



Universitas Negeri
Jakarta

PETUNJUK PRAKTIKUM BIOKIMIA

TIM BIOKIMIA

LABORATORIUM KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA

PETUNJUK PRAKTIKUM

BIOKIMIA



OLEH:

TIM BIOKIMIA

**LABORATORIUM KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA**

2022



KATA PENGANTAR

Penulis mengucapkan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas tersusunnya Buku Petunjuk Praktikum Biokimia untuk lingkungan Program Studi Kimia dan Pendidikan Kimia FMIPA UNJ. Buku petunjuk ini merupakan hasil pemutakhiran dari buku petunjuk praktikum yang telah ada sebelumnya dan disesuaikan dengan kurikulum terbaru Program Studi Kimia dan Pendidikan Kimia FMIPA UNJ. Prosedur eksperimen yang terdapat dalam buku petunjuk ini mengintegrasikan mata kuliah rumpun Biokimia. Integrasi antar mata kuliah yang disusun dalam protokol eksperimen ini bermanfaat untuk mempersiapkan keterampilan mahasiswa terkait metodologi penelitian biokimia untuk pelaksanaan penelitian Tugas Akhir.

Pembaruan buku petunjuk praktikum ini juga dilakukan dengan berorientasi pada prinsip-prinsip *Green Chemistry*. Prosedur eksperimen dirancang agar menghasilkan limbah/bahaya sekecil-kecilnya, produk sebanyak-banyaknya, serta menggunakan energi dan biaya serendah-rendahnya namun tidak menghilangkan substansi esensial mata kuliah serta keterampilan dasar laboratorium yang perlu dimiliki oleh mahasiswa. Hal ini pun sangat mendukung visi-misi Program Studi Kimia dan Pendidikan Kimia untuk menjadi program studi yang berwawasan lingkungan.

Terakhir, penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan moril, materil, dan waktunya dalam penyusunan Buku Petunjuk Praktikum Biokimia ini. Semoga penyusunan buku petunjuk praktikum ini dapat menjadi salah satu bentuk upaya mempersiapkan generasi masa depan yang kompetitif pada tataran global, adaptif, dan religius.

Jakarta, Juli 2022

Penulis



**TATA TERTIB PRAKTIKUM
LABORATORIUM BIOKIMIA
FMIPA UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA**

A. Bila hendak praktikum, praktikan diwajibkan:

1. Mahasiswa telah mendaftar praktikum pada tautan berikut:
<https://fmipa.unj.ac.id/simak/>
2. Mahasiswa telah mengetahui K3 Laboratorium pada tautan berikut:
<https://youtu.be/Litx0KlbnYE>
3. Datang tepat waktu. Keterlambatan 15 menit tanpa alasan yang sah dianggap tidak hadir dan tidak diizinkan mengikuti praktikum.
4. Menyiapkan laporan awal, bagan prosedur percobaan dan laporan praktikum.
5. Menyimpan tas pada tempat yang telah disediakan.
6. Mengisi form kehadiran tiap kali mengikuti praktikum.
7. Membawa alat-alat yang diperlukan selama praktikum berlangsung (handuk kecil, untuk lap, gunting, lem, korek api, sabun cuci tangan).
8. Meminjam dan memeriksa ulang alat kaca yang diperlukan selama praktikum kepada laboran, jika terdapat ketidaklengkapan atau kerusakan, maka praktikan diberikan waktu 15 menit untuk menukarinya.

B. Selama praktikum berlangsung, praktikan diwajibkan:

1. Berpakaian sopan, memakai jas laboratorium, dan sepatu tertutup.
2. Tidak makan, minum, dan merokok di dalam laboratorium.
3. Tidak bercanda dan bertindak yang dapat menimbulkan kecelakaan terhadap orang lain.
4. Tidak mereaksikan sembarang bahan kimia tanpa ada petunjuk praktikum yang jelas dan tanpa izin dari dosen dan asisten dosen.
5. Tidak membuang sampah atau bahan sisa percobaan ke dalam wastafel.
6. Menjaga kebersihan, ketertiban, dan keamanan laboratorium secara bersama.

C. Setelah praktikum selesai, praktikan diwajibkan:

1. Mencuci dan membersihkan semua alat kaca yang digunakan selama praktikum dengan sabun cair/tepol yang telah disediakan.
2. Memeriksa kembali kelengkapan dan keutuhan alat yang dipinjam kemudian mengembalikannya kepada laboran.
3. Membersihkan meja praktikum masing-masing tanpa mengandalkan mahasiswa yang piket.
4. Lapor diri apabila selama praktikum memecahkan alat kaca.



5. Menyerahkan data/laporan sementara kepada asisten dosen untuk di paraf oleh dosen pembimbing.
6. Meninggalkan laboratorium dengan izin dosen pembimbing atau asisten dosen.

Jakarta, Juli 2022

Kepala Laboratorium Pendidikan Kimia,

Dr. Moersilah, M.Si

NIP. 19580523 199703 2 001



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	ii
TATA TERTIB PRAKTIKUM.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
PROTEIN.....	1
A. Uji Kualitatif Protein.....	1
B. Uji Kuantitatif Protein.....	5
KARBOHIDRAT.....	7
A. Uji Kualitatif Karbohidrat.....	7
B. Uji Kuantitatif Karbohidrat.....	11
LIPID.....	14
A. Uji Kualitatif Lipid.....	14
B. Uji Kuantitatif Lipid.....	21
METABOLISME KARBOHIDRAT.....	24
METABOLISME PROTEIN.....	27
METABOLISME LIPID.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	34



PROTEIN

A. Uji Kualitatif Protein

I. TUJUAN

1. Mengetahui cara mengidentifikasi protein dengan memanfaatkan ikatan peptida dengan uji kualitatif.
2. Mengamati pengaruh perubahan fisik seperti suhu, pH serta zat-zat kimia terhadap struktur protein.

II. TEORI SINGKAT

Protein terdiri dari berbagai macam asam amino yang berikatan satu sama lain melalui ikatan peptida. Setiap protein berbeda baik dalam jumlah dan jenis asam amino penyusunnya, maka setiap protein mempunyai sifat fisika dan kimia yang semuanya hampir berbeda kecuali dalam hal tertentu.

Protein memegang peranan yang sangat penting dalam berbagai aspek kehidupan, sehingga perlu dilakukan berbagai macam percobaan yang menyangkut protein antara lain: isolasi protein dan penentuan beberapa sifat protein di dalam sampel tertentu dengan menggunakan berbagai macam prosedur yang satu sama lainnya berbeda prinsip.

III. PROSEDUR KERJA

1. Pengendapan dengan Logam

Penambahan garam, asam, basa, logam dan pelarut lain dapat mempengaruhi larutan protein dalam air. Adanya perbedaan kelarutan dapat disebabkan oleh terbentuknya suatu senyawa kompleks yang tidak larut di dalam air, berubahnya struktur protein sehingga mempengaruhi kelarutannya, atau adanya perbedaan sifat dan pelarut lain yang ditambahkan.

Prosedur:

1. Siapkan 5 tabung reaksi dan lakukan percobaan dengan mengikuti petunjuk pada tabel 1.
2. Amati yang terjadi, bila ada endapan, dipisahkan dan dilarutkan kembali dalam air. Amati yang terjadi.
3. Bila ada protein yang larut kembali, lakukan tes dengan pereaksi Biuret.

**Tabel 1. Pengendapan Protein**

Nomor Tabung reaksi	1	2	3	4	5
Larutan protein di encerkan 1:4 (mL)	3	3	3	3	3
HgCl ₂ 0,2 M (tetes)	-	5	-	-	-
Pb(Ac) ₂ 0,2 M (tetes)	-	-	5	-	-
Asam pikrat jenuh (tetes)	-	-	-	5	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ jenuh (mL)	-	-	-	-	2
H ₂ O (mL)	1	-	-	-	-

Pertanyaan:

1. Jelaskan hasil-hasil dari pengamatan diatas!
2. Terangkan mengapa putih telur digunakan sebagai penawar pada keracunan Pb dan Hg!

2. Pengendapan dengan Garam

Apabila terdapat garam-garam anorganik dalam konsentrasi tinggi dalam larutan protein, maka kelarutan protein akan berkurang sehingga mengakibatkan pengendapan protein tersebut. Teori menyebutkan bahwa sifat ini terjadi karena kemampuan ion garam untuk terhidrasi sehingga bersaing dengan molekul protein untuk mengikat air.

Reagen dan Bahan:

Reagen Millon: Larutan merkuri dan ion mercuro dalam asam nitrat dan asam nitrit.

Reagen Biuret: Tambahkan 1 mL NaOH 2,5 N ke dalam 3 mL larutan protein dan aduk. Tambahkan pula setetes CuSO₄ 0,01 M. Aduk, jika timbul warna, tambahkan lagi setetes atau 2 tetes larutan CuSO₄.

