

# **PENUNTUN PRAKTIKUM BIOKIMIA UMUM**



**Disusun oleh:  
Dr. Prima Endang Susilowati, M.Si**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHAN ALAM  
UNIVERSITAS HALU OLEO  
KENDARI  
2019**

## DAFTAR ISI

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Daftar Isi                                                                                                | ii  |
| Format Laporan Sementara                                                                                  | iii |
| Format Laporan Praktikum Biokimia                                                                         | iv  |
| Tata Tertib Praktikum Biokimia                                                                            | v   |
| Percobaan I      Identifikasi karbohidrat                                                                 | 1   |
| Percobaan II      Hidrolisis karbohidrat                                                                  | 4   |
| Percobaan III      Ekstraksi dan pemisah lipid kompleks                                                   | 7   |
| Percobaan IV      Karakterisasi lipid                                                                     | 9   |
| Percobaan V      Identifikasi protein                                                                     | 12  |
| Percobaan VI      Isolasi kasein susu dan penentuan kadar protein                                         | 15  |
| Percobaan VII      Hidrolisis protein dan identifikasi asam amino                                         | 17  |
| Percobaan VIII      Enzim invertase (konsentrasi enzim dan jumlah produk yang dihasilkan)                 | 20  |
| Percobaan IX      Pengaruh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, suhu, dan pH terhadap aktivitas enzim | 23  |
| Percobaan X      Vitamin dan Mineral                                                                      | 26  |
| Pustaka                                                                                                   | 28  |

## FORMAT LAPORAN SEMENTARA

- I. Judul Praktikum
- II. Tujuan Praktikum
- III. Cara Kerja dan Hasil Praktikum

| No | Cara Kerja (diagram alir) | Hasil |
|----|---------------------------|-------|
|    |                           |       |
|    |                           |       |
|    |                           |       |
|    |                           |       |
|    |                           |       |

- IV. Perhitungan (Bila Ada)
- V. Kesimpulan

Kendari, .....

Kelompok Praktikum

Nama Praktikum

## **FORMAT LAPORAN PRAKTIKUM BIOKIMIA**

- I. Judul Praktikum
- II. Tujuan Praktikum
- III. Tinjauan Pustaka (Teori yang melandasi praktikum)
- IV. Alat dan Bahan
- V. Cara Kerja (Diagram Alir)
- VI. Hasil Praktikum
- VII. Pembahasan (Penjelasan kesesuaian teori dan hasil praktikum)
- VIII. Kesimpulan
- IX. Jawab pertanyaan (bila ada)
- X. Pustaka (jumlah buku/jurnal yang dijadikan acuan minimal 3)

Cara penulisan pustaka:

Nama penulis, (Tahun penerbitan), Judul Buku/jurnal, Jilid, Edisi, Penerbit,  
Kota Penerbit, Halaman yang diacu

## **TATA TERTIB PRAKTIKUM BIOKIMIA**

1. Praktikan harus hadir tepat pada waktu yang telah ditentukan. Apabila peserta terlambat lebih dari 15 menit dari waktu tersebut, maka praktikan tidak diperkenankan mengikuti praktikum pada hari tersebut
2. Selama mengikuti praktikum, praktikan harus memakai jas praktikum dan sepatu
3. Setiap praktikan diwajibkan membuat laporan praktikum sesuai dengan format laporan
4. Alat yang telah dipakai dikembalikan dalam keadaan bersih dan kering
5. Praktikan tidak diperkenankan merokok, minum dan makan di dalam laboratorium. Setiap praktikan harus menjaga kebersihan laboratorium dan bekerja dengan tertib, tenang dan teratur
6. Praktikan harus mengembalikan bahan kimia yang tidak digunakan ke tempat semula dan tutup botol jangan tertukar
7. Praktikan yang merusak, memecahkan, dan menghilangkan alat diwajibkan mengganti alat tersebut.
8. Praktikan harus membawa lap kasar, lap halus, sikat tabung, pipet tetes, tabung reaksi, sabun, masker dan zat untuk keperluan praktikum yang telah ditentukan
9. Praktikan yang tidak mematuhi peraturan di atas maka tidak diperkenankan mengikuti praktikum
10. Hal-hal yang belum diatur dalam tata tertib ini, akan ditentukan kemudian.

# PERCOBAAN I

## IDENTIFIKASI KARBOHIDRAT

### Pengantar

Karbohidrat adalah polihidroksi aldehyd atau polihidroksi keton. Di alam, karbohidrat dihasilkan melalui proses fotosintesis. Dengan bantuan sinar matahari dan klorofil, maka  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$  diubah menjadi karbohidrat. Hasil fotosintesis ini mengalami polimerisasi menjadi pati dan senyawa makromolekul yang menjadi cadangan makanan pada tanaman. Ada tiga bentuk karbohidrat yang penting, yaitu monosakarida, oligosakarida dan polisakarida.

Uji Benedict. Uji ini berdasarkan reduksi  $\text{Cu}^{2+}$  menjadi  $\text{Cu}^+$ , yang mengendap sebagai  $\text{Cu}_2\text{O}$  berwarna merah bata. Pada proses reduksi kupri dalam suasana alkalis biasanya ditambahkan zat pengompleks (sitrat), hal ini dilakukan untuk mencegah pengendapan  $\text{CuCO}_3$  dalam larutan natrium karbonat.

Uji Iodin. Polisakarida dengan penambahan iodin akan membentuk kompleks adsorpsi berwarna yang spesifik. Amilum/pati dengan iodin berwarna biru, dekstrin menghasilkan warna merah anggur, sedangkan glikogen dan sebagian pati terhidrolisis menghasilkan warna merah coklat.

Uji Barfoed. Ion  $\text{Cu}^{2+}$  (dari pereaksi Barfoed) dalam suasana asam akan direduksi lebih cepat oleh gula reduksi monosakarida daripada disakarida dan menghasilkan  $\text{Cu}_2\text{O}$  berwarna merah bata.

Oksidasi pati dengan periodat. Penentuan jumlah cabang pada pati berdasarkan kenyataan  $\text{IO}_4^-$  tidak akan memutus ikatan C-C, dimana satu dari dua atom C yang berdekatan berikatan glikosidik, hanya residu terminal pati yang menghasilkan  $\text{HCOOH}$  pada oksidasi menjadi cabang diperoleh dari % glukosa unit dalam ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosidik (%cabang)

$$\frac{\text{Mol HCOOH/berat}}{\text{Mol glukosa/berat}} \times 100\%$$

Mol glukosa/berat

Juga dapat dihitung jumlah rata-rata untuk glukosa yang terikat dalam ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik antara cabang, daerah ini disebut segmen. Jumlah rata-rata unit glukosa per segmen

Mol glukosa / berat

2 (mol HCOOH/berat)

### **Alat dan Bahan**

Alat : Pipet tetes, pipet ukur 5 mL, tabung reaksi, gelas ukur

Bahan : reagen benedict, larutan gula, larutan pati, HCl 6N, NaOH 6N, reagen iodin, NaOH 0,005M, NaIO<sub>4</sub> 0,3M, phenolptalin 1%, tepung pati

#### Reagen iodin 0,01M

Larutkan 1,26 gram iod (I<sub>2</sub>) dan 2 g Kalium iodida (KI) dalam air dan encerkan sampai 1L

#### Reagen Larutan Benedict

Larutkan 173 kristal na-sitrat dan 100 g na-karbonat anhidrat di dalam 800 mL air. Aduk dan saring. Selanjutnya tambahkan 17,3 g tembaga sulfat yang telah dilarutkan dalam 100 mL air. Buat volume total 1 L dengan aquades

#### Reagen Barfoed

Larutkan 13,3 g kristal tembaga asetat di dalam 200 mL aquades, saring (bila perlu). Selanjutnya tambahkan 1,9 mL asam asetat glasial. Pereaksi dibuat baru setiap akan digunakan

### **Prosedur**

#### Uji Benedict.

Tabung 1, 2 dan 3 diisi dengan 5 mL reagen benedict. Pada tabung 1 ditambahkan 8 tetes aquades; pada tabung 2 ditambahkan 8 tetes larutan gula 1%; dan pada tabung 3 ditambahkan 8 tetes larutan pati 1%, selanjutnya dikocok. Tempatkan semua tabung dalam penangas air mendidih selama 3 menit. Selanjutnya didinginkan dan bandingkan hasilnya.

#### Uji Iodin

Tabung 1, 2 dan 3 diisi dengan 3 mL larutan pati. Pada tabung 1 tambahkan 2 tetes aquades; pada tabung 2 tambahkan 2 tetes HCl; dan pada tabung 3 ditambahkan 2 tetes NaOH. Sebagai pembanding masukan 3 mL gula dalam tabung ke-4. Kocok masing-masing tabung, selanjutnya tambahkan 5 tetes reagen iodin ke dalam masing-masing

tabung. Panaskan ketiga tabung, kemudian dinginkan. Amati perubahan warna yang terjadi.

#### Oksidasi Pati dengan periodat

Larutkan 0,2 gram pati dengan 25 mL aquades. Panaskan campuran dalam penangas air (untuk mempercepat kelarutan). Tambahkan ke dalam 10 larutan  $\text{NaIO}_4$  dan aquades sampai volume 50 mL. Sediakan blanko  $\text{NaIO}_4$  tanpa larutan pati (larutan pati diganti air). Simpan ditempat gelap.

Pada selang waktu 1, 2, 3 dan 24 jam setelah penambahan  $\text{NaIO}_4$ . Asam format yang terbentuk dititrasi dengan  $\text{NaOH}$  0,005M, dengan cara 10 mL sampel dan blanko ditambah 0,05 mL etilen glikol (inkubasi 10 menit dalam gelap), selanjutnya tambahkan 0,5 mL phenolphatlin 1%. Sampel dan blanko dititrasi dengan  $\text{NaOH}$  0,005M.

#### **Pertanyaan dan Tugas**

1. Hitung mikromol asam format yang terbentuk
2. Buat grafik antara mikromol asam format vs waktu
3. Hitung % ikatan glikosidik ( $\alpha$ -1,6) dan panjang rata-rat rantai per segmen

## PERCOBAAN II

### HIDROLISIS KARBOHIDRAT

#### Pengantar

Polisakarida mempunyai fungsi metabolik selain fungsi struktural dalam tumbuhan dan hewan. Pati sebagai hasil akhir proses fotosintesis disimpan dalam tumbuhan, sedangkan glikogen disimpan dalam hewan dan bakteri. Pati dan glikogen adalah polimer dari D-glukosa yang terikat melalui ikatan  $\alpha$ -glikosidik, dengan berat molekul bervariasi dari beberapa ribu sampai jutaan. Pati adalah campuran dua polisakarida, yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa terangkai dari D-glukosa dengan ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik, sehingga tidak bercabang. Sedangkan amilopektin yang merupakan bagian terbesar (70% - 90%) dari pati, terdiri dari ikatan  $\alpha$ -1,4 dan  $\alpha$ -1,6 glikosidik, sehingga bentuknya bercabang disamping rantai lurus amilopektin. Amilopektin mengandung 1 unit terminal glukosa (*end group*) untuk setiap 25 unit glukosa.

#### Alat dan Bahan

Alat : tabung reaksi, spektrofotometer, gelas ukur, pipet volume, *waterbath*, timbangan

Bahan : larutan glukosa standar 0,5M; HCL 4N, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M

##### Reagen Nelson A:

12,5 gram Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidrous; 12,5 gram K-Na-tartrat; 10 gram NaHCO<sub>3</sub> dan 100 gram Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrous dilarutkan dalam 400 mL aquades, diencerkan sampai 500 mL

##### Reagen Nelson B:

Larutkan 15 gram CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dalam 90 mL aquades mengandung 1-2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Encerkan sampai 100 mL.

Reagen Nelson: campuran reagen Nelson A dan B (50:2)

##### Reagen Arsenomolibdat:

Larutkan 25 gram amonium amolibdat dalam 450 mL aquades, tambahkan 21 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sambil diaduk. Larutkan 3 gram Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dalam 25

mL aquades, lalu tuang larutan ini ke dalam larutan molibdat, aduk dan inkubasi 37°C selama 24 jam. Reagen disimpan dalam botol berwarna.

## Prosedur

### Hidrolisis dengan asam

Larutkan 0,5 gram pati dalam 10 mL aquades. Pipet 5 mL larutan pati dan tambahkan 5 mL HCl 4N. Setelah dikocok, segera pipet 0,5 mL larutan tersebut ke dalam tabung berisi 2,5 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M, campur dan encerkan sampai 10 mL dengan aquades. Simpan sisa larutan pati-HCl dalam *boiling water-bath*. Setelah 15, 30, 45, 60 menit pipet 0,5 mL larutan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 2,5 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M, campur dan encerkan sampai 10 mL dengan aquades.

Larutan blanko: 0,5 mL H<sub>2</sub>O + 2,5 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M + 7 mL H<sub>2</sub>O

| Tabung | Hidrolisat |          |          |          |          |
|--------|------------|----------|----------|----------|----------|
|        | 0 menit    | 15 menit | 30 menit | 45 menit | 60 menit |
| 1      | 1 mL       |          |          |          |          |
| 2      |            | 1 mL     |          |          |          |
| 3      |            |          | 1 mL     |          |          |
| 4      |            |          |          | 1 mL     |          |
| 5      |            |          |          |          | 1 mL     |

Blanko: 1 mL larutan blanko

Tambahkan 1 mL reagen nelson pada masing-masing tabung, taruh tabung pada *boiling water bath* selama 20 menit. Dinginkan, selanjutnya tambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat pada masing-masing tabung tersebut. Encerkan sampai volume akhir 10 mL, aduk kembali. Baca absorbansinya pada 660 nm.

| Tabung     | mL glukosa standar (0,5M) | mL H <sub>2</sub> O |
|------------|---------------------------|---------------------|
| 1          | 0,1                       | 0,9                 |
| 2          | 0,2                       | 0,8                 |
| 3          | 0,4                       | 0,6                 |
| 4          | 0,6                       | 0,4                 |
| 5          | 0,8                       | 0,2                 |
| 6          | 1                         | 0                   |
| 7 (blanko) | 0                         | 1                   |

Tambahkan 1,0 mL reagen Nelson pada ke 7 tabung tersebut, simpan dalam *boiling water bath* selama 20 menit. Dinginkan, selanjutnya tambahkan 1 mL reagen

arsenomolibdat pada masing-masing tabung tersebut. Encerkan sampai volume akhir 10 mL, aduk kembali. Baca absorbansinya pada 660 nm.

Hidrolisis dengan amilase

| Tabung                    | 1   | 2   | 3 |
|---------------------------|-----|-----|---|
| Ludah diencerkan (1:4) mL | 0,5 | 0,8 | 1 |
| Aquades (mL)              | 0,5 | 0,2 | 0 |
| Amilum 15 (mL)            | 2   | 2   | 2 |

Blanko : aquades 2,5 mL + 0,5 mL ludah

Simpan larutan sampel dan blanko dalam *boiling water bath* selama 60 menit, selanjutnya didinginkan dalam air dingin 10 menit untuk menghentikan reaksinya.

Ambil 1 mL larutan sampel dan blanko. Tambahkan 1 mL reagen nelson pada masing-masing tabung, taruh tabung pada *boiling water bath* selama 20 menit. Dinginkan, selanjutnya tambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat pada masing-masing tabung tersebut. Encerkan sampai volume akhir 10 mL, aduk kembali. Baca absorbansinya pada 660 nm. Larutan standar gunakan seperti pada percobaan Hidrolisis dengan asam.

## **PERCOBAAN III**

### **EKSTRAKSI DAN PEMISAHAN LIPID KOMPLEKS**

#### **Pengantar**

Komposisi utama jaringan adipose adalah lemak. Jaringan lain yang kaya lipid seperti otak, relatif mengandung sedikit lemak netral. Komposisi lipid utama dari jaringan tersebut adalah lipid kompleks seperti fosfolipid dan kolesterol. Isolasi lipid kompleks sangat sulit karena:

- a. gugus lipid sering mengandung sifat kimia yang serupa
- b. lipid sering tidak stabil dalam keadaan di laboratorium, karena dapat teroksidasi secara spontan oleh udara
- c. kebanyakan lipid larut dalam pelarut bebas air tetapi tidak larut dalam air.

Kelarutan lipid dipengaruhi oleh adanya lipid lain.

#### **Alat dan Bahan**

Alat : Blender, corong pisah, bekerglas, gelas ukur, erlenmeyer, timbangan

Bahan : otak sapi/kambing, aseton, etanol 95%, kloform:etanol (1:1), eter

#### **Prosedur**

##### Fraksi I

Tambahkan 4 volume aseton (200 mL) pada 50 gram otak, blender 1 menit. Pindahkan suspensi yang terjadi dalam bekerglass, bilas blender dengan aseton 25 mL. Campur hasil bilasan dengan suspensi, diamkan homogenat selama 5 menit, sambil kadang-kadang diaduk. Saring suspensi. Residu diblender kembali dengan 100 mL aseton dan setelah didiamkan selama 5 menit (seperti pekerjaan sebelumnya). Filtrat dicampur dengan filtrat sebelumnya (FRAKSI I)

Filtrat I dihilangkan asetonnya dengan disestilasi menggunakan penangas air mendidih. Dinginkan larutan sisa (larutan yang tertinggal setelah destilasi, bebas aseton) dengan air mengalir. Kumpulkan kolesterol yang terjadi dengan penyaringan. Keringkan di udara terbuka, timbang dan simpan untuk percobaan berikutnya.

##### Fraksi II

Tempatkan residu (dari percobaan sebelumnya) ke dalam bekerglass dan ekstraksi dengan 200 mL eter. Biarkan campuran selama 5 menit, kadang-kadang diaduk. Saring,

filtrat encer dipekatkan hingga volumenya 50 mL (FRAKSI II), residu disimpan untuk isolasi fraksi III.

Tuang ekstrak eter dalam bekerglass yang berisis 100 mL aseton, aduk. Kumpulkan endapan yang terbentuk (fraksi II), filtrat jangan dibuang. Endapan yang diperoleh segera ditimbang, selanjutnya larutkan dalam campuran kloroform:metanol (3:1), simpan untuk percobaan selanjutnya.

### Fraksi III

Ekstraksi residu dari pembuatn fraksi II dengan etanol mendidih (50 mL) dalam keadaan panas saring suspensinya. Filtrat dibuang, endapan didinginkan. Endapan yang terbentuk ditimbang dan dilarutkan dalam campuran kloroform:metanol (3:1)

### **Tugas dan Pertanyaan**

1. Hitung kadar semua fraksi dalam %
2. Apa yang dimaksud dengan jaringan adiposa?

## PERCOBAAN IV

### KARAKTERISASI LIPID

#### Pengantar

Umumnya minyak/lemak tidak larut dalam air, tetapi sedikit larut dalam alkohol dan larut sempurna dalam pelarut organik (eter, kloroform, aseton, dll). Minyak dalam air akan membentuk emulsi yang tidak stabil, bila dibiarkan maka kedua cairan akan memisah menjadi 2 lapisan. Agar terbentuk emulsi yang stabil diperlukan suatu zat pengemulsi yang disebut *emulsifier* yang berfungsi menurunkan tegangan permukaan antara kedua fase cairan.

#### Alat dan Bahan

Alat : tabung reaksi, gelas ukur, timbangan, gelas kromatografi, pipet kapiler, erlenmeyer 250 mL bertutup, buret

Bahan : kloroform,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, asam asetat anhidrat, kertas kromatografi, eluen (heksan: eter: asam asetat = 30:10:4) atau  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $\text{NH}_4\text{OH}$  pekat (75:25:1), larutan pati 1%, larutan KI 15%, Na-tiosulfat 0,1N, pereaksi Iod Hanus, KOH alkoholis 5,6%; HCl 1N, indikator pp (fenolftalin).

#### Prosedur

##### Uji Kelarutan Lipid

Siapkan 5 tabung reaksi bersih dan kering. Berturut-turut isilah dengan aquades, alkohol 96%, eter, kloroform,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5% sebanyak 1 mL. Tambahkan pada setiap tabung 2 tetes fraksi I, kocok sampai homogen,biarkan beberapa saat dan amati.

Pengujian ini dilakukan juga terhadap fraksi II dan III

##### Uji pembentukan emulsi.

Siapkan 3 tabung reaksi bersih dan kering.

Tabung 1 : 2 mL aquades + 2 tetes Fraksi I

Tabung 2 : 2 mL aquades + 2 tetes Fraksi I + 2 tetes  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5%.

Abung 3 : 2 mL aquades + 2 tetes Fraksi I + 2 tetes larutan sabun

Kocok sampai homogen,biarkan beberapa saat dan amati.

Pengujian ini dilakukan juga terhadap fraksi II dan III

### Uji Salkowski

Sediakan 2 tabung reaksi

Tabung I : 1 mL kloroform

Tabung II : 10 mL fraksi I dalam 1 mL kloroform

Tambahkan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat pada kedua tabung tersebut melalui dinding tabung, hingga lapisan asam sulfat di bagian bawah. Amati warna yang terbentuk.

### Uji Libermann-Buchard

Sediakan 2 tabung reaksi

Tabung I : 2 mL kloroform

Tabung II : 5-15 mg fraksi I dalam 2 mL kloroform

Tambahkan 1 mL asam asetat anhidrat, aduk. Selanjutnya tambahkan 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat pada kedua tabung tersebut melalui dinding tabung. Amati warna yang terbentuk setelah diamkan 30 menit.

### Kromatografi kertas

Sampel sebanyak 3 mikroliter ditotolkan pada kertas kromatografi. Sampel yang diuji:

Fraksi I (0,01 gram dalam kloroform:etanol= 3:2)

Fraksi II (1% dalam kloroform:metanol= 3:1)

Fraksi III (1% dalam kloroform:metanol= 3:1)

Elusi dengan eluen (heksan: eter: asam asetat = 30:10:4) atau  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $\text{NH}_4\text{OH}$  pekat (75:25:1). Setelah elusi selesai, keringkan di udara, selanjutnya semprot dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50% dan keringkan dalam oven sampai timbul noda hitam. Hitung  $R_f$ .

### Penentuan Bilangan Iod

Lemak mengandung bermacam-macam asam lemak tidak jenuh yang dapat bereaksi dengan iod. Jumlah iod yang diabsorpsi menunjukkan ketidak jenuhan dalam lipid. Angka iod didefinisikan sebagai banyaknya (gram) iod yang diadsorpsi oleh 100 gram lemak/minyak.

### **Prosedur**

Timbang 0,25 gram fraksi I dan tempatkan dalam erlenmeyer berpenutup. Tambahkan 10 mL kloroform, kocok sampai larut. Selanjutnya tambahkan 25 mL pereaksi iod hanus dan diamkan selama 30 menit dengan sekali-sekali dikocok. Tambahkan 10 mL

larutan KI 15% aduk sampai rata. Kemudian tambahkan 100 mL air yang telah dididihkan sebelumnya dan telah dingin untuk mencuci sisa iodium yang terdapat pada tutup erlenmeyer. Titrasi iodium dengan Na-tiosulfat 0,1N sampai warna kuning pada larutan hilang. Segera tambahkan 2 mL larutan pati 1% (sebagai indikator) dan titrasi diteruskan sampai berwarna biru. Jika titik akhir titrasi hampir tercapai, tutup erlenmeyer dan kocok kuat sehingga semua iodium dapat diikat oleh KI. Teruskan sampai titik akhir tercapai. Lakukan titrasi blanko. Hitung banyaknya (gram) iod yang diadsorpsi oleh 100 gram lipid. Ini adalah angka iod. Untuk larutan blanko gunakan aquades dan diperlakukan sama seperti sampel.

Catatan: Jumlah mL Na-tiosulfat setara dengan iod yang adsorpsi oleh lemak

#### Penentuan Angka penyabunan

Lemak dapat terhidrolisis, menghasilkan asam lemak dan gliserol. Proses hidrolisis dapat dilakukan dengan penambahan basa kuat (NaOH, KOH). Proses hidrolisis minyak oleh larutan alkali disebut reaksi penyabunan (saponifikasi). Angka penyabunan dapat digunakan untuk menentukan berat molekul lemak secara kasar. Angka penyabunan dinyatakan sebagai banyaknya (mg) KOH yang dibutuhkan untuk menyabunkan satu gram lemak.

Angka Penyabunan =  $[(tb-ts) \times N \text{ HCl} \times r \text{ KOH}] / \text{berat sampel (gram)}$

Keterangan: tb (mL titrasi blanko); ts (mL titrasi sampel)

#### **Prosedur**

Tempatkan fraksi I dalam erlenmeyer 250 mL. Tambahkan 25 mL KOH alkoholis, refluks dengan penangas uap (sekitar 30 menit) atau sampai penyabunan sempurna (dengan cara teteskan hasil refluks dalam tabung reaksi berisi air, bila larutan bening menunjukkan penyabunan sudah sempurna).

Blanko refluks adalah 25 mL KOH alkoholis.

Setelah 25 mL sampel dan blanko dingin, titrasi menggunakan HCl (indikator pp 5 tetes).

## **PERCOBAAN V**

### **UJI IDENTIFIKASI PROTEIN**

#### **Pengantar**

Protein merupakan komponen utama dalam semua sel hidup, baik tumbuhan maupun hewan. Pada sebagian jaringan tubuh, protein merupakan komponen terbesar setelah air. Kira-kira lebih dari 50% berat kering sel terdiri dari protein. Protein adalah senyawa organik kompleks yang terdiri dari unsur karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen. Banyak pula protein mengandung belerang, fosfor, tembaga, besi.

Secara kimiawi, protein merupakan senyawa polimer yang tersusun dari asam-asam amino, sebagai monomernya. Asam-asam amino terikat satu sama lain dengan ikatan peptida, yaitu ikatan antara gugus karboksil ( $-\text{COOH}$ ) asam amino yang satu dengan gugus amino ( $-\text{NH}_2$ ) dari asam amino yang lain.

#### **Alat dan Bahan**

Alat : tabung reaksi, cawan porselin, kaca objek

Bahan : telur, NaOH 10%, NaOH 40%, Pb asetat 5%, HCl 10%, HCl pekat, kertas lakmus, alkohol 96%, kloroform,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  jenuh, NaCl 5%,  $\text{BaCl}_2$  5%,  $\text{CaCl}_2$  5%,  $\text{MgSO}_4$  5%, TCA (asam trikloroasetat),  $\text{HgCl}_2$  5%,  $\text{CuSO}_4$  5%,  $\text{CuSO}_4$  0,2%, Pb-asetat 5%, ninhidrin 0,1%

#### **Prosedur**

##### Uji adanya unsur C, H, dan O

Masukan 1 mL albumin telur ke dalam cawan porselin. Letakan kaca objek di atasnya, selanjutnya panaskan. Perhatikan adanya pengembunan pada kaca objek, menunjukkan adanya H dan O. Ambil kaca objek, amati bau yang terjadi. Bila tercium bau rambut terbakar, berarti terdapat atom N. Bila terdapat arang, menunjukkan adanya karbon.

##### Uji adanya atom N

Masukan 1 mL larutan albumin telur ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 1 L NaOH 10%, selanjutnya panaskan. Perhatikan bau amonia yang terji, uji menggunakan kertas lakmus yang telah dibasahi air.

#### Uji adanya atom S

Masukan 1 mL larutan albumin telur ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 1 L NaOH 10%, selanjutnya panaskan. Tambahkan 4 tetes Pb asetat 5%. Bila larutan menghitam, berarti terbentuk PbS. Selanjutnya tambahkan 4 tetes HCL pekat (HATI-HATI). Perhatikan bau khas belerang yang bersal dari belerang teroksidasi

#### Uji kelarutan protein

Sediakan 5 tabung reaksi, masing-masing isilah dengan aquades, HCl 10%, NaOH 40%, alkohol 96%, dan kloroform 1 mL. Tambahkan 2 mL larutan albumin telur pada setiap tabung. Kocok kuat, selanjutnya amati kelarutannya.

#### Uji Pengendapan protein dengan garam

Sediakan 5 tabung reaksi, masingmasing isi dengan 2 mL albumin. Pada tabung 1, tambahkan NaCl 5% setetes demi setetes sampai timbul endapan. Pada tabung 2, tambahkan BaCl<sub>2</sub> 5% setetes demi setetes sampai timbul endapan. Pada tabung 3, tambahkan CaCl<sub>2</sub> 5% setetes demi setetes sampai timbul endapan. Pada tabung 4, tambahkan MgSO<sub>4</sub> 5% setetes demi setetes sampai timbul endapan. Pada tabung 5, tambahkan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> jenuh setetes demi setetes sampai timbul endapan. Selanjunya tambahkan kembali larutan gram secara berlebih. Kocok tabung dan amati.

#### Uji pengendapan protein dengan logam dan asam organik

Sediakan 4 tabung reaksi bersih, masing-masing diisi dengan 2 mL albumin telur. Pada tabung 1, 2, 3, 4 berturut-turut tambahkan 10 tetes larutan TCA (asam trikloroasetat), HgCl<sub>2</sub> 5%, CuSO<sub>4</sub> 5%, Pb-asetat 5%. Kocok dan amati.

#### Uji Biuret

Ion Cu<sup>2+</sup> (pereaksi biuret) dalam suasana basa akan berreaksi dengan polipeptda atau ikatan peptda membentuk senyawa kompleks berwarna violet. Reaksi ini positif untuk dua ikatan peptida atau lebih, namun negatif untuk asam amino atau dipeptida.

#### **Prosedur**

Sediakan tabung reaksi bersih, isis dengan 2 mL albumin telur. Tambahkan 1 mL NaOH 10% dan 3 tetes CuSO<sub>4</sub> 0,2%. Campur dan amati.

### Uji Ninhidrin

Semua asam amino atau peptida yang mengandung asam amino bebas akan berreaksi dengan ninhidrin membentuk senyawa kompleks berwarna biru. Namun prolin dan hidroksiprolin menghasilkan senyawa berwarna kuning.

#### **Prosedur**

Sediakan tabung reaksi bersih, isis dengan 2 mL albumin telur. Tambahkan 5 tetes pereaksi ninhidrin. Selanjutnya panaskan pada penangas air mendidih selama 5 menit. Amati perubahan warnanya.

## PERCOBAAN VI

### ISOLASI KASEIN SUSU DAN PENENTUAN KADAR PROTEIN

#### Pengantar

Komposisi air susu binatang tergantung dari jenis binatang, kesehatan dan makanannya. Kasein susu dapat diendapkan dengan enzim proteolitik dalam getah lambung dan usus. Selain itu dapat pula diendapkan dengan asam. Filtratnya (Wei) mengandung laktalbumin, laktosa dan sebagian garam.

Tabel 1. Komposisi Air Susu

| Air susu | Protein (%) | Kasein (%) | Laktalbumin (%) | Lemak (%) | Laktosa (%) | Garam (%) |
|----------|-------------|------------|-----------------|-----------|-------------|-----------|
| Manusia  | 1,5         | 1,0        | 0,5             | 3,5       | 7,0         | 0,2       |
| Sapi     | 3,5         | 3,0        | 0,5             | 3,5       | 5,0         | 0,7       |

Penentuan kadar protein secara biuret berdasarkan pengukuran serapan cahaya oleh ikatan kompleks berwarna ungu. Warna ini terjadi apabila protein berreaksi dengan tembaga dalam lingkungan alkalis.

#### Alat dan Bahan

Alat : Gelas beker, pipet, gelas ukur, pengaduk, timbangan, corong, spektronik 20, kuvet

Bahan : Susu bubuk putih, asam asetat glasial, kertas saring, protein standar (albumin 10 mg/mL),

Reagen Biuret: Larutkan 1,5 gram  $\text{CuSO}_4$  dan 6 gram  $\text{NaKC}_4\text{O}_6$  (Natrium kalium tartrat) kedalam 500 mL aquades dalam labu takar 1L. Tambahkan 300 mL NaOH 10% sambil dikocok. Tambahkan aquades sampai tanda garis.

#### Prosedur

##### Isolasi kasein susu

10 gram susu bubuk dilarutkan dalam 50 mL aquades. Panaskan larutan susu dalam penangas air  $40^\circ\text{C}$ . Tambahkan asam asetat glacial setetes demi setetes, sambil diaduk sampai semua kasein mengendap. Saring endapannya. Keringkan kasein dan timbang. Hitung % kasein yang terdapat dalam susu bubuk pada percobaan anda.

### Penentuan kadar protein

Pipet kedalam tabung reaksi 1 mL larutan protein mengandung 2; 4;6 ;8 ;10 mg/mL. Tambahkan 4 mL reagen Biuret, kocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Baca serapannya pada panjang gelombang 540 nm. Blanko digunakan aquades dan 4 mL reagen biuret. Sampel: 1 mL susu bubuk atau kasein 5 mg/mL. Sampel dan blanko diperlakukan seperti standar.

## **PERCOBAAN VII**

### **HIDROLOSIS PROTEIN DAN IDENTIFIKASI ASAM AMINO**

#### **Pengantar**

Protein bila dihidrolisis secara sempurna, maka akan terbentuk asam-asam amino sebagai hasilnya. Komposisi asam-asam amino dapat ditentukan misalnya dengan cara kromatografi. Hidrolisis protein dapat dilakukan dengan asam, basa maupun enzim protease. Hidrolisis menggunakan asam menyebabkan asam amino triptofan, serin dan treonin mengalami kerusakan apabila pemansan terlalu lama. Hidrolisis menggunakan basa misalnya  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  menyebabkan arginin, sistein, serin dan treonin mengalami kerusakan keseluruhan atau sebagian. Selain itu juga menyebabkan resemisasi pada asam amino, oleh sebab itu hidrolisis protein dengan basa jarang dilakukan.

#### **Alat dan Bahan**

Alat : erlenmeyer, timbangan, autoclave, labu takar, gelas ukur, buret, pH meter, pengaduk magnet, gelas kromatografi, kertas kromatografi, pipet kapiler, alat penyemprot, oven

Bahan : susu bubuk putih,  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, KOH 1N, kertas pH, kapas, larutan ninhidrin 1%, larutan ninhidrin 0,25% dalam aseton, NaOH 40%, Pb-asetat, eluen (n-butanol:asam cuka:air = 25:6:25), asam amino standar

#### **Prosedur**

##### 1. Hidrolisis protein secara kimia

Di dalam erlenmeyer 50 mL, campur 1 gram susu bubuk dengan 10 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Labu disumbat dengan kapas dan diautoclave pada tekanan 15 lb selama 30 menit. Catat warna setelah autoclave. Selanjutnya hidrolisat dinetralkan dengan  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  jenuh sampai suasana netral. Campuran disaring dan endapan dicuci dengan air mendidih (5 mL) sebanyak dua kali. Kumpulkan filtrat dalam labu takar 50 mL, tambahkan air sampai tanda batas.

Sebagai blanko: campur 1 gram susu bubuk dengan 10 mL aquades dan 1 gram  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , selanjutnya dipanaskan agar  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  larut. Labu disumbat dengan kapas dan diautoclave pada tekanan 15 lb selama 30 menit. Catat warna setelah autoclave.

Selanjutnya hidrolisat dinetralkan dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sampai suasana netral. Campuran disaring dan endapan dicuci dengan air mendidih (5 mL) sebanyak dua kali. Kumpulkan filtrat dalam labu takar 50 mL, tambahkan air sampai tanda batas.

**Semua Filtrat hasil hidrolisa disimpan dalam lemari es**

## 2. Identifikasi asam amino

### Uji Ninhidrin

Tambahkan 0,5 larutan ninhidrin 0,1% ke dalam 3 mL filtrat hasil hidrolisis. Panaskan sampai mendidih.

### Uji asam amino mengandung sulfur

1 mL filtrat hasil hidrolisis ditambah dengan 1 mL NaOH 40%. Panaskan selama 3 menit untuk mengubah S-organik menjadi Na-sulfida. Ditambahkan larutan Pb-asetat 3 tetes

### Uji asam amino mengandung inti benzena

3 mL filtrat hasil hidrolisis ditambah dengan 1 mL  $\text{HNO}_3$  pekat. Panaskan sampai larutan berwarna kuning. Dinginkan dan bagi larutan menjadi dua tabung. Satu tabung ditambah amonia  $(\text{NH}_4)\text{OH}$ . Amati warnanya,

## 3. Titrasi potensiometri asam amino

20 mL filtrat hasil hidrolisis, dititrasi dengan NaOH 2 N (dengan menggunakan buret, pH meter, dan pengaduk magnet). Catat setiap perubahan pH dan penambahan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , titrasi dilakukan sampai pH 1,2.

20 mL filtrat hasil hidrolisis, dititrasi dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N (dengan menggunakan buret, pH meter, dan pengaduk magnet). Catat setiap perubahan pH dan penambahan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , titrasi dilakukan sampai pH 12.

Lakukan hal yang sama pada blanko yang telah dihidrolisis.

## 4. Koromatografi kertas asam amino

Teteskan asam amino standar, sampel (hasil hidrolisis protein), dan protein tidak dihidrolisis menggunakan pipet kapiler pada kertas kromatografi. Teteskan berdampingan dengan jarak 2 cm, larutan ujung berada 3 cm dari pinggir kertas. Besar noda jangan melebihi diameter 0,4 cm. Kertas kromatografi jangan tersentuh jari.

Selanjutnya kertas digantung dalam gelas kromatografi yang telah dijenuhkan dengan eluen. Setelah gelas jenuh baru elusi dimulai, dengan cara kromatografi menurun atau

mendaki. Setelah elusi berjalan cukup jauh, kertas kromatografi dikeluarkan. Tandai batas larutan, selanjutnya kertas dikeringkan pada suhu 105-110°C. Selanjutnya kertas disemprot dengan larutan ninhidrin dan dikeringkan kembali pada suhu 105-110°C selama 5 menit. Noda asam amino yang berwarna akan tampak.

### **Tugas dan pertanyaan**

#### Titrasi potensiometri asam amino

1. Buat kurva titrasi asam amino VS mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan NaOH
2. Tetapkan nilai pKa dan titik isoelektrik (dari kurva yang telah diperoleh)

#### Koromatogafi kertas asam amino

1. Hitung nilai RF tiap noda dan catat warnanya
2. Ada berapa macam asam amino yang diperoleh dari hasil hidrolisis protein secara kimia

## **PERCOBAAN VIII**

### **ENZIM INVERTASE**

#### **Pengantar**

Enzim merupakan kelompok protein yang berperan penting dalam proses aktivitas biologi. Enzim berfungsi sebagai katalisator dalam sel dan sifatnya sangat spesifik. Enzim akan kehilangan aktivitasnya akibat panas, asam atau basa kuat, pelarut organik atau sesuatu yang menyebabkan denaturasi protein.

Invertase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis sukrosa menjadi gula invert (campuran glukosa dan fruktosa ekimolar). Invertase ditemukan di dalam ragi. Aktivitas enzim invertase ditentukan dengan menginkubasi substrat dan enzim pada suatu batas waktu tertentu, selanjutnya jumlah gula invert ditentukan.

#### **Alat dan bahan**

Alat : Blender, tabung reaksi, water-bath, gelas beker, erlenmeyer, pipet, gelas ukur, spektrofotometer, timbangan, kapas

Bahan : sukrosa 0,25M; glukosa 0,0025M; fruktosa 0,0025M; larutan protein (albumin 10 mg/mL),  $\text{NaHCO}_3$  0,1M, 50 gram ragi roti (dibawa oleh praktikan), 20 mM bufer asetat pH 4,5

Reagen Biuret: larutkan 1,5 gram  $\text{CuSO}_4$  dan 6 gram  $\text{NaKC}_4\text{O}_6$  (Natrium kalium tartrat) kedalam 500 mL aquades dalam labu takar 1L. Tambahkan 300 mL NaOH 10% sambil dikocok. Tambahkan aquades sampai tanda garis.

Larutan Folin-ciocalteu:

Larutan A : 2% (b/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dalam 0,1M NaOH

Larutan B : 0,5% (b/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 1% Na-K-tartrat

Larutan C : 50 mL larutan A dan 1 mL larutan B (saat akan digunakan)

Larutan Enzim Invertase (persiapan 1 hari sebelum pelaksanaan praktikan)

Blender 50 gram ragi roti dengan 100 mL 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  selama 5 menit. Bubur ragi dituang dalam erlenmeyer dan tutup mulut erlenmeyer dengan kapas.

Inkubasi pada suhu  $40^\circ\text{C}$  selama 24 jam, sentrifuga selama 15 menit. Dekantasi supernatan, catat volumenya, supernatan simpan dalam lemari es.

Larutan enzim encer (buat larutan enzim 1:10; 1:100; 1:1000) simpan untuk percobaan selanjutnya. Sisa larutan enzim invertase jangan dibuang.

## **Prosedur**

### Penentuan konsentrasi enzim secara biuret

**Larutan protein standar.** Pipet ke dalam tabung reaksi 1 mL larutan protein yang mengandung 2; 4; 6; 8; 10 mg/mL. Tambahkan 4 mL reagen Biuret. Kocok dan diamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Baca serapannya pada panjang gelombang 540 nm.

**Larutan Blanko:** digunakan 1 mL aquades + 4 mL reagen Biuret

**Larutan sampel:** larutan enzim tanpa pengenceran dan yang telah diencerkan (1:10; 1:100; 1:1000) masing-masing 1 mL + 4 mL reagen biuret

### Penentuan jumlah produk yang terbentuk oleh kerja enzim protease (pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim)

Ke dalam tabung dipipet 1 mL larutan enzim (larutan enzim tanpa pengenceran dan yang telah diencerkan 1:10; 1:100; 1:1000).

Blanko digunakan 1 mL aquades

Tambahkan pada masing-masing tabung (sampel dan blanko) tambahkan 1 mL buffer pH 4,5.

Pada interval waktu 15 menit tambahkan pada masing-masing tabung (sampel dan blanko) 1 mL sukrosa 0,25M aduk dan inkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Hentikan reaksi dengan menginginkan tabung dalam remukan es selama 10 menit. Selanjutnya tambahkan 4 mL reagen Folin-Ciocalteu. Warna yang terbentuk diperjelas dengan pemanasan dalam penangas air mendidih selama 5 mL. Dinginkan dan tambahkan air hingga volume akhir 10 mL. Baca absorbansinya 540 nm.

**Standar gula invert:** kedalam tabung reaksi dipipet 0,1; 0,4; 0,7; dan 1 mL larutan 0,0025 M gula invert (campuran 0,0025 M glukosa dan 0,0025 M fruktosa , dengan perbandingan 1:1). Buat semua tabung menjadi 2 mL dengan penambahan aquades. Selanjutnya masing-masing tabung ditambahkan 1 mL sukrosa sukrosa 0,25 M dan 1 mL bufer pH 4,5. Tambahkan 4 mL reagen Folin-ciocalteu pada masing-masing tabung. Warna yang terbentuk diperjelas dengan pemanasan dalam penangas air mendidih selama

5 mL. Dinginkan dan tambahkan air hingga volume akhir 10 mL. Baca absorbansinya 540 nm.

# PERCOBAAN IX

## PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT, SUHU DAN pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM

### Pengantar

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, kofaktor dan beberapa faktor lain. Peningkatan suhu seperti pada reaksi kimia umumnya (menggunakan katalis) maka akan terjadi peningkatan laju reaksi, tetapi karena enzim adalah protein maka terdapat batasan suhu yang memungkinkan struktur protein /enzim tetap terjaga, yaitu suhu optimum. Di atas suhu optimum, struktur enzim akan terganggu bahkan terdenaturasi sehingga aktivitasnya akan menurun. Demikian juga dengan perubahan pH, maka pada pH tertentu akan memberikan aktivitas optimum, sedangkan diatas dan di bawah pH tersebut aktivitasnya akan lebih rendah.

### Alat dan Bahan

Alat : pipet volume, gelas ukur, tabung reaksi, spektrofotometri, kuvet, tabung reaksi

Bahan : Enzim invertase (dari percobaan sebelumnya), sukrosa 0,25M; glukosa 0,0025M; fruktosa 0,0025 M; 20 mM bufer asetat pH 4,5

#### Larutan Folin-ciocalteu:

Larutan A : 2% (b/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dalam 0,1M NaOH

Larutan B : 0,5% (b/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 1% Na-K-tartrat

Larutan C : 50 mL larutan A dan 1 mL larutan B (saat akan digunakan)

### Prosedur

#### Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim

Pipet 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 mL sukrosa 0,25 M ke dalam tabung reaksi yang telah diberi nomor. Buat volume tabung menjadi 1 mL dengan penambahan aquades. Tambahkan 1 mL buffer pH 4,5 pada masing-masing tabung, biarkan pada suhu kamar selama 5 menit. Pada selang waktu 15 menit tambahkan 1 mL larutan enzim (berdasarkan data pengenceran enzim yang aktivitasnya paling baik) ke dalam masing-masing tabung, aduk dan biarkan pada suhu kamar selama 15 menit. Hentikan reaksi dengan memasukan tabung reaksi pada remukan es selama 10 menit. Tