yang tidak diinginkan banyak tertinggal dan tidak memiliki stabilitas warna yang diinginkan. Pengembangan reagen warna arsenomolibdat memberikan stabilitas dan produktifitas warna yang memuaskan sehingga memungkinkan untuk menggunakan reagen tembaga dalam prosedur fotometrik untuk secara praktek digunakan dalam prosedur titrimetric yang disesuaikan (Nelson,1944).

Metode alternatif yang dapat digunakan selain metode Nelson-Somogyi adalah metode DNS yang lebih sederhana, sensitif, dan dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah besar (Sadasivam dan Manickam, 1996). Prinsip metode ini adalah dalam suasana alkali gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) membentuk senyawa yang akan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm (Daud et al.,2012). Metode 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) melibatkan deteksi kolorimetri berdasarkan oksidasi gugus karbonil dan reaksi dengan molekul penyerap UV-Vis. Dalam reaksinya terjadi oksidasi gugus aldehid/keton dari gula pereduksi dan DNS tereduksi menjadi 3-amino-5-nitrotrisalicylic acid. Banyak reaksi sampingan (seperti dekomposisi gula yang bersaing dengan jumlah/ketersediaan DNS) yang bergantung pada karakter gula pereduksi, gula yang berbeda akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda, sehingga perlu dikalibrasi untuk tiap gula. Karena spesifitas rendah, harus ada blanko untuk hasilkan tes yang akurat dan tepat (Miller, 1959). Reagen DNS mengandung 1% DNS, 0.2% fenol, 0.05% Sodium bisulfit, dan 1% Sodium hidroksida. Fenol digunakan untuk meningkatkan warna yang dihasilkan, bisulfit untuk menstabilkan warna, dan alkali berperan dalam reaksi reduksi, penambahan NaOH digunakan untuk menciptakan suasana basa agar reaksi dapat terjadi.

Pemanasan sampel dengan reagen DNS hingga muncul warna merah kecoklatan dan didinginkan karena suhu dapat mempengaruhi absorbansi. Tanpa garam Rochelle yang ditambahkan setelah munculnya warna dan pendinginan, warna yang dihasilkan tidak akan stabil, selain itu juga berfungsi untuk mencegah reagen melarutkan O_2 . Absorbansi diukur pada λ 575 nm yang dinilai memberikan serapan paling maksimal untuk warna yang dihasilkan. Hilangnya karbohidrat dapat diatasi dengan sodium bisulfit dan garam Rochelle, konsentrasi sulfit yang ditambahkan jika kurang dari 0.05% menyebabkan kurva tidak linier namun jika berlebih dapat menyebabkan depresi intensitas warna. Kadar NaOH tinggi dapat berdampak pada hilangnya karbohidrat (Miller, 1959).

C. Alat dan Bahan

1. Alat :

- a. Gelas piala 50 mL, 100 mL, 500 mL
- b. Gelas ukur 25 mL, 50 ml
- c. Hotplate stirrer
- d. Pipet ukur 1 mL, 5 mL, 10 mL
- e. Tabung reaksi
- f. Waterbath
- g. Spektrofotometer
- h. Pipet volume 10 ml,
- i. Corong gelas
- j. Batang pengaduk
- k. Bola hisap
- l. Labu ukur 25 mL, 50 mL, 100 mL

2. Bahan :

- a. Sampel bahan makanan
- b. Larutan Standard glukosa
- c. Larutan K-Na-Tartrat 40%
- d. NaOH
- e. Akuades
- f. Sodium sulfit
- g. Larutan Nelson A
- h. Larutan Nelson B
- i. Reagen Arsenomolibdat

D. Prosedur Kerja

1. Persiapan sampel

- a. Timbang bahan padat yang sudah dihaluskan 1 gram atau bahan cair sebanyak 1 ml (tergantung kadar gula reduksinya), lalu masukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, dan tambahkan 50 mL HCl 3%, selanjutnya panaskan pada suhu 100°C selama 1 – 3 jam (tergantung kandungan polisakaridanya).
- b. Dinginkan suspensi, lalu netralkan dengan NaOH 45% (NaOH jenuh) menggunakan indikator PP, kemudian pindahkan ke dalam labu takar 100 mL secara kuantitatif dan tepatkan dengan akuades hingga tanda batas, lalu saring dengan kertas saring.

2. Penyiapan Kurva Standard Glukosa

- a. Buat larutan induk glukosa dengan konsentrasi 2 mg/mL dengan cara melarutkan 100 g glukosa ke dalam 40 mL akuades, lalu ditepatkan dengan akuades dalam labu ukur 50 mL.
- b. Buat seri konsentrasi larutan standar glukosa: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, dan 1,2 mg/mL.
- c. Buat kurva standar sesuai prosedur metode Nelson-Somogyi dan metode DNS.

3. Penetapan Kadar Gula Reduksi dengan Metode Nelson-Somogyi

- a. Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 1 mL reagen Nelson, dan kocok homogen.

- b. Panaskan dalam air mendidih selama 20 menit (hingga terbentuk endapan merah bata), lalu dinginkan dalam suhu ruang.
- c. Tambahkan 1 mL reagen arsenomolybdate dan amati absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.
- d. Siapkan blanko dengan mengganti larutan sampel dengan akuades dan lakukan prosedur yang sama seperti pada poin 3a s/d 3c.

4. Penetapan Kadar Gula Reduksi dengan Metode DNS

- a. Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 1 mL reagen DNS 1% dan tutup dengan aluminium foil.
- b. Panaskan selama 5–15 menit pada suhu 90°C (sampai terbentuk warna merah kecoklatan).
- c. Tambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40%.
- d. Tabung reaksi didinginkan hingga suhu ruang dan ditambah akuades hingga volumenya 10 mL lalu dihomogenkan.
- e. Amati absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.
- f. Siapkan blanko dengan mengganti larutan sampel dengan akuades dan lakukan prosedur yang sama seperti pada poin 4a s/d 4c.

E. Hasil Pengamatan

1. Kurva Standard Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi

Konsentrasi Glukosa (mg/mL)	Absorbansi (A_{540})
0,2	
0,4	
0,6	
0,8	
1,0	
1,2	

Buat persamaan regresi $y = a + bx$ dari data di atas dengan memasukkan konsentrasi glukosa sebagai nilai x dan absorbansi sebagai nilai y.

2. Kurva Standard Glukosa dengan Metode DNS

Konsentrasi Glukosa (mg/mL)	Absorbansi (A_{575})
0,2	
0,4	
0,6	
0,8	

1,0	
1,2	

Buat persamaan regresi $y = a + bx$ dari data di atas dengan memasukkan konsentrasi glukosa sebagai nilai x dan absorbansi sebagai nilai y .

3. Perhitungan Kadar Gula Reduksi dalam Sampel

Metode Pengujian	Faktor Pengenceran (FP) Sampel	Absorbansi
Nelson-Somogyi		
DNS		

Hitung kadar gula pereduksi dengan rumus berikut:

$$Konsentrasi(x) = \frac{Absorbansi(y) - a}{b} \times FP$$

Lipid



A. Tujuan

Mengetahui kualitas suatu sampel minyak/ lemak melalui penentuan angka peroksida dan angka asam

B. Teori Singkat

Secara umum diketahui bahwa minyak dan lemak dapat mengalami kerusakan selama penyimpanan. Terdapat 2 tipe kerusakan yang utama pada minyak dan lemak, yaitu ketengikan dan hidrolisis. Ketengikan terjadi akibat kerusakan autooksidasi dari minyak/ lemak tak jenuh yang menghasilkan komponen cita-rasa dan bau yang mudah menguap (*volatile*), sedangkan hidrolisis minyak dan lemak menghasilkan asam-asam lemak bebas akibat adanya air dalam minyak atau lemak atau karena aktivitas enzim. Angka peroksida dan asam lemak bebas (angka asam) merupakan parameter yang baik untuk menentukan kualitas minyak atau lemak selama penyimpanan. Nilai peroksida adalah ukuran konsentrasi peroksida dan hidroperoksida yang terbentuk pada tahap awal oksidasi lipid, sedangkan penentuan asam lemak bebas merupakan konsentrasi asam lemak bebas yang terbentuk akibat hidrolisis minyak atau lemak yang disebabkan oleh reaksi minyak atau lemak dengan air.

Beberapa faktor yang mempercepat kerusakan minyak atau lemak adalah adanya oksigen, paparan cahaya, kelembaban dan suhu tinggi. Proses autooksidasi lipid menghasilkan hidroperoksida yang dapat terurai lebih lanjut menjadi berbagai molekul yang lebih kecil seperti aldehida, keton, alcohol, dan asam karboksilat, yang dapat mempengaruhi cita rasa. Oksidasi lipid tidak hanya menghasilkan rasa tengik, tetapi juga dapat membahayakan kesehatan manusia. Uji ketengikan dilakukan untuk menentukan derajat ketengikan bahan makanan dengan mengukur senyawa-senyawa hasil oksidasi. Salah satunya adalah dengan menentukan bilangan peroksida. Bilangan peroksida merupakan nilai terpenting untuk mengetahui tingkat kerusakan yang terjadi pada minyak atau lemak. Peroksida terbentuk karena asam lemak tak jenuh dapat mengikat oksigen pada ikatan rangkapnya, yang dikenal dengan proses oksidasi. Bilangan peroksida adalah banyaknya meq oksigen aktif yang terdapat dalam 1000 gram minyak atau lemak. Jumlah oksigen aktif ini setara dengan jumlah iodin yang dibebaskan setelah minyak atau lemak ditambahkan larutan KI. Bilangan asam adalah jumlah mg KOH yang dibutuhkan untuk menetralkan 1 gram minyak atau lemak. Bilangan asam merupakan ukuran dari jumlah asam lemak bebas yang dihitung berdasarkan berat molekul dari asam lemak atau campuran asam lemak.

C. Alat dan Bahan

1. Alat :

- a. erlenmeyer 250 mL,
- b. buret 50 mL,
- c. pipet tetes
- d. pipet ukur 10 mL
- e. gelas ukur 50 mL

2. Bahan :

- a. Sampel minyak/lemak
- b. akuades,
- c. asam asetat,
- d. etanol
- e. kloroform
- f. larutan KI jenuh
- g. larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N
- h. indikator amilum 1%
- i. larutan KOH 0,1 N

D. Prosedur Kerja

1. Penentuan Angka Peroksida (SNI 7709:2012)

- a. Timbang 5 gram sampel minyak/lemak dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL.
- b. Tambahkan 30 mL larutan asam asetat:etanol:kloroform (100:125:275) dan gojok hingga larut.
- c. Tambahkan 0,5 mL larutan KI jenuh dan diamkan selama 1 menit sambil sesekali digoyang.
- d. Tambahkan 30 mL akuades dan titrasi dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N sampai warna kuning hampir hilang, lalu tambahkan 0,5 mL indikator amilum 1% dan lanjutkan titrasi sampai warna biru hilang.
- e. Catat volume titran ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) yang digunakan dan hitung angka peroksidanya.

2. Penentuan Asam Lemak Bebas/Bilangan Asam (SNI 7709:2012)

- a. Timbang 20 gram sampel minyak/lemak dan masukkan ke dalam erlenmeyer 250mL.
- b. Tambahkan 50 mL etanol netral hangat dan 3 tetes indikator PP.
- c. Titrasi dengan larutan 0,1 N KOH yang telah distandardisasi sampai warna merah jambu tercapai dan tidak hilang selama 30 detik.
- d. Catat volume KOH yang digunakan.
- e. Hitung asam lemak bebas (%) dan angka asam.

E. Hasil Pengamatan

1. Penentuan Angka Peroksida

Tabel 3.1. Penentuan angka peroksida

Ulangan	Berat sampel (g)	Volume titran (mL)
1		
2		
3		

Hitung angka peroksida dengan rumus berikut:

$$\text{BilanganPeroksida}(\text{meq.O}_2 / \text{kg}) = \frac{1000 \times N \times V}{\text{Beratsampel}(g)}$$

2. Penentuan Angka Asam (Asam Lemak Bebas, ALB)

Tabel 3.2. Penentuan angka asam

Ulangan	Volume sampel	Volume titran (KOH 0,1 N)
1		
2		
3		

Hitung angka asam dengan rumus berikut:

$$\% \text{ALB} = \frac{V.NaOH \times N.NaOH \times BM.AsamLemak}{\text{Beratsampel}(g) \times 1000} \times 100$$

$$\text{BilanganAsam} = \frac{V.KOH \times N.KOH \times BM.KOH}{\text{Beratsampel}(g)}$$

A. Tujuan

1. Menentukan kadar minyak/lemak dalam suatu bahan makanan dengan soxhlet
2. Melakukan ekstraksi dan pemisahan kolesterol dari suatu bahan dan menentukan kadarnya

B. Teori Singkat

Lemak adalah senyawa ester dari gliserol dan asam lemak. Lemak yang ada di dalam jaringan, baik hewan maupun tanaman, juga disertai dengan senyawa lain, seperti fosfolipid, sterol dan beberapa pigmen. Dalam analisis kadar lemak, seringkali disebut sebagai analisis “lemak kasar”, karena selain asam lemak terikut pula senyawa-senyawa lain.

Penentuan kadar minyak atau lemak suatu bahan dapat dilakukan dengan alat ekstraktor Soxhlet. Ekstraksi dengan alat Soxhlet merupakan cara ekstraksi yang efisien, karena pelarut yang digunakan dapat diperoleh kembali. Dalam penentuan kadar minyak atau lemak, bahan yang diuji harus cukup kering, karena jika masih basah selain memperlambat proses ekstraksi, air dapat turun ke dalam labu dan akan mempengaruhi dalam perhitungan (Ketaren, 1986).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| a. Alat Soxhlet, | i. gelas ukur, |
| b. timbangan analitik, | j. gunting, |
| c. oven, | k. spatula, |
| d. desikator, | l. rotary evaporator. |
| e. cruss tang, | |

2. Bahan

- | | |
|------------------|----------------------------------|
| a. Sampel | d. Petroleum eter atau n-heksana |
| b. Kertas saring | e. Natrium sulfat anhidrat |
| c. Benang | |

D. Prosedur Kerja

1. Penentuan Kadar Minyak/Lemak

- a. Timbang dengan teliti 20 gram bahan kering yang telah dihaluskan (diiris-iris sampai lembut dan diayak dengan ukuran 40 mesh).
- b. Bungkus dengan kertas saring bebas lemak, ujung atas maupun ujung bawah ditutup/diikat kuat dengan benang.
- c. Masukkan ke dalam labu Soxhlet. Tiap labu diisi 4 – 5 sampel. Rangkailah alat ekstraksi Soxhlet dengan lengkap dan taruh di atas penangas air.

- d. Tuangkan pelarut petroleum eter atau n-heksana melalui lubang pendingin sampai labu Soxhlet penuh dan cairan tersebut turun ke dalam labu penyari. Tambahkan lagi sampai labu Soxhlet terisi setengahnya.
- e. Lakukan ekstraksi selama 2 - 4 jam (proses ekstraksi selesai apabila pelarut sudah jernih). Matikan penangas air.
- f. Filtrat didestilasi biasa atau diuapkan dengan evaporator berputar sampai semua pelarut habis.
- g. Kadar minyak dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar minyak (\%)} = \frac{(B - A) \text{ (gr)}}{\text{berat bahan (gr)}} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat labu kosong (gr)

B = berat labu dan ekstrak minyak (gr)

Peringatan:

Pelarut-pelarut yang dipakai kebanyakan mudah terbakar, untuk itu harus hati-hati, jangan ada api bebas! Untuk semua pemanasan pakailah penangas air didih! Juga dalam penggunaan blender dengan pelarut-pelarut yang mudah terbakar harus hati-hati, sebab pelarut dapat merembes ke tempat motor dan menyebabkan nyala!

E. Hasil Pengamatan

Tabel 4.1. Hasil penentuan kadar minyak/lemak dalam bahan

Sampel	Berat labu+ekstrak minyak (gram)	Berat labu kosong (gram)	Berat minyak/lemak hasil ekstraksi (gram)	Kadar minyak/lemak (%)



A. Tujuan

1. Menguji adanya protein dalam sampel dengan pereaksi Biuret
2. Menguji adanya asam amino dalam sampel dengan pereaksi Ninhidrin
3. Menguji adanya asam amino yang mengandung gugus samping tertentu.

B. Teori Singkat

Protein merupakan senyawa yang tersusun atas rangkaian asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Ikatan peptide merupakan ciri khusus protein, sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan/kandungan protein pada suatu bahan. Adanya ikatan peptida dibuktikan dengan berbagai reaksi, salah satunya adalah biuret. Reaksi biuret adalah reaksi untuk protein dan intensitas warnanya tergantung pada banyaknya ikatan peptida.

Hidrolisis protein sempurna dengan asam, basa, atau enzim akan menghasilkan kurang lebih 20 jenis asam amino yang dapat dikelompokkan berdasarkan struktur kimianya, yaitu kelompok alifatik, hidrosiklik, asam, basa, aromatik heterosiklik dan asam imino. Reaksi umum untuk menunjukkan adanya asam amino dengan pereaksi ninhidrin. Berbagai Jenis asam amino dapat diidentifikasi dengan reaksi warna khusus, karena reaksi warna khusus ini positif untuk gugus tertentu pada rantai sampingnya (gugus R-nya), bukan untuk gugus karboksil atau aminanya.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Tabung reaksi
- b. Pipet tetes
- c. Penangas air

2. Bahan

- a. Sampel protein
- b. Sampel asam amino
- c. Akuades
- d. Pereaksi Ninhidrin 0,2% (fresh)
- e. Fenol 0,1%
- f. Asam nitrat pekat
- g. Larutan NaOH 40% dan 0,1 N
- h. Larutan Pb-asetat
- i. Kristal Pb
- j. Pereaksi Millon (15% larutan HgSO_4 dan 15% H_2SO_4)
- k. Pereaksi HgSO_4
- l. Larutan NaNO_3 1%
- m. Formaldehida dengan pengenceran 500x
- n. Larutan tembaga (II) sulfat 1%

D. Prosedur Kerja

1. Pengujian Umum Protein

- a. Siapkan 2 ml larutan sampel dalam tabung reaksi. Siapkan pula kontrol dengan menggunakan akuades.
- b. Tambahkan 5 tetes larutan CuSO_4 dan 2 ml NaOH 40%, lalu vortex dan amati terbentuknya warna violet.

2. Pengujian Umum Asam Amino

- a. Siapkan 1 ml larutan sampel dalam tabung reaksi. Siapkan pula kontrol dengan menggunakan akuades.
- b. Tambahkan 5 tetes larutan Ninhidrin dan didihkan selama 2 menit.
- c. Amati terbentuknya warna ungu/biru.

3. Pengujian Khusus Asam Amino dengan Reaksi Warna

a. Uji Xantoproteic

- 1) Siapkan 1 ml larutan sampel dalam tabung reaksi. Siapkan pula kontrol dengan menggunakan akuades.
- 2) Tambahkan 0,5 ml asam nitrat pekat (hati-hati), lalu didihkan dan amati terjadinya perubahan warna menjadi kuning.
- 3) Tambahkan 10 tetes NaOH 40% secukupnya untuk membuat larutan menjadi alkali. Perubahan warna kuning menjadi orange menunjukkan hasil positif.
- 4) Ulangi pekerjaan tersebut menggunakan fenol.

b. Uji Millon-Nasse

- 1) Siapkan 1 ml larutan sampel dalam tabung reaksi. Siapkan pula kontrol dengan menggunakan akuades.
- 2) Tambahkan 2 ml pereaksi Millon dan panaskan dalam air mendidih selama 10 menit.
- 3) Dinginkan pada suhu ruangan dan tambahkan 0,5 ml larutan NaNO_3 1%.
- 4) Amati terbentuknya warna merah bata.

c. Uji Reduksi Sulfur

- 1) Siapkan 1 ml larutan sampel dalam tabung reaksi. Siapkan pula kontrol dengan menggunakan akuades.
- 2) Tambahkan 0,5 ml NaOH 40%, lalu didihkan selama 2 menit, tambahkan sedikit kristal Pb
- 3) Amati terbentuknya warna coklat.

d. Uji Hopkins-Cole

- 1) Siapkan 1 ml larutan sampel dalam tabung reaksi. Siapkan pula kontrol dengan menggunakan akuades.

- 2) Tambahkan 1 tetes larutan formaldehid encer, dan 1 tetes pereaksi HgSO_4 , lalu campur homogen.
- 3) Tambahkan perlahan-lahan 1 ml H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung yang dimiringkan sehingga terjadi 2 lapisan, terbentuk lingkaran ungu di bidang batas. Jika digojog seluruh larutan berwarna ungu.

E. Hasil pengamatan

1. Pengujian Umum Protein

Tabel 5.1. Hasil Uji Umum Protein

No	Sampel Protein	Hasil
1		
2		
3		
4		
5		
6		

2. Pengujian Umum Asam Amino

Tabel 5.2. Hasil Uji Umum Asam Amino

No	Sampel Asam Amino	Hasil
1		
2		
3		
4		
5		
6		

3. Pengujian Khusus Asam Amino dengan Reaksi Warna

Tabel 5.2. Hasil Uji Umum Asam Amino

No	Sampel Asam Amino	Jenis Reaksi Uji	Hasil
1			
2			
3			
4			
5			
6			

A. Tujuan

Menentukan kadar protein dalam suatu bahan dengan metode Biuret

B. Teori Singkat

Analisis kuantitatif protein dan asam amino dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya adalah dengan cara volumetri dan spektrofotometri. Penentuan kadar protein secara spektrofotometri hanya dapat digunakan untuk protein terlarut dan sebagai pembanding digunakan bovine serum albumin (BSA) karena memberikan reproduibilitas yang tinggi. Protein dapat ditetapkan kadarnya secara spektrofotometri sinar tampak (visible) dengan penambahan pereaksi tertentu, seperti pereaksi Biuret. Penetapan kadar protein dengan metode Biuret didasarkan pada kenyataan bahwa 2 atau lebih ikatan peptide dapat berikatan secara kovalen koordinasi dengan ion Cu^{2+} dari tembaga (II) sulfat yang berasal dari pereaksi Biuret dalam suasana alkalis. Ion Cu^{2+} ini berikatan dengan 2 atom nitrogen dan 2 atom oksigen dari 2 ikatan peptide membentuk senyawa kompleks yang berwarna ungu yang dapat diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 550 nm.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Spektrofotometer
- b. Sentrifuga
- c. Mikropipet
- d. Tabung reaksi
- e. Kuvet

2. Bahan

- a. Sampel yang mengandung protein
- b. Akuades
- c. Larutan standar *Bovine Serum Albumine* (BSA)
- d. Pereaksi Biuret
- e. Buffer asetat pH = 5
- f. Amonium sulfat
- g. *Microtube*

D. Prosedur Kerja

1. Pembuatan larutan induk BSA

Timbang sebanyak 1,5 mg bovin serum albumin (BSA) dengan teliti dan larutkan dalam akuades sampai 1 ml sehingga kadar larutan induk sebesar 1,5 mg/mL.

2. Pembuatan kurva standar protein

Buat larutan standar protein (BSA) dengan variasi konsentrasi: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, dan 1,2 mg/mL. Ke dalam masing-masing tabung reaksi, masukkan 1 ml larutan standar protein untuk masing-masing konsentrasi, dan tambahkan 4 ml pereaksi Biuret dan 5 ml akuades. Setelah didiamkan selama 10 menit, baca absorbansinya pada $\lambda = 550$ nm terhadap blanko yang terdiri atas 4 ml Pereaksi Biuret dan 6 ml akuades.

3. Penyiapan larutan sampel

Ambil sejumlah tertentu sampel protein yang terlarut, lalu endapkan dahulu dengan penambahan amonium sulfat kristal (jumlah tergantung dari jenis proteinnya, kalau perlu sampai mendekati kejenuhan amonium sulfat dalam larutan). Protein yang mengendap dipisahkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit, lalu beningannya dipisahkan. Endapan yang merupakan protein dilarutkan kembali dengan buffer asam asetat pH = 5.

4. Penentuan kadar protein dalam sampel

Sebanyak 1 ml larutan sampel diambil secara kuantitatif dan ditambahkan 5 mL pereaksi Biuret. Homogenkan dan inkubasi pada 37°C selama 10 menit. Baca absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Blanko yang terdiri atas pereaksi Biuret dan akuades disiapkan dengan cara yang sama. Perhatikan adanya faktor pengenceran dan absorbansi sampel sedapat mungkin harus masuk dalam kisaran absorbansi kurva standar.

E. Hasil pengamatan

1. Pembuatan Kurva Standar Protein

Tabel 6.1. Absorbansi kurva standar

No.	Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
1		
2		
3		
4		
5		
6		

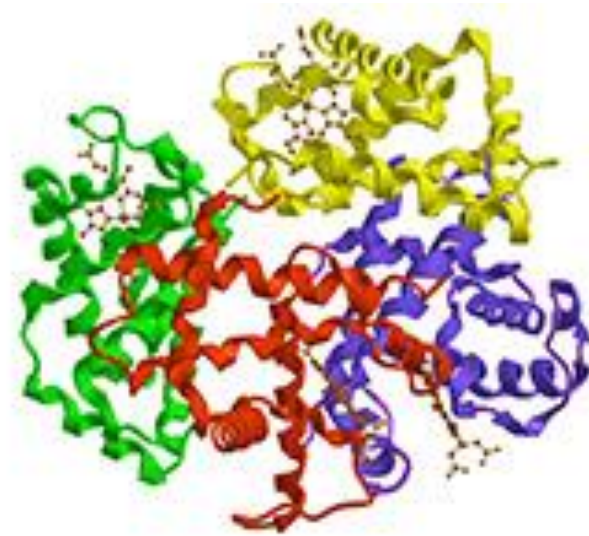
Buat kurva standar dan persamaan regresi linier $y = bx + a$

2. Penentuan Kadar Protein Sampel

Tabel 6.2. Absorbansi sampel

Ulangan	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel
1		
2		
3		

Hitung kadar protein menggunakan persamaan regresi linier.



A. Tujuan

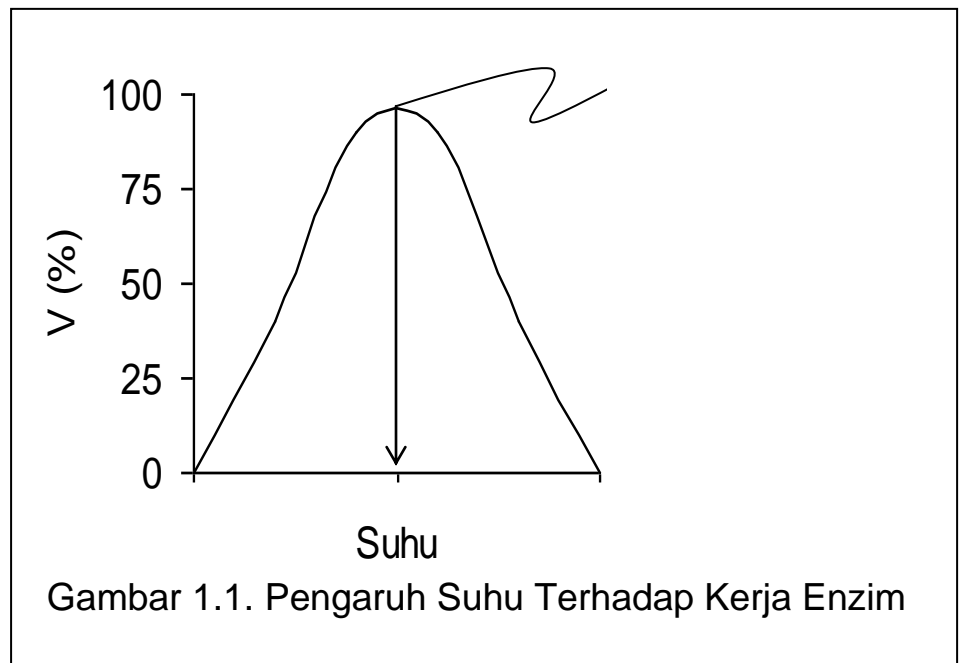
Mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim.

B. Teori Singkat

Enzim adalah kelompok protein yang berfungsi sebagai katalisator untuk berbagai reaksi kimia dalam sistem biologis. Hampir tiap reaksi kimia dalam sistem biologis dikatalis oleh enzim. Sintesis enzim terjadi di dalam sel dan sebagian besar enzim dapat diekstraksi dari sel tanpa merusak fungsinya. Seperti molekul protein lainnya sifat biologis enzim sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor fisiko-kimia. Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim antara lain; suhu, pH, konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat. Disamping itu kecepatan reaksi enzim dipengaruhi pula oleh penyinaran ultra violet, sinar alfa, beta dan gamma.

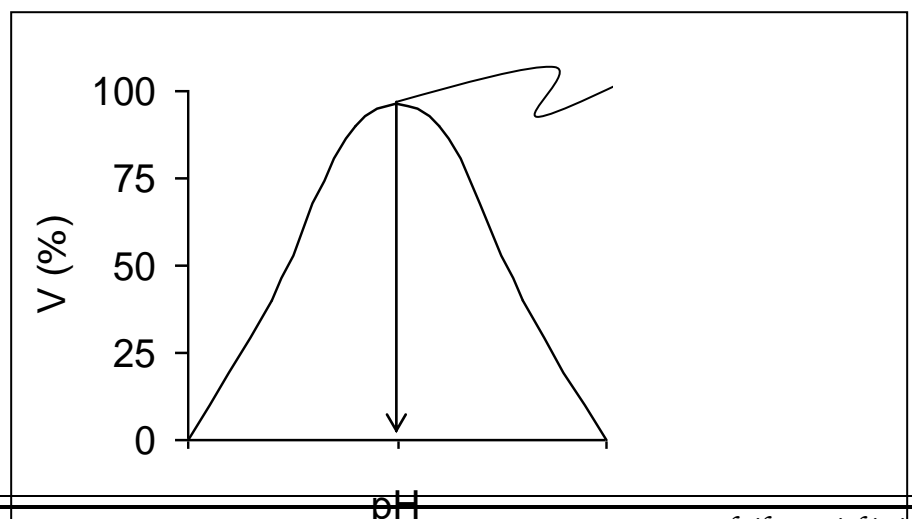
1. Pengaruh suhu

Pengaruh suhu terhadap enzim ternyata sangat kompleks, jika suhu dinaikkan (dalam batas tertentu) dapat mempercepat pemecahan atau meningkatkan keaktifan enzimnya. Jika suhu dinaikkan terus maka keaktifan enzim akan berkurang sampai

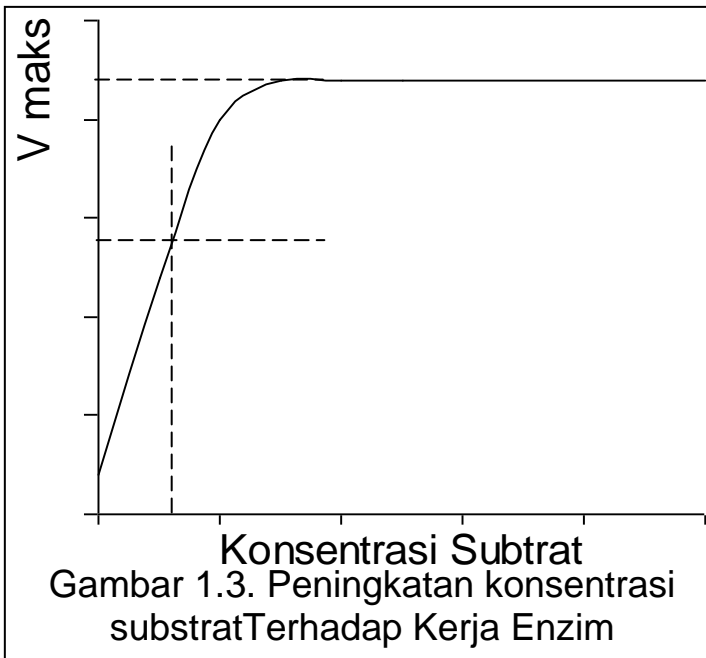


reaksinya praktis berhenti sama sekali karena terjadi perusakan enzim akibat denaturasi. Aktivasi enzim akan mencapai puncaknya pada suhu tertentu yang disebut sebagai suhu optimum. Hubungan antara suhu lingkungan dan aktivitas enzim dapat dilihat pada gambar di atas.

2. Pengaruh pH



Pada umumnya enzim bersifat amfoter, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam (karboksilat) dan gugus basa (amina). Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat, atau kompleks enzim substrat. Kecepatan reaksi enzimatik akan mencapai puncaknya pada pH yang disebut pH optimum. pH optimum dari suatu enzim (yang sama) berbeda-beda tergantung substratnya, dan pada substrat yang sama pH optimum dipengaruhi oleh tipe "essay" yang digunakan. Pada pH yang jauh di luar pH optimum maka kecepatan reaksi enzimatiknya menurun karena enzim mengalami denaturasi.



3. Peningkatan konsentrasi enzim

Peningkatan konsentrasi enzim yang akan meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Pada kondisi tertentu kecepatan reaksi enzimatik (V) berbanding lurus dengan konsentrasi enzim ($[E]$). Keadaan ini dapat dilihat pada gambar di samping.

Kecepatan enzim mula-mula meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim dan akan mencapai puncaknya pada konsentrasi tertentu yang disebut sebagai konsentrasi enzim optimum.

Kemudian penambahan konsentrasi enzim selanjutnya setelah melampaui keadaan optimum tidak akan berpengaruh lagi terhadap kecepatan reaksi enzimatik dan kecepatannya cenderung konstan.

4. Pengaruh konsentrasi substrat

Pada suatu reaksi enzimatik bila konsentrasi substrat diperbesar, sedangkan kondisi lainnya tetap, maka kecepatan reaksi (V) akan meningkat sampai batas kecepatan maksimum (V). Pada titik maksimum ini enzim telah jenuh dengan kompleks enzim substrat $[ES]$, kompleks ini akan terurai menjadi $[E]$ dan produk $[P]$. makin banyak kompleks $[ES]$ yang terbentuk, makin cepat reaksi berlangsung sampai batas kejenuhan $[ES]$. Pada konsentrasi substrat $[S]$ melampaui batas kejenuhan kecepatan reaksi akan konstan. Pada keadaan tersebut seluruh enzim sudah berada dalam bentuk kompleks E-S. Sehingga penambahan jumlah substrat tidak akan menambah jumlah kompleks E-S.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Bola isap,

- b. Botol semprot,
- c. Gelas kimia 100 mL,
- d. Gelas kimia 600 mL,
- e. Gelas ukur 10 mL,
- f. Inkubator,
- g. Labu takar 100 mL,
- h. Penangas air,
- i. Pipet gondok 1 mL,
- j. Pipet skala 5 mL,
- k. Pipet skala 10 mL,
- l. Rak tabung reaksi,
- m. Spektrofotometer,
- n. Stop watch, dan
- o. Tabung reaksi

2. Bahan

- a. Enzim amylase (liur),
- b. Larutan iodium 0,1 N, dan
- c. Larutan pati 0,4 mg/mL
- d. Buffer sitrat-fosfat pH 1, 7, dan 9
- e. Akuades
- f. Es batu

D. Prosedur Kerja

1. Pengaruh suhu

- a. Encerkan liur 10 kali dengan air suling
- b. Siapkan enam pasang tabung reaksi yang bersih dan masing-masing tabung reaksi diberi label B (blanko) dan label U (uji).
- c. Pasangan tabung reaksi yang pertama ditempatkan dalam bejana berisi air es (0°C).
- d. Pasangan tabung reaksi yang kedua ditempatkan dalam bejana yang berisi air, yang suhunya kira-kira 25°C .
- e. Pasangan tabung yang ketiga ditempatkan pada rak tabung pada suhu 37°C .
- f. Pasangan tabung yang keempat ditempatkan dalam inkubator yang suhunya dipertahankan 60°C .
- g. Pasangan tabung yang kelima ditempatkan dalam penangas air yang mendidih pada suhu 100°C .
- h. Keenam pasangan tabung pada setiap suhu perlakuan selama 5 menit.

- i. Pipetkan 1 mL larutan pati ke dalam tiap-tiap tabung, kemudian inkubasi kembali selama 5 menit.

Tabel 7.1. Penambahan pereaksi pada uji pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

Larutan	Tabung B	Tabung U
Larutan pati	1 mL	1 mL
Inkubasi selama 5 menit		
Liur (yang telah diencerkan 10x)	-	0,25 mL
Campurkan baik-baik, inkubasi selama 1 menit		
Larutan iodium (untuk suhu 60°C dan 100°C dilakukan di luar penangas)	1 mL	1 mL
Air suling	8 mL	8 mL

- j. Ukur serapan (A) pada panjang gelombang 680 nm. Hitung selisih serapan (ΔA) antara tabung B (A pada $t = 0$ menit) dengan tabung U dari tiap suhu pengamatan.
- k. Buat tabel berikut:

Tabel 7.2. Absorbansi sampel dan blanko pada berbagai suhu

Suhu (°C)	A_{blanko}	A_{uji}	$\Delta A/\text{menit (V)}$
0			
25			
37			
60			
100			

- l. buatlah kurva yang menggambarkan hubungan kecepatan reaksi enzimatik ($V = (\Delta A/\text{menit})$) dengan suhu.

2. Pengaruh pH

- a. Siapkan 5 pasang tabung reaksi yang bersih, tiap pasang tabung diberi label B (blanko) dan U (uji)
- b. Pipetkan dalam tiap-tiap tabung

Tabel 7.3. Penambahan pereaksi pada uji pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Larutan	Tabung B	Tabung U
Larutan pati dalam berbagai pH	1 mL	1 mL
Inkubasi pada suhu 30°C selama 5 menit		
Liur (yang telah diencerkan 10x)	-	0,25 mL
Campurkan baik-baik, inkubasi selama 1 menit		
Larutan iodium	1 mL	1 mL
Air suling	8 mL	8 mL

- c. Segera ukur serapan (A) pada 680 nm. Hitung selisih serapan (ΔA) antara tabung B (serapan pada $t=0$ menit) dengan tabung U.
- d. Buatlah tabel berikut:

Tabel 7.4. Absorbansi sampel dan blanko pada berbagai pH

pH	A_{blanko}	A_{uji}	$\Delta A/\text{menit (V)}$
1			
3			
5			

7			
10			

- e. Buatlah kurva yang menggambarkan hubungan kecepatan reaksi enzimatik ($V = \Delta A / \text{menit}$) dengan pH.

3. Pengaruh konsentrasi enzim

- Encerkan liur 20x, 40x, 60x, 80x, 100x dengan air suling.
- Siapkan 5 pasang tabung reaksi yang bersih, tiap pasang tabung diberi label B (blanko) dan U (uji).
- Pipetkan ke dalam tiap-tiap tabung

Tabel 7.5. Penambahan pereaksi pada uji pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim

Larutan	Tabung B	Tabung U
Larutan pati	1 mL	1 mL
Keram pada suhu 37°C selama 5 menit		
Liur (yang telah diencerkan 20x – 100x)	-	0,25 mL
Campurkan baik-baik, diamkan selama 1 menit		
Larutan iodium	1 mL	1 mL
Air suling	8 mL	8 mL

- Segera ukur serapan (A) pada 680 nm. Hitung selisih serapan (ΔA) antara tabung B (serapan pada $t = 0$ menit) dengan tabung U dari tiap pengenceran enzim.
- Buatlah tabel berikut:

Tabel 7.6. Absorbansi sampel dan blanko pada berbagai konsentrasi enzim

Pengenceran enzim	A_{blanko}	A_{uji}	$\Delta A / \text{menit (V)}$
20 x			
40 x			
60 x			
80 x			
100 x			

- Buatlah kurva yang menggambarkan hubungan kecepatan reaksi enzimatik ($V = \Delta A / \text{menit}$) dengan konsentrasi atau pengenceran enzim)

E. Hasil Pengamatan

- Buatlah tabel pengamatan sebagaimana terdapat dalam prosedur kerja
- Lakukan perhitungan
- Buatlah grafik untuk masing-masing perlakuan

Pembuatan beberapa pereaksi khusus

- a. **Pereaksi Molisch**, larutkan 12,5 gram alfa-naftol dalam alkohol 95%, sampai volumenya 250 mL. Pereaksi dibuat baru setiap kali digunakan.
- b. **Pereaksi Barfoed**, larutkan 13,3 gram kristal tembaga asetat dalam 200 mL aquades, saring bila perlu. Tambahkan 1,9 mL asam asetat glasial. Pereaksi dibuat baru setiap kali digunakan.
- c. **Pereaksi Seliwanoff**, campurkan 3,5 mL resorsinol 0,5% dengan 12 mL HCl pekat, kemudian encerkan dengan aquades menjadi 35 mL.
- d. **Pereaksi Benedict**, larutkan 173 gram kristal natrium sitrat dan 100 gram natrium karbonat anhidrat dalam aquades \pm 800 mL. Aduk, dan saring. Ke dalamnya tambahkan 17,3 gram tembaga sulfat yang telah dilarutkan dalam 100 mL aquades. Buat volume total 1000 mL dengan menambahkan aquades.
- e. **Pereaksi Biuret**, larutkan 150 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 600 mg $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dalam 50 ml akuades dalam labu takar 100 ml. Larutan ditambah 30 ml NaOH 10% sambil dikocok-kocok dan ditambah akuades hingga tanda batas.
- f. **Pereaksi DNS (Dinitrosalysilic Acid)**, 1 g DNS dan 1 g NaOH dilarutkan dalam 50 mL akuades, lalu tambahkan 10 mL NaSO_3 0,5%, 10 mL Fenol 2%. Aduk dengan magnetic stirrer hingga larut sempurna, lalu tepatkan campuran dengan akuades hingga 100 mL dalam labu ukur. Simpan dalam botol gelap.
- g. **Pereaksi Nelson-Somogyi**, reagensia Nelson dibuat dengan mencampurkan 4 bagian reagen Nelson A dan 1 bagian reagen Nelson B. Pencampuran dilakukan pada setiap hari akan digunakan (fresh). **Reagen Nelson A:** 2,4 g Natrium karbonat anhidrat, 1,2 g garam Rochelle, 1,6 g Na-bikarbonat dan 14,4 g Na_2SO_4 anhidrat dilarutkan dalam 80 mL akuades hingga homogen dengan pemanasan. **Reagen Nelson B:** 2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 18 g Na_2SO_4 anhidrat dilarutkan dalam 100 mL akuades hingga homogen dan tambahkan 1-2 tetes asam sulfat pekat.
- h. **Larutan Arsenomolybdate**, 12,5 g ammonium molybdat dilarutkan dalam 200 mL akuades dan tambahkan 10,5 mL asam sulfat pekat. Larutkan pada tempat yang lain 1,5 g $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 12,5 mL akuades, lalu tuangkan larutan ini ke dalam larutan ammonium molybdat dan tambahkan akuades hingga volumenya 250 mL. Simpan ke dalam botol gelap dan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam atau pada suhu kamar selama 72 jam. Reagensia ini baru bisa digunakan setelah masa inkubasi tersebut. Simpan reagen ini dalam lemari es dan dalam botol coklat.

- i. **Larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N**, timbang sebanyak 25 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,3 g Na_2CO_3 , lalu larutkan dengan akuades dan tepatkan hingga 1 L menggunakan labu ukur. Larutan ini kemudian distandardisasi menggunakan larutan KIO_3 .
- j. **Larutan Iodium**, larutkan 1 g KI dalam 100 mL akuades, lalu tambahkan 0,25 g padatan I_2 dan aduk homogen.
- k. **Larutan amilum 1%**, 1 g amilum (kanji) disuspensikan dalam 5 mL akuades, lalu dimasukkan ke dalam 95 mL akuades mendidih dan aduk terus warna menjadi bening.
- l. **Buffer sitrat-fosfat pH 3,0 – 7,0**, buat larutan induk (*stock solution*) Na_2HPO_4 0,2 M dan asam sitrat 0,1 M. Untuk membuat 100 mL larutan buffer sitrat-fosfat, campurkan kedua larutan induk, sebagai berikut:

ml. Na_2HPO_4 0,2 M	ml. asam sitrat 0,1 M	pH
10,2	39,8	3,0
19,3	30,7	4,0
25,7	24,3	5,0
32,1	17,9	6,0
43,6	6,5	7,0

- m. **Buffer Glisin-NaOH**, buat larutan induk (*stock solution*) glisin 0,2M dan NaOH 0,2 M. Campurkan 25 mL glisin 0,2 M dengan x mL NaOH 0,2 M dan tepatkan dengan akuades hingga 100 mL.

ml. NaOH 0,2 M	pH
4,4	9,0
19,3	10,4

- n. **Buffer Glisin-HCl pH 2,2**, buat larutan induk (*stock solution*) glisin 0,2M dan HCl 0,2 M. Campurkan 25 mL glisin 0,2 M dengan 4,4 mL HCl 0,2 M dan tepatkan dengan akuades hingga 100 mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Fauzi, M. 1994. Analisa Hasil Pangan. Jember: UNEJ.
- Ketaren, S. (1986). *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI-Press.
- Khopkar, S.M. 1990. Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chem.* 31(3),426-428.
- Mulyono, 2005, *Membuat Reagen Kimia di Laboratorium*, PT.Bumi Aksara, Jakarta.
- Nelson, N., 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *Journal Biol. Chem*, 153(2), 375-379.
- Poedjadi, A, 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Pramarsh. 2008. Test for cholesterol. http://www.planetayurveda.com/cholesterol_remedies.html. [1 Desember 2008].
- Rohman, A dan Sumantri, 2007, *Analisis Makanan*, UGM Press, Yogyakarta.
- Sadasivam, S., dan A. Manickam. 1996. *Biochemical Methods*, 2nd Edition. New Delhi: New Age International Limited.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi, 1984, *Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Penerbit Liberty, Yogyakarta.