Larutan Protein

Larutan (NH₄)₂SO₄

Prosedur:

1. Cara menjenuhkan 10 mL larutan protein dengan ammonium sulfat: tambahkan sedikit garam kedalam larutan protein, aduk hingga melarut. Tambahkan lagi sedikit ammonium sulfat dan aduk lagi, lakukan terus sehingga sedikit garam tertinggal tidak terlarut.
2. Setelah larutan jenuh, kemudian disaring. Uji kelarutan endapan di dalam air. Selanjutnya uji endapan dengan reagen Millon dan filtrat dengan uji Biuret.

Pertanyaan:

Terangkan hasil-hasil yang diperoleh!



3. Pengendapan dengan Alkohol

Prosedur:

- Siapkan 3 tabung reaksi dan lakukan percobaan dengan mengikuti petunjuk pada tabel 2.
- Amati perubahan yang terjadi dalam setiap tabung.

Tabel 2. Pengendapan Protein oleh Alkohol

Nomor Tabung Reaksi	1	2	3
Larutan putih telur diencerkan 1:4 (mL)	5	5	5
HCl 0.1 M (mL)	1	—	—
NaOH 0.1 M (mL)	—	1	—
Buffer Asetat pH 4.7 (mL)	—	—	1
Etanol 95% (mL)	6	6	6

4. Uji Koagulasi

Reagen dan Bahan:

Reagen Millon: Larutan merkuri dan ion mercuro dalam asam nitrat dan asam nitrit.

Larutan protein

Larutan asetat 1 M

NaOH 2,5 N

Prosedur:

- Tambahkan 2 tetes asam asetat 1 M ke dalam 5 mL larutan protein. Letakkan tabung dalam air mendidih selama 5 menit.
- Ambil endapan dengan batang pengaduk. Uji kelarutan endapan di dalam air. Uji endapan dengan reagen Millon.

Pertanyaan:

- Apa fungsi penambahan asam kedalam larutan protein?
- Protein apa yang menggumpal pada saat pendidihan?

5. Denaturasi Protein

Prosedur:

- Siapkan 3 tabung reaksi dan lakukan percobaan dengan mengikuti petunjuk pada tabel 3.
- Tempatkan ketiga tabung reaksi tersebut dalam air mendidih selama 15 menit.
- Dinginkan pada suhu kamar dan amati apa yang terjadi. Ke dalam tabung nomer 2 dan 3 ditambahkan 5 mL larutan buffer asetat pH 4,7 dan amati apa yang terjadi.

**Tabel 3. Denaturasi Protein**

Nomor Tabung Reaksi	1	2	3
Putih telur (mL)	5	5	5
Buffer asetat pH 4,7 (mL)	1	–	–
HCl 0,1 M (mL)	–	1	–
NaOH 0,1 M (mL)	–	–	1

Pertanyaan:

1. Sifat fisik protein apa yang mempengaruhi kelarutan dari protein dalam percobaan ini?
2. Perubahan kimia apa yang berhubungan dengan denaturasi telur?

6. Uji Sulfur dalam Protein**Reagen dan Bahan:**

Fusion mixture: 3 bagian natrium karbonat anhidrat dengan satu bagian kalium nitrat.

Serbuk albumin telur

Larutan BaCl₂

HCl

Prosedur:

1. Campur 0,5 gram serbuk albumin dengan dua kali berat dari *fusion mixture*. Panaskan dalam cawan porselin sampai tak berwarna.
2. Dinginkan dan larutkan dalam air panas. Saring jika perlu. Asamkan filtrat dengan HCl. Panaskan hingga mendidih dan tambahkan beberapa tetes larutan BaCl₂.

Pertanyaan:

1. Mengapa protein memberikan uji positif pada sulfur?

IV. TUGAS PENDAHULUAN

1. Gambarkan struktur senyawa kompleks antara Cu²⁺ dengan rantai peptida?
2. Mengapa logam dapat mengendapkan protein?
3. Apa yang dimaksud dengan *salting in* dan *salting out* ?
4. Apa istilah pengertian berikut:
 - a. Koagulasi
 - b. Denaturasi
5. Unsur-unsur apa yang biasa ada dalam protein tetapi tidak ada dalam lipid dan karbohidrat?

B. Uji Kuantitatif Protein

I. TUJUAN

1. Mahasiswa dapat mengidentifikasi protein.
2. Mahasiswa dapat membandingkan metode Lowry dan metode Biuret.

II. TEORI SINGKAT

Penentuan konsentrasi protein merupakan proses yang rutin digunakan dalam kerja Biokimia. Ada beberapa metode yang biasa digunakan dalam rangka penentuan konsentrasi protein, yaitu metode Biuret, Lowry, dan Bradford. Masing-masing metode mempunyai kekurangan dan kelebihan. Pemilihan metode yang terbaik untuk suatu pengukuran bergantung pada beberapa faktor misalnya; banyaknya material atau sampel yang tersedia, waktu yang tersedia untuk melakukan pengukuran, alat spektrofotometer yang tersedia (VIS atau UV) dan lain sebagainya.

Prinsip metode Lowry adalah mempertajam warna yang dihasilkan pada metode Biuret. Pada metode ini, setelah protein direaksikan dengan pereaksi Biuret, ditambahkan pereaksi fosfomolibdat-fosfotungstat. Pada reaksi lanjutan ini akan terjadi reaksi oksidasi-reduksi dengan gugus tirosin atau tritofan yang ada pada protein. Batas deteksi metode ini adalah 20-200 µg protein.

III. PROSEDUR KERJA

1. Penentuan Protein dengan Metode Lowry

1. Sediakan alat-alat gelas dan ikuti prosedur seperti tabel dibawah ini:

Zat	Blanko	Standar						Sampel	
	1	2	3	4	5	6	7	8	
BSA 400 ppm (mL)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-	-	
Sampel (mL)	-	-	-	-	-	-	0,2	0,4	
H ₂ O (mL)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-	0,3	0,1	
Pereaksi Lowry (mL)	0,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Kocok, diamkan 10 menit dan langsung ditambahkan									
Folin-Ciocalteu 1 N (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	

2. Inkubasi semua larutan pada suhu kamar selama 30 menit, baca absorbansinya pada $\lambda = 700$ nm. Waktu inkubasi ini dapat dimulai (start) setelah penambahan/pencampuran reagen Folin-Ciocalteu ke dalam tabung terakhir.
3. Konsentrasi sampel dihitung dari kurva absorbansi vs konsentrasi standar.

**2. Penentuan Protein dengan Metode Biuret**

1. Sediakan alat-alat gelas dan ikuti prosedur seperti tabel dibawah ini:

Zat	Blanko	Standar						Sampel
	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA 400 ppm (mL)	-	0,2	0,6	1	1,4	1,8	-	-
Sampel (mL)	-	-	-	-	-	-	?	?
H ₂ O (mL)	2	1,8	1,4	1	0,6	0,2	?	?
Pereaksi Biuret (mL)	8	8	8	8	8	8	8	8

2. Kocok semua larutan, diamkan pada suhu kamar selama 30 menit dan baca absorbansinya pada $\lambda = 550$ nm.
3. Konsentrasi protein dalam sampel dihitung dari kurva absorbansi vs konsentrasi standar.

Pertanyaan:

1. Apakah kelebihan dan kelemahan kedua metode tersebut diatas?
2. Jelaskan sedikitnya dua metode lain (secara spektrofotometri) dalam menentukan konsentrasi protein berikut kelebihan dan kekurangannya dibandingkan dua metode diatas!

IV. TUGAS PENDAHULUAN

1. Mengapa metode Lowry lebih peka dibandingkan Biuret dalam menganalisa protein?
2. Beri penjelasan mengenai metode lain untuk menentukan konsentrasi protein berikut kelebihan dan kekurangannya!



KARBOHIDRAT

A. Uji Kualitatif Karbohidrat

I. TUJUAN

1. Mengetahui cara isolasi karbohidrat dan karakteristik karbohidrat seperti tes kualitatif.

II. TEORI SINGKAT

Karbohidrat mempunyai peranan yang penting dalam kehidupan, baik sebagai sumber energi maupun sebagai penyusun struktur jaringan. Glukosa dan glikogen misalnya, berperan sebagai sumber energi bagi tubuh kita, sedangkan selulosa berperan sebagai penyusun struktur jaringan pada tanaman. Glukosa selain sebagai sumber energi, juga berperan sebagai bahan baku bagi biosintesis senyawa-senyawa yang diperlukan tubuh seperti purin, pirimidin, asam-asam amino tertentu, porfirin, kolesterol, lemak, vitamin C, dan sebagainya.

Melihat pentingnya peranan karbohidrat bagi kehidupan, maka perlu mengetahui cara isolasi karbohidrat dan karakteristik karbohidrat seperti tes kualitatif.

III. PROSEDUR KERJA

1. Uji Anthrone

Reaksi anthrone merupakan metode yang baik dan cepat untuk menentukan heksosa, aldopentosa, dan asam heksuronat, juga untuk mengetahui adanya polisakarida. Larutan yang berwarna kehijauan ini memiliki absorpsi maksimum 620 nm, namun beberapa karbohidrat dapat memberikan warna lain. Reaksi tidak sesuai jika terdapat protein yang mengandung banyak gugus triptofan, karena akan memberikan warna merah.

Reagen dan Bahan:

Reagen Antrone 0,2%: Larutan 0,2 gram anthrone dalam 100 mL H₂SO₄ pekat.

Larutan glukosan 1%

Larutan laktosa 1%

Larutan Fruktosa 1 %

Larutan sukrosa 1%

Larutan galaktosa 1%

Larutan amilum 1%

Larutan maltosa 1%

H₂SO₄ 50%

Kertas saring

Asam asetat glasial

**Prosedur:**

1. Dengan hati-hati tambahkan 2 mL reagen anthrone kedalam tabung-tabung yang telah berisi 0,2 mL larutan-larutan gula, juga kedalam tabung yang berisi beberapa helai hancuran kertas saring.
2. Kocok setiap tabung dengan hati-hati dan biarkan beberapa saat. Perhatikan perubahan warna.
3. Bila dihasilkan produk yang berupa susu, encerkan dengan asam asetat glasial atau dengan asam sulfat 50% (lakukan dengan hati-hati).

Pertanyaan:

1. Apakah ada perubahan warna selama dibiarkan beberapa saat?
2. Bila larutan yang hendak diselidiki juga mengandung senyawa-senyawa lain, selain karbohidrat , akan terbentuk warna kehijauan, mengapa?

2. Uji Pikrat

Gula-gula pereduksi mengubah asam pikrat menjadi asam.

Reagen dan Bahan:

Larutan Asam Pikrat Jenuh: Larutkan 1,2 gram asam pikrat dalam 100 mL aquadest.

Larutan glukosa 1%
Larutan fruktosa 1%
Larutan galaktosa 1%
Larutan maltosa 1%

Larutan laktosa 1%
Larutan sukrosa 1%
Larutan amilum
 Na_2CO_3 1 M

Prosedur:

1. Campur 2 mL larutan-larutan: glukosa; fruktosa; galaktosa; maltosa; laktosa; sukrosa dan amilum dengan 1 mL larutan asam pikrat jenuh dan 0,5 mL Na_2CO_3 1 M.
2. Kemudian semua tabung bersama-sama dipanaskan dalam penangas air sampai terlihat perubahan warna.

Pertanyaan:

1. Larutan gula mana yang memberikan uji positif?
2. Tuliskan reaksi perubahan asam pikrat menjadi asam pikramat!
3. Mengapa uji ini dapat dipakai sebagai dasar untuk penentuan kadar gula darah secara kolorimetri?



3. Uji Fearon

Uji Fearon juga dipakai untuk membedakan monosakarida yang bergugus reduksi dari disakarida yang juga bergugus reduksi.

Reagen dan Bahan:

Larutan glukosa 0,5%	Larutan maltosa 0,5%
Larutan fruktosa 0,5%	Larutan sukrosa 0,5%
Larutan manosa 0,5%	Larutan laktosa 0,5%
Larutan xylosa 0,5%	Larutan dextrin 0,5%
Larutan metilamina hidroklorida 5% (b/v)	Larutan amilum 0,5%
Larutan NaOH 20%	

Prosedur:

1. Tambahkan 3-4 tetes larutan metilamina hidroklorida ke dalam tabung-tabung yang telah berisi 4 mL larutan-larutan glukosa, fruktosa, manosa, xylosa, maltosa, sukrosa, laktosa, dextrin, dan amilum.
2. Didihkan di dalam penangas air selama 30 detik, dinginkan, lalu tambahkan 4-5 tetes NaOH 20%. Warna merah menunjukkan uji positif untuk disakarida yang bergugus reduksi.

Pertanyaan:

1. Tabung mana yang memberikan uji positif?

4. Uji Foulger

Uji Foulger berfungsi untuk uji gula yang bergugus keto. Seperti halnya uji Seliwanoff.

Reagen dan Bahan:

Reagen Foulger: Tambahkan 2 gram stano klorida ke dalam 40 gram urea yang telah dilarutkan didalam 80 mL H_2SO_4 40% (v/v). Didihkan campuran ini hingga terlihat bening. Encerkan hingga 100 mL dengan H_2SO_4 40%.

Larutan glukosa 0,5%	Larutan maltosa 0,5%
Larutan fruktosa 0,5%	Larutan sukrosa 0,5%
Larutan manosa 0,5%	Larutan laktosa 0,5%
Larutan xylosa 0,5%	Larutan dextrin 0,5%
HCl pekat	Larutan amilum 0,5%

**Prosedur:**

1. Kedalam tabung-tabung yang berisi 2 mL larutan gula tambahkan 1 mL HCl pekat dan 1 mL Reagen Foulger.
2. Panaskan tabung-tabung tersebut di dalam penangas air selama dua menit. Terbentuknya warna biru menunjukkan reaksi yang positif untuk gula-gula keto.

Pertanyaan:

1. Larutan gula mana yang menunjukkan uji positif?

5. Uji Iodine

Uji Iodin dapat dipakai untuk membedakan amilum dari glikogen.

Reagen dan Bahan:

Larutan Iodine 0,01 M: Larukan 10 gram kalium iodida dalam 1 liter air. Tambahkan 2,5 gram iodin dan aduk.

Larutan amilum 1%

NaOH 6N

HCl 6N

Prosedur:

1. Pipet ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 3 mL larutan amilum.
2. Tambahkan 2 tetes air pada tabung pertama, 2 tetes HCl pada tabung kedua dan 2 tetes NaOH pada tabung ketiga.
3. Kocok semua tabung, lalu tambahkan 1 tetes larutan iodine ke dalam masing-masing tabung. Perhatikan warna yang terbentuk. Panaskan tabung yang berwarna, dinginkan. Perhatikan perubahan-perubahannya.

Pertanyaan:

1. Selain amilum, senyawa apa yang menghasilkan warna ketika diteteskan iodine?



Dengan melihat kedua persamaan diatas, kondisi yang bagaimanakah yang dapat memberikan hasil uji terbaik?

3. Bagaimana ketelitian uji iodine ini jika dibandingkan dengan uji anthrone?



6. Uji Asam Musat

Galaktosa dapat dibedakan dari monosakarida lainnya dengan tes ini. Monosakarida bila direaksikan dengan HNO_3 pekat akan menghasilkan asam dikarboksilat yang umumnya larut dalam air sedangkan galaktosa akan menghasilkan asam musat yang tidak larut.

Reagen dan Bahan:

Glukosa 50 mg

Galaktosa 50 mg

HNO_3 pekat

Aquades

Prosedur:

- Siapkan dua tabung reaksi. Isi tabung pertama dengan 50 mg glukosa dan yang lainnya dengan 50 mg galakosa.
- Ke dalam masing-masing tabung tambahkan 1 mL air suling dan HNO_3 pekat. Panaskan kedua tabung tersebut dalam penangas air dalam lemari asam selama 30-60 menit.
- Tambahkan H_2O pada tiap tabung dan diamkan satu malam. Amati dan tuliskan perubahan yang terjadi!

B. Uji Kuantitatif Karbohidrat

I. TUJUAN

- Mahasiswa dapat mengidentifikasi karbohidrat.
- Mahasiswa dapat membandingkan metode Somogyi-Nelson dan metode Anthrone.

II. TEORI SINGKAT

Pada percobaan ini digunakan metode penentuan gula pereduksi dengan metode Somogyi-Nelson, dimana gula pereduksi bila dipanaskan dengan larutan tembaga tartrat yang bersifat basa akan menghasilkan tembaga oksida (Cu_2O). Tembaga oksida ini akan bereaksi dengan larutan arsenomolibdat menghasilkan warna biru molibdenum dan intensitas warnanya diukur dengan spektrofotometer. Pada penentuan ini perlu ditambahkan natrium sulfat ke dalam larutan yang berwarna biru untuk mencegah oksigen dari udara yang dapat mengoksidasi kembali Cu_2O . Penentuan ini tidak dapat digunakan untuk campuran gula-gula pereduksi. Selain itu protein perlu dipisahkan terlebih dahulu dengan menambahkan $\text{Zn}(\text{OH})_2$ sebagai pengendap protein.



Reaksi anthrone merupakan metode yang baik dan cepat untuk menentukan heksosa, aldopentosa, dan asam heksuronat, juga untuk mengetahui adanya polisakarida. Larutan yang berwarna kehijauan ini memiliki absorpsi maksimum 620 nm, namun beberapa karbohidrat dapat memberikan warna lain. Reaksi tidak sesuai jika terdapat protein yang mengandung banyak gugus triptofan, karena akan memberikan warna merah.

III. PROSEDUR KERJA

1. Penentuan Gula Pereduksi dengan Metode Somogyi-Nelson

1. Pipet 0,1 mL larutan standar gula pereduksi yang mengandung 50-250 µg/mL, masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1,5 mL air kemudian aduk sampai homogen.
2. Pindahkan campuran ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 mL pereaksi Ba(OH)_2 0,3 M dan 0,2 mL larutan ZnSO_4 . Kemudian kocok dan sentrifugasi selama beberapa menit.
3. Pindahkan 1 mL supernatan ke dalam tabung reaksi lain selanjutnya tambahkan 1 mL pereaksi Somogyi-Nelson (tembaga-alkali).
4. Pasang penutup pada tabung, kemudian panaskan tabung di dalam penangas air selama 15 menit.
5. Dinginkan tabung dan tambahkan 1 mL pereaksi arsenomolibdat. Biarkan larutan beberapa saat sampai tidak timbul gelembung-gelembung udara.
6. Encerkan larutan yang berwarna biru hingga volume 10 mL dan ukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm.
7. Sampel dan blanko diperlakukan sama dengan larutan standar (prosedur dimulai dari nomor 1-6).
8. Hitung kadar gula pereduksi yang didapat dari kurva absorbansi vs konsentrasi standar.

2. Penentuan Karbohidrat dengan Metode Anthrone

1. Tambahkan 4 mL reagen anthrone (0,2% anthrone dalam H_2SO_4 pekat) kedalam 1 ml larutan karbohidrat (yang tidak mengandung protein) kocok dengan cepat (awas asam kuat).
2. Letakkan tabung-tabung tersebut diatas penangas air yang sedang mendidih, tutup mulut tabung dengan kelereng untuk mengurangi penguapan larutan tersebut.
3. Dinginkan dan setelah 20 menit, ukur absorbansinya pada panjang gelombang 620 nm.
4. Larutan standar dan blanko diperlakukan sama dengan sampel (prosedur dimulai dari nomor 1-3).



5. Hitung kadar karbohidrat yang didapat dari kurva absorbansi vs konsentrasi standar.
6. Konsentrasi standar yang dibuat adalah 5, 10, 15, 20, dan 25 mg/100 mL.



LIPID

A. Uji Kualitatif Lipid

I. TUJUAN

1. Mengetahui cara mengisolasi lipid dari suatu sampel beserta uji kualitatifnya.

II. TEORI SINGKAT

Lipid merupakan biomolekul organik yang tidak larut di dalam air tetapi larut di dalam pelarut organik seperti eter, kloroform, dan benzen. Dalam tubuh, lipid berfungsi sebagai sumber energi, komponen struktur membran, sumber bahan baku bagi biosintesis basa-basa purin serta pirimidin yang menyusun asam nukleat, biosintesis asam amino tertentu, dan sebagainya.

Selain lipid yang berada dalam keadaan bebas terdapat pula lipid yang berikatan dengan senyawa lain. Bila lipid berikatan dengan protein disebut lipoprotein, bila berikatan dengan karbohidrat disebut glikolipid, dan bila berikatan dengan fosfat anorganik disebut fosfolipid.

III. PROSEDUR KERJA

1. Isolasi Lipid

Prinsip isolasi lipid adalah berdasarkan perbedaan kelarutan lipid dengan senyawa lain yang ada di dalam sampel. Campuran lipid dari suatu jaringan dapat dipisahkan berdasarkan kelarutan dalam berbagai pelarut lipid atau pelarut organik. Sebagai contoh fosfolipid dapat dipisahkan dari sterol dan lipid netral dengan menggunakan aseton, sebab fosfolipid tidak larut dalam aseton. Untuk fraksinasi lipid dapat dilakukan penyabunan.

Prosedur pemisahan berbagai lipid dari kuning telur:

1. Pecahkan telur dan pisahkan putih telur dari kuningnya. Simpan putih telur (diberikan kepada asisten) untuk penentuan protein.
2. Letakkan kuning telur di dalam gelas piala 400 mL dan tambahkan 50 mL etanol dan 25 mL kloroform (Perhatian: jangan bekerja dekat api!). Aduk dan diamkan 10 menit.
3. Saring dengan kertas saring yang telah dibasahkan dengan alkohol ke dalam gelas piala kering. Bilas endapan pada kertas saring dengan 20 mL campuran alkohol-kloroform (2:1) dan tampung filtrat yang dihasilkan.
4. Uapkan filtrat di atas penangas air menggunakan cawan penguap. Setelah dingin larutkan residu dalam 10 mL kloroform.



5. Tambahkan perlahan-lahan 30 mL aseton lalu aduk. Pisahkan endapan dan filtrat dengan proses penyaringan.
6. Endapan yang didapat adalah lesitin. Lesitin disimpan untuk percobaan fosfolipid.
7. Filtrat diuapkan di atas penangas air. Dinginkan dan tambahkan 15 mL larutan KOH 15% dalam alkohol lalu panaskan di atas penangas air selama 30 menit.
8. Tambahkan 50 mL kloroform. Endapan yang terbentuk adalah sabun sedangkan filtratnya mengandung kolesterol. Sabun dan kolesterol dipisahkan dengan penyaringan.
9. Uapkan filtrat yang mengandung kolesterol di atas penangas air. Ekstraksi endapan yang terbentuk dengan 5 mL alkohol sambil dipanaskan di atas penangas air.
10. Pipet larutan alkohol dan masukkan ke dalam tabung sentrifuge. Ulangi ekstraksi dengan 3 mL alkohol.
11. Sentrifugasi larutan alkohol selama 3 menit dan pindahkan supernatannya ke tabung sentrifuge lain. Tambahkan air ke dalam supernatan sampai tidak terbentuk endapan lagi. Diamkan selama 30 menit lalu sentrifugasi.
12. Dekantasi larutan di atasnya dan rekristalisasi endapan yang diperoleh dalam alkohol panas. Dinginkan dan tambahkan beberapa tetes air guna penyempurnaan kristalisasi. Sentrifugasi dan pisahkan kolesterol yang didapat.

2. Emulsi

Kebanyakan lipid larut dalam etanol 95%, tetapi membentuk suatu emulsi apabila ke dalamnya ditambahkan beberapa tetes air. Emulsi yang terbentuk mempunyai penampilan seperti susu dan tidak stabil. Akan kembali kepada keadaan semula (campuran) setelah didiamkan sejenak. Penambahan suatu zat ketiga yang mempunyai daya aktif permukaan, misalnya sabun akan membuat keadaannya lebih stabil.

Prosedur:

- a. Sabun sebagai emulgator (pencegah emulsi)
 1. Siapkan 4 tabung reaksi dan lakukan percobaan mengikuti petunjuk pada tabel 1.



Tabel 1. Emulsi

Nomor Tabung reaksi	1	2	3	4
H ₂ O (mL)	5	5	5	5
Minyak parafin (tetes)	1	—	1	—
Minyak kelapa (tetes)	—	1	—	1
HCl encer (tetes)	1	1	—	—
Soda (tetes)	—	—	1	1

2. Keempat tabung reaksi dikocok dan ditutup ibu jari. Amati dan jelaskan perubahan yang terjadi pada keempat tabung tersebut.
- b. Gallus (empedu) sebagai emulgator
 1. Campur dan kocok 3 mL air dan 1 mL gallus (blanko).
 2. Campur dan kocok 3 mL air dan 1 tetes minyak kelapa (blanko).
 3. Campurkan 3 mL air, 1 tetes minyak kelapa dan 1 mL gallus. Amati dan jelaskan perubahan yang terjadi.
- c. Protein sebagai emulgator
 1. Kocok 3 mL protein 1% (blanko).
 2. Kocok 3 mL protein 1% dan 3 tetes minyak. Amati dan jelaskan perubahannya.

3. Uji Kelarutan

Setiap senyawa lipid mempunyai karakteristik kelarutan yang berbeda dan sifat ini digunakan pada ekstraksi dan isolasi lipid dari sampel biologis.

Prosedur:

1. Siapkan 15 tabung reaksi dan lakukan percobaan mengikuti petunjuk pada tabel 2.
2. Amati dan jelaskan perubahan yang terjadi.

Tabel 2. Tes Daya Kelarutan Lemak

Nomor Tabung reaksi	1	2	3	4	5
H ₂ O (mL)	3	—	—	—	—
Alkohol (mL)	—	3	—	—	—
Aseton (mL)	—	—	3	—	—
Eter (mL)	—	—	—	3	—
Kloroform (mL)	—	—	—	—	3
Minyak kelapa (tetes)	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2



Nomor Tabung reaksi	1	2	3	4	5
H ₂ O (mL)	3	–	–	–	–
Alkohol (mL)	–	3	–	–	–
Aseton (mL)	–	–	3	–	–
Eter (mL)	–	–	–	3	–
Kloroform (mL)	–	–	–	–	3
Lesitin (mg)	5	5	5	5	5

Nomor Tabung reaksi	1	2	3	4	5
H ₂ O (mL)	3	–	–	–	–
Alkohol (mL)	–	3	–	–	–
Aseton (mL)	–	–	3	–	–
Eter (mL)	–	–	–	3	–
Kloroform (mL)	–	–	–	–	3
Kolesterol (mg)	5	5	5	5	5

4. Uji Penyabunan

Apabila lemak atau minyak dipanaskan dengan penambahan alkali, maka akan terbentuk garam asam lemak atau sabun dan gliserol. Proses ini dikenal dengan saponifikasi. Sabun larut dalam air, tetapi akan mengendap apabila ditambahkan NaCl berlebih.

Prosedur:

1. Tambahkan 3 mL larutan KOH alkoholis 10% ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 tetes minyak.
2. Panaskan campuran di dalam penangas air mendidih selama 1 menit.
3. Setelah dingin, tambahkan HCl sedikit berlebih.
4. Pisahkan asam lemak bebas dengan cara mengekstraksinya dengan kloroform atau eter.
5. Lakukan uji busa.

5. Uji Peroksidia

Adanya peroksidia ditunjukkan dengan pembebasan Iodin.

Prosedur:

1. Larutan kira-kira 1 mL minyak olive di dalam 1 mL kloroform, tambahkan 2 mL asam asetat glasial dan satu tetes larutan KI 10%, aduk dengan rata dan biarkan selama 5 menit.
2. Ulangi percobaan dengan menggunakan minyak/lemak tengik.

Pertanyaan:

1. Lipid mana yang menunjukkan uji positif?

6. Uji Busa (Untuk Sabun)

Prosedur:

1. Tambahkan beberapa mL air ke dalam tabung reaksi yang mengandung sabun (hasil percobaan isolasi lipid) kocok kuat-kuat.
2. Amati dan jelaskan perubahan yang terjadi.

Pertanyaan:

1. Apakah busa itu?
2. Bagaimana busa terbentuk?
3. Senyawa-senyawa apa lagi selain sabun yang membentuk busa?

7. Uji Pengendapan (Untuk Sabun)

Prosedur:

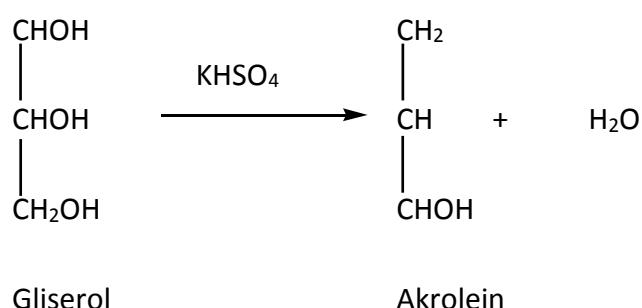
1. Ke dalam larutan sabun dingin (hasil percobaan isolasi lipid) tambahkan beberapa tetes asam klorida pekat sampai larutan memberikan uji positif terhadap kertas indikator kongo merah.
2. Kocok selama penambahan asam dengan merata.

Pertanyaan:

1. Apa hasilnya?
2. Senyawa organik lain apa yang juga menghasilkan reaksi positif?

8. Uji Aklolein

Apabila lesitin atau gliserol dipanaskan disertai dengan penambahan kalium bisulfit, maka akan terjadi dehidrasi membentuk akrolein yang berbau khas. Reaksi:

**Prosedur:**

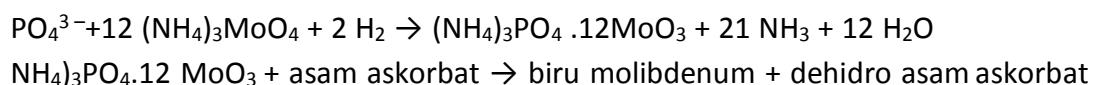
1. Tambahkan kalium bisulfat anhidrat sebanyak 100 mg kedalam tabung reaksi kering yang berisi 1-2 tetes gliserol.
2. Panaskan campuran dan cium bau yang terbentuk.



3. Ulangi percobaan dengan menggunakan lemak dan lesitin (hasil percobaan isolasi lipid (1)).

9. Tes Fosfat

Fosfolipid jika direaksikan dengan ammonium molibdat akan menghasilkan kompleks amonium fosfomolibdat yang berwarna biru, seperti reaksi dibawah ini:



Prosedur:

1. Tambahkan 1 mL air ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 tetes larutan lesitin (hasil percobaan isolasi lipid 1.), kemudian kocok sampai homogen.
2. Tambahkan 1 mL larutan ammonium molibdat 2,5% dalam asam sulfat 5 N lalu kocok campuran.
3. Tambahkan 5 tetes larutan asam askorbat 5% dan amati perubahan warna yang terjadi.

Pertanyaan:

1. Bagaimana hasil dari percobaan tersebut?
2. Lipid apa yang mengandung nitrogen, juga fosfor?

10. Uji Ketidakjenuhan

Prosedur:

1. Siapkan tabung reaksi dan lakukan percobaan mengikuti petunjuk pada tabel 3.
2. Buat larutan brom dengan cara melarutkan 1 mL Br_2 dilarutkan di dalam 20 mL kloroform.

Tabel 3. Uji Ketidak Jenuhan Lemak.

Nomor Tabung reaksi	1	2	3	4
Minyak olive (tetes)	1	–	–	–
Gajih/gemuk (mL)	–	1	–	–
Lesitin (mL)	–	–	1	–
Kloroform (mL)	1	1	1	1

3. Teteskan larutan brom (dalam kloroform) ke dalam semua tabung dengan menggunakan pipet Pasteur sampai terlihat warna kuning yang permanen. Catat jumlah tetes yang diperlukan.

Pertanyaan:

1. Amati dan jelaskan perubahan-perubahan yang terjadi.



11. Uji Salkowski untuk Kolesterol

Bila kolesterol dengan konfigurasi tidak jenuh di dalam molekulnya direaksikan dengan asam kuat dalam kondisi bebas air, maka akan memberikan warna yang karakteristik. Warna yang dihasilkan bervariasi dengan kondisi percobaan. Mekanisme reaksinya menurut salah satu teori adalah mula-mula dibentuk kompleks asam teraktivasi, diikuti dengan agregasi beberapa molekul menghasilkan sistem terkonjugasi. Senyawa-senyawa kromofor yang dihasilkan berlaku seperti indikator asam basa.

Baik uji Salkowski maupun uji Liebermann-Burchard akan memberikan hasil yang baik, bila alat-alat gelas, reagen-reagen dan senyawa-senyawa yang akan diuji berada dalam keadaan kering.

Prosedur:

1. Dalam tabung reaksi kering, larutkan 10 mg kolesterol (hasil percobaan isolasi lipid (1)) di dalam 2 mL klorofom anhidrat. Tambahkan volume dua tetes H_2SO_4 pekat (B.D. 1,84).
2. Kocok tabung perlahan-lahan. Biarkan lapisan cair terpisah, amati warnanya.

Pertanyaan:

1. Lapisan mana yang merupakan lapisan kloroform? Bagaimana warnanya?
2. Jelaskan warna lapisan asam sulfat dalam cahaya yang dipantulkan dan cahaya yang ditransmisi!

12. Uji Liebermann-Burchard untuk Kolesterol

Apabila sterol yang mempunyai ikatan rangkap di dalam molekulnya direaksikan pada kondisi kering dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat, maka akan dihasilkan suatu warna yang karakteristik.

Prosedur:

1. Dalam tabung reaksi kering, larutkan 10 mg kolesterol (hasil percobaan isolasi lipid (1)) di dalam 2 mL klorofom anhidrat. Tambahkan enam tetes asam asetat anhidrida dan dua tetes H_2SO_4 pekat (B.D. 1,84).
2. Kocok tabung perlahan-lahan sampai homogen. Biarkan untuk beberapa menit, amati warna yang terbentuk.

Pertanyaan:

1. Jelaskan warna dari pada isi tabung!
2. Bagaimana kepekaan dari kedua uji diatas tersebut. Salkowski dan Liebermann-Burchard terhadap kolesterol?



3. Apa yang menyebabkan reaksi warna ini berguna untuk penentuan kuantitatif?

B. Uji Kuantitatif Lipid

I. TUJUAN

1. Mahasiswa dapat mengidentifikasi lipid.
2. Mahasiswa dapat membandingkan berbagai metode penentuan lipid.

II. TEORI SINGKAT

Lipid merupakan komponen jaringan yang heterogen dan penggolongannya didasarkan atas kelarutannya di dalam pelarut-pelarut lemak, seperti eter dan lain-lain. Sedangkan komponen-komponen campuran lipid dapat difraksiasi lebih lanjut dengan menggunakan perbedaan kelarutannya di dalam berbagai pelarut organik. Sebagai contoh: fosfolipid, dapat dipisahkan dari sterol dan lemak netral atas dasar ketidaklarutannya di dalam aseton.

III. PROSEDUR KERJA

1. Penentuan Angka Asam

Selama disimpan, minyak atau lemak dapat menjadi tengik karena adanya asam lemak bebas dan senyawa aldehid sebagai akibat terjadinya pemutusan ikatan rangkap melalui pembentukan peroksidasi oleh oksidasi udara atau hidrolisis oleh mikroorganisme. Jumlah asam lemak bebas yang terdapat dalam minyak dapat menunjukkan umur penyimpanan dan kualitas minyak tersebut.

Angka asam adalah jumlah mg KOH yang dibutuhkan untuk menetralkan asam lemak bebas yang terdapat dalam 1 g lemak atau minyak.

Prosedur:

1. Larutkan 10 g sampel dalam 50 mL alkohol secara kuantitatif, kemudian tambahkan indikator phenolphthalein.
2. Titrasi campuran dengan larutan NaOH 0,1 N sampai timbul warna merah jambu yang tidak hilang selama 30 detik. Lakukan hal yang sama pada blanko.
3. Hitung angka asam sampel.



2. Penentuan Angka Iodium

Angka iodium adalah jumlah mg iodium yang diserap oleh 1 g minyak atau lemak. Angka iodium dapat menunjukkan indikasi seberapa banyak asam lemak tidak jenuh yang terdapat dalam minyak atau lemak. Asam lemak tidak jenuh dapat mengalami reaksi adisi dengan halogen pada ikatan rangkapnya. Iodin monoklorida bereaksi dengan ikatan rangkap dan jumlah iodium yang bereaksi dapat ditentukan dengan cara mentitrasi iodium yang sisa dengan dengan larutan standar tiosulfat, setelah terlebih dahulu ditambah KI.

Prosedur:

1. Timbang 0,5 g sampel dalam erlenmeyer tertutup dan larutkan dalam 10 mL kloroform.
2. Tambahkan 10 mL larutan Hannus/Wijs secara kuantitatif ke dalamnya dan diamkan selama 30 menit di tempat gelap.
3. Tambah 10 mL larutan KI 15% lalu kocok.
4. Semprot dinding erlenmeyer dan tutupnya dengan air didih.
5. Titrasi campuran dengan larutan natrium tiosulfat 0,1 N sampai larutan.
6. Tambahkan 1 mL larutan kanji, selanjutnya titrasi kembali sampai warna biru hilang. Lakukan percobaan yang sama untuk blanko.
7. Hitung angka iodium sampel.

3. Penentuan Angka Peroksida

Lipid mudah mengalami oksidasi sehingga menyebabkan tengik. Lipid bila teroksidasi akan menghasilkan senyawa hidroperoksida. Untuk mengetahui banyaknya lipid yang teroksidasi ditentukan dengan bilangan peroksida. Ada beberapa cara untuk penentuan ini.

Prosedur:

1. Masukkan 100 mg sampel ke tabung reaksi, tambahkan 0,5 mL larutan KI, larutan AlCl_3 0,5 mL dan 1 mL n-heksana.
2. Inkubasi campuran pada 37°C selama 5 menit.
3. Tambahkan 15 mL larutan HCl 0,01 N dan 0,5 mL larutan kanji. Kocok campuran dengan kuat dengan menggunakan corong pisah. Pisahkan lapisan bawah dan baca absorbansinya pada $\lambda = 560 \text{ nm}$.
4. Lakukan kalibrasi menggunakan larutan standar KIO_3 dengan cara mencampurkan 0,2 mL larutan KIO_3 , 0,5 mL larutan AlCl_3 dan 0,5 mL larutan KI lalu tambahkan 15 mL larutan HCl 0,01 N dan 0,5 mL larutan kanji dan diukur absorbansinya pada $\lambda = 560 \text{ nm}$.



$$\text{Angka peroksida} = \frac{1,2 \times A \times K}{m \times A_{st}}$$

Dengan:

- A = absorbansi sampel pada λ : 560 nm
Ast = absorbansi standar pada λ : 560 nm
m = berat minyak (g)
K = faktor konversi volume (1,01212)

4. Penentuan Bilangan TBA (Asam Tiobarbiturat)

Hidroperoksida yang merupakan hasil utama pada reaksi oksidasi lipid dapat mengalami penguraian menjadi senyawa yang lebih kecil seperti aldehida. Aldehida dapat menimbulkan bau dan rasa tidak enak pada lipid. Selain itu, aldehida dapat bersifat karsinogenik. Untuk mengetahui banyaknya aldehida dapat digunakan metode TBA. Sebagai contoh reaksi antara malonaldehida dengan TBA.

Prosedur:

1. Timbang 0,2 g minyak dan 1 mL heksana. Kocok campuran.
2. Pipet 0,5 mL campuran, tambahkan 4 mL larutan TCA 20% dan 2 mL larutan asam tiobarbiturat 0,67%.
3. Tambahkan 1 mL kloroform ke dalam campuran, kocok dan pisahkan dengan corong pisah. Ukur absorbansi larutan yang berwarna merah jernih pada λ : 531,5 nm.



METABOLISME KARBOHIDRAT

I. TUJUAN

1. Mahasiswa dapat mengidentifikasi karbohidrat
2. Mahasiswa mengetahui metabolisme karbohidrat

II. PROSEDUR KERJA

1. Pengamatan Hidrolisis Amilum untuk Mempelajari Metabolisme Karbohidrat secara Intraseluler yaitu pada Saluran Pencernaan Manusia

Alat dan Bahan:

- | | |
|-------------------------------------|----------------------|
| - Tabung reaksi dan rak | - Larutan amilum 10% |
| - Penangas air (<i>waterbath</i>) | - HCl 2 M |
| - Plat tetes | - Larutan iodium 2% |
| - Pipet ukur | - Reagen benedict |
| - Pipet tetes | |

Prosedur:

1. Masukkan 5 mL larutan amilum 10% ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 2,5 mL HCl 2 M, kocok.
3. Setelah 3 menit, ambil 2 tetes larutan dan letakkan pada plat tetes, dan tambahkan larutan iodine 2 tetes. Catat perubahan yang terjadi
4. Lakukkan langkah yang sama seperti di atas setiap 3 menit sampai didapatkan hasil berwarna kuning pucat (\pm sampai 21 menit).
5. Terakhir lanjutkan hidrolisis sampai 5 menit, didinginkan.
6. Lakukan Uji Benedict, masukkan 2 tetes larutan amilum yang telah dihidrolisis dan tambahkan Reagen Benedict 6 tetes. Campurkan dengan baik, masukkan dalam penangas air mendidih selama 5 menit, biarkan dingin. Perhatikan warna dan endapan yang terbentuk.

**Hasil Pengamatan:**

1. Tabel pengamatan hidrolisis amilum 10%

Waktu Hidrolisis	Warna dengan Iodine	Hasil Hidrolisis
5 menit		
6 menit		
9 menit		
12 menit		
15 menit		
18 menit		
21 menit		

2. Tuliskan hasil pengamatan Uji Benedict

Sampel	Penilaian	Konsentrasi

2. Pengamatan Hidrolisis Amilum untuk Mempelajari Metabolisme Karbohidrat secara Intraseluler yaitu pada Saluran Pencernaan Manusia**Alat dan Bahan:**

- Fotometer
- Mikropipet
- Tabung reaksi dan rak
- Timer
- *Blue tip* dan *yellow tip*
- Tisu
- Tourniquet
- Jarum suntik
- Vacutainer
- Sentrifus
- Waterbath
- Darah orang normal
- Darah pasien DM
- Glukosa 1'A1 tes Kit

Prosedur:

Mode = End – Point

Sampel: 1) Orang normal, 2) Sampel Darah Penderita DM

Pipet ke dalam 3 tabung	Blanko (μ L)	Standar (μ L)	Sampel (μ L)
Standar			
Sampel			
Reagen			
Inkubasi selama 5-10 menit pada suhu 37°C lalu baca kadar glukosa pada panjang gelombang 505 nm dan T-faktor 1.000			



Perhitungan:

$$\text{Kadar Glukosa} = \frac{\text{Nilai absorbansi sampel}}{\text{Nilai absorbansi standar}} \times \text{konsentrasi (100)}$$

Nilai normal:

Glukosa puasa : < 126 mg/dL

Glukosa 2 jam PP : < 180-200 mg/dL

Glukosa sewaktu : < 200 mg/dL

Hasil Pengamatan:

Sampel Darah	Kadar Glukosa Darah (mg/dL)
Orang normal	
Pasien DM	

3. Percobaan Uji Glukosa dalam Urin secara Benedict

Mereaksi sampel urin dengan larutan benedict kemudian dipanaskan dan mengamati perubahan warna yang terjadi karena gula yang mempunyai gugus aldehid atau keton bebas akan mereduksi ion kupri menjadi kuprooksida yang tidak larut dan berwarna merah

Dasar : karbohidrat yang memiliki gugus aldehid dan keton bebas, mereduksi Cu suasana basa Na_2CO_3 menghasilkan endapan merah bata dari CuO^{2+}

Prosedur:

1. Campurlah tabung reaksi 2,5 mL larutan Benedict dan 4 tetes urin
2. Panaskan dalam tangas air mendidih selama 5 menit atau panaskan langsung hingga mendidih 2 menit
3. Dinginkan perlahan-lahan
4. Perhatikan endapan yang terbentuk
5. Simpulkan sesuai tabel berikut:

Warna	Penilaian	Konsentrasi Gula
Biru/hijau keruh	-	-
Hijau/hijau kekuningan	+1	Kurang dari 0,5%
Kuning kehijauan/kuning	+2	0,5-1,0%
Jingga	+3	1,0-2,0%
Merah	+4	Labih dari 2,0%



METABOLISME PROTEIN

I. TUJUAN

1. Mahasiswa dapat mengidentifikasi protein
2. Mahasiswa mengetahui metabolisme protein

II. PROSEDUR KERJA**1. Uji Denaturasi Protein****Alat dan Bahan:**

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| - Tabung reaksi dan rak | - HNO ₃ pekat |
| - Pipet tetes | - Larutan albumin telur |
| - Pipet ukur | - Larutan pepton 5% |
| - Penangas air | - Larutan HCl 1 M |
| | - Larutan NaOH 1 M |

Prosedur:

1. Siapkan 3 tabung reaksi yang bersih dan kering. Beri label A, B, dan C.
2. Masukkan 2 mL larutan albumin telur pada masing-masing tabung.
3. Pada tabung A tambahkan 0,5 mL HCl 1M.
4. Pada tabung B tambahkan 0,5 mL NaOH 1 M.
5. Pada tabung C tambahkan 0,5 mL HNO₃ pekat.
6. Letakkan 3 tabung reaksi tadi pada penangas air selama 10 menit
7. Dinginkan pada temperatur kamar, netralkan, dan amati perubahan yang terjadi.

Hasil Pengamatan:

Bahan	Tabung A	Tabung B	Tabung C
Albumin telur	2 mL	2 mL	2 mL
HCl 0,1 M	0,5 mL	-	-
NaOH 0,1M	-	0,5 mL	-
HNO ₃ pekat	-	-	0,5mL
Kocok sampai homogen			
Panaskan dalam penangas air selama 10 menit			
Dinginkan pada temperatur kamar			
Netralkan			
Hasil			



2. Uji Ikatan Peptida Protein

Identifikasi adanya ikatan peptida dalam protein dapat dilakukan melalui uji biuret. Reagen biuret terdiri dari CuSO₄ dan NaOH. Kupri sulfat dalam suasana basa bereaksi dengan senyawa yang mengandung 2 atau lebih ikatan peptida akan menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna ungu. Intensitas warna yang dihasilkan pada kebanyakan ikatan peptida yang terdapat pada protein.

Alat dan Bahan:

- Tabung reaksi
- Pipet tetes
- Pipet ukur
- Larutan albumin telur
- Larutan pepton 5%
- Larutan gelatin 5%
- Larutan NaOH 10%
- Larutan CuSO₄

Prosedur:

1. Siapkan 3 tabung reaksi yang bersih dan kering, isilah dengan larutan albumin telur, larutan pepton 5%, dan larutan gelatin 5%, masing-masing 2 mL.
2. Tambahkan di setiap tabung 1 mL NaOH 10% dan 3 tetes CuSO₄ 0,2%, kocok hingga homogen, dan amati perubahan yang terjadi.

Hasil Pengamatan:

No.	Sampel	Perlakuan	Hasil Pengamatan
1	Albumin telur	1 mL NaOH 10% + 3 tetes CuSO ₄ 0,2%	
2	Pepton 5%	1 mL NaOH 10% + 3 tetes CuSO ₄ 0,2%	
3	Gelatin 5%	1 mL NaOH 10% + 3 tetes CuSO ₄ 0,2%	

3. Identifikasi Albumin di dalam Urin

Alat dan Bahan:

- Fotometer
- Mikropipet 20 µL dan 1000 µL
- Yellow tip
- Blue tip
- Tabung reaksi
- Reagen enim (RGT) 4 x 100 mL
- Standar (STD) 8 gr/dL
- Sampel urin normal dan pasien gagal ginjal

**Prosedur:**

Panjang gelombang	: Hg 546 nm (520-580 nm)
Optical path	: 1 cm
Temperatur	: 20-25°C atau 37°C
Pengukuran	: Menggunakan reagen blank

Ke dalam tabung	Blanko	Standar	Test
Spesimen (μ L)	-	-	20
Standar (μ L)	-	20	-
Reagen (μ L)	1000	1000	1000
Campuran inkubasi 10 menit pada suhu ruang, baca absorbansi sampel dan standar terhadap reagen blanko stabil 30 menit			

Perhitungan : $\Delta A \text{ test} \times \text{Konsentrasi ST} = \dots \text{g/dL}$
 $\Delta A \text{ St}$
Nilai normal : Bayi : 4,6-7,0 g/dL
Anak dewasa : 6,6-8,7 g/dL

Hasil Pengamatan:

No.	Sampel	Hasil Pengamatan
1	Urin (Orang Normal)	
2	Urin (Pasien GGK)	

4. Uji Protein Menurut Heller

Protein dalam urin mengalami denaturasi oleh asam nitrat yang tampak sebagai cincin putih pada perbatasan kedua cairan.

Prosedur:

1. Alirkan dari tabung ukur 3 mL asam nitrat pekat perlahan-lahan ke dalam tabung reaksi.
2. Dengan memakai pipet Mohr, pelan-pelan tambahkan urin normal atau patologis melalui dinding tabung sehingga kedua cairan tidak bercampur.
3. Perhatikan cincin putih yang terjadi antara dua lapisan.

5. Uji Koagulasi Protein dalam Urin

Pembentukan presipitat akibat pemanasan urin. Presipitat yang hilang pada pengasaman menyatakan fosfat, sedangkan presipitat yang disebabkan oleh protein akan tetap atau bertambah. Pada kelebihan asam juga akan menyebabkan larutnya protein yang mengendap.

**Prosedur:**

1. Panaskan 5 mL urin hingga mendidih 1-2 menit
2. Bila terbentuk endapan, tambahkan 3-5 tetes asam asetat 2%. Apakah presipitat tersebut hilang atau bertambah?

6. Reaksi Jaffe

Reaksi ini terbentuk berdasarkan pembentukan tautomer kreatinin pikrat yang berwarna merah, bila kreatinin direaksikan dengan larutan pikrat alkalis, warna ini akan berubah menjadi warna kuning, apabila larutan diasamkan. Selain asam pikrat, kreatinin dapat juga diendapkan oleh asam fosfowolframat dan garam-garam logam berat.

Prosedur:

1. Masukkan 5 mL urin ke dalam tabung reaksi dan 5 mL ke dalam tabung lain.
2. Tambahkan masing-masing 1 mL larutan asam pikrat jenuh dan 1 mL NaOH 10%, perhatikan warna yang terbentuk.
3. Tambahkan HCl pada salah satu tabung, bandingkan hasilnya pada tabung yang tidak ditambah HCl.
4. Bandingkanlah percobaan ini terhadap larutan glukosa yang ditambah asam pikratalkalis.
5. Uji asam urat dengan reaksi mureksida: Mereaksikan kristal asam urat dengan asam nitrat pekat dan amoniak encer lalu perhatikan perubahan warna yang terjadi.
6. Uji badan keton dalam urin dengan reaksi Rothera: Mereaksikan sampel urin dengan kristal ammonium sulfat, Na nitoprussiidase dan NH₄OH pekat lalu mengamati perubahan yang terjadi.



METABOLISME LIPID

I. TUJUAN

1. Mahasiswa dapat mengidentifikasi lipid
2. Mahasiswa mengetahui metabolisme lipid

II. PROSEDUR KERJA

1. Percobaan Hidrolisis Lipid

Alat dan Bahan:

- | | |
|---------------------|-----------------|
| - Labu erlenmeyer | - Minyak goreng |
| - Kaca arloji | - NaOH teknis |
| - Pipet tetes | - Etanol p.a |
| - Gelas Ukur | - Aquades |
| - Hot plate stirrer | |
| - Spatula logam | |

Prosedur:

1. Masukkan 5 mL minyak goreng ke dalam erlenmeyer, tambahkan 1,5 gram NaOH dan 12,5 mL etanol.
2. Panaskan selama 15 menit, sampai mendidih (tutup bagian atas labu erlenmeyer dengan kaca arloji).
3. Cek kesempurnaan reaksi penyabunan yang terjadi dengan cara ambil 3 tetes larutan dalam 5 mL aquadest, jika arut maka reaksi sudah sempurna.
4. Uapkan etanol yang tersisa sampai habis, dinginkan, dan tambahkan 75 mL aquadest kemudian panaskan sampai semua sabun larut.

Hasil Pengamatan:

No.	Sampel	Perlakuan	Pengamatan



2. Identifikasi Kadar Kolesterol dalam Darah

Alat dan Bahan:

- | | |
|-----------------|--|
| - Plat tetes | - Serum darah manusia normal dan kolesterol tinggi |
| - Pipet tetes | - Reagen kit untuk kolesterol |
| - Tabung reaksi | |
| - Gelas kimia | |

Prosedur:

1. Metode identifikasi kadar kolesterol dalam darah berupa metode Koletero oksidase/peroksidase
2. Adanya 3 enzimkolesterol esterase (CE), kolesterol oksidase (CO), dan peroksidase (POD), pada campuran fenol dan 4-aminoantipirin (4-AA) akan bereaksi dengan hidrogen peroksid menghasilkan warna merah quinoneimine yang sebanding dengan konsentrasi kolesterol dalam sampel.
3. Prosedur:

Mode= END-POINT

Pipet ke dalam tabung reaksi	Blanko (μL)	Standar (μL)	Sampel (μL)
Campur dan inkubasi selama 5 menit pada 37°C atau 10 menit suhu ruang pada (20-30)°C. Baca hasil pada panjang gelombang 505 nm.			

Hasil Pengamatan:

No.	Sampel	Kadar Kolesterol	Kesimpulan
1	Normal		
2	Pasien		

3. Identifikasi Kadar Keton dalam Urin

Alat dan Bahan:

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| - Tabung reaksi dan rak | - Urin |
| - Pipet tetes | - Larutan uji Rothera |
| - Pipet ukur | |

Prosedur:

1. Penentuan kadar keton dalam urin menggunakan Metode Rothera
2. Siapkan 2 buah tabung reaksi dan beri nama tabung A dan B
3. Tabung A diisi dengan 5 mL urin normal
4. Tabung B diisi dengan 5 mL urin patologis (penderita DM)



5. Tambahkan 3 tetes pereaksi Rothera ke dalam masing-masing tabung

Hasil Pengamatan:

No.	Sampel	Kadar Keton	Kesimpulan
1	Normal		
2	Pasien		

4. Uji Mureksida

Asam urat dioksidasi oleh asam nitrat pekat membentuk asam dialurat dan alloksan. Zat-zat terkondensasi dengan amoniak membentuk mureksida (amonium furfurat) yang berwarna ungu kemerahan

Prosedur:

1. Letakkan sedikit (0,1 gr) kristal asam urat dalam sebuah cawan petri.
2. Tambahkan 3 tetes asam nitrat, lalu panaskan sehingga kering pada penangas uap. Perhatikan warna merah yang timbul.
3. Setelah dingin tambahkan 1 tetes amonik ener (1/100).
4. Perhatikanlah warna yang terbentuk.

5. Test Nitroprussida (Rothera)**Prosedur:**

1. Bubuhkan pada 5 mL urin, kristal ammonium sulfat sampai jenuh.
2. Tambahkan 2-3 tetes Na-nitroprussida 5% yang baru dibuat dan 1-2 mL ammonium hidroksida pekat, campur dan biarkan selama setengah jam.
3. Terbentuknya warna ungu permanganat menyatakan adanya zat-zat keton. Warna coklat tidak berarti positif

III. TUGAS PENDAHULUAN

1. Jelaskan jenis hidrolisis lipid!
2. Sebutkan struktur kimia penyusun lipid!
3. Sebutkan kadar kolesterol darah yang normal pada wanita dan pria dewasa!
4. Jelaskan kesimpulan hasil pengamatan Anda pada percobaan kali ini!



DAFTAR PUSTAKA

- 3-Qualitative Tests of Cholesterol. Available in
https://uomustansiriyah.edu.iq/media/lectures/6/6_2020_03_15!02_22_40_PM.pdf
- Abibah, U. (2013). Lowry vs Biuret Final (1). Available in
<https://www.slideshare.net/UmiBiee/lowry-vs-biuret-final-1>.
- Abousalah, K. and Alnaser, A. (1996). Principles of Practical Biochemistry.
- Alexander, R. R. dan Griffiths, J. M. 1993. *Basic Biochemical Methods*, 2nd ed., A. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Amrita Edu (2022). Qualitative Analysis of Carbohydrates. Available in
<https://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=63&sim=631&cnt=1>.
- Ataya, F. S. (2007). Practical Biochemistry. AlRoshd Publisher, Riyadh, Saudi Arabia.
- Ataya, F. S. and Al-Anazi, M. (2019). Practical Note General Biochemistry. Available in
https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/bch202_practical-modefiedff-converted.pdf
- Caton, K. A. (2011). Mucic and Barfoeds Test. Available in
<https://www.slideshare.net/katealyssacaton/mucic-and-barfoeds-test>
- Chemistry of Protein Assays. Available in <https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>.
- Chhabra, N. (2014). Qualitative Tests for Carbohydrate. Available in
<https://www.slideshare.net/namarta28/qualitative-tests-for-carbohydrates-35884145>.
- Colowick, S. P. dan Kaplan, N. O. 1957. *Methods in Enzymology*, Vol. V, Acad. Press Inc., New York, halaman 448-450.
- DNA & RNA Extraction, Isolation & Analysis. Available in
<https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis.html>.
- Frais, F., 1971. *Practical Biochemistry in Introductory Course*, 1st ed., Butterworth & Co.. Ltd., London, 23-25.
- Frais, F. 1971. *Practical Biochemistry in Introductory Course*, 1st ed., Butterworth & Co., Ltd., London, 104
- Harrow, B., et al. 1960. *Laboratory Manual of Biochemistry*, 5th ed., W. B. Sanders Comp., New York, 1-4.
- Harrow, B. et al., 1960. *Laboratory Manual of Biochemistry*, 5th ed., W. B. SandersComp., New York, halaman 13-74
- Heikrjum, J., Kishor, R.. Mazumder, P. B. (2020). The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. *Open Access Peer-Reviewed Chapter*, 1-12. DOI: 10.5772/intechopen.92206.



- Holme, D. J. dan Peck, H. 1993. *Analytical Biochemistry*, 2nd ed., Longman Scientific and Technical, New York.
- Kumar, P. (2021). Qualitative and Quantitative Tests for Amino Acids and Proteins. Available in <https://www.biologydiscussion.com/proteins/qualitative-and-quantitative-tests-for-amino-acids-and-proteins/13065>.
- Kumar, P. (2021). Qualitative and Quantitative Tests for Lipids. Available in <https://www.biologydiscussion.com/lipids/tests/qualitative-and-quantitative-tests-for-lipids/13050>
- Laboratory Procedure Manual. Available in https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes_03_04/l13_c_met_lipids.pdf
- Lever, M. A., Torti, A., Eichenbusch, P., Michaud, A. B., Šantl-Temkiv, T., Jørgensen, B. B. (2015). A Modular Method for The Extraction of DNA and RNA, and the Separation of DNA Pools from Diverse Environmental Sample Types. *Frontiers in Microbiology*, 1-25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00476>.
- Mathews, C. K. and Holde, K. E., 1990. *Biochemistry*. The Benjamin/Cumming Publishing Co., Redwood City, USA.
- Memije-Cruz, L. (2018). Qualitative and Quantitative Tests for Lipids. Available in <https://www.slideshare.net/memijecruz/qualitative-and-quantitative-tests-for-lipids>
- Mucic Acid Test – Principle, Procedure, Result, Uses. Available in <https://noteshippo.com/mucic-acid-test-protocol-principle-procedure-result-applications/>.
- Nelson Somogyi Method for Determination of Reducing Sugars. Available in <https://microbiologynote.com/nelson-somogyi-method-for-determination-of-reducing-sugars/>.
- Online Biological Notes for Students. (2018). Picric Acid Test (for the detection of reducing sugars). Available in <https://www.biosciencenotes.com/picric-acid-test-for-the-detection-of-reducing-sugars>.
- Protein Determination Modified Lowry Method. Available in https://www.sigmadatalich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-quantitation/protein-determination?gclid=Cj0KCQjwl92XBhC7ARIsAHLI9amxv8eJ-2woH7ptdZmQady0Cy3O1yKWv-9m2iyaV7hLiv4Jry6lg4kaAkX-EALw_wcB.
- Protein Quantitation using a UV-Visible Spectrophotometer – Lowry Method. Available in <https://www.jasco-global.com/solutions/protein-quantitation-using-a-uv-visible-spectrophotometer-lowry-method>.
- Raghu, B. (2015). Practical Biochemistry for Medical Students. Jaypee Brothers. Available in <https://www.jaypeedigital.com/eReader/chapter/9788180611063/ch1>
- Samanthi (2019). Difference Between Bradford and Lowry Protein Assay. Available in <https://www.differencebetween.com/difference-between-brADFORD-and-lowry-protein-assay/>.



- Saumya S. (2022). Carbohydrate: Tests and Estimation Biochemistry. Available in <https://www.biologydiscussion.com/carbohydrates/carbohydrate-tests-and-estimation-biochemistry/45587>
- Singh, S. P. (2007). Practical Manual of Biochemistry. 6th edition, CBS Publishers & Distributors
- Supriya, N. (2020). Qualitative Analysis of Lipids. Available in <https://biologyreader.com/qualitative-analysis-of-lipids.html>
- Tiwari, A. (2015). Practical Biochemistry. LAP Lambert Academic Publishing, ISBN: 978-3-659-75716-7.
- Turula, V. E., Gore, T., Singh, S., Arumugham, R. G. (2010). Automation of the Anthrone Assay for Carbohydrate Concentration Determinations. *Anal. Chem.*, 1;82(5):1786-92. doi: 10.1021/ac902664x.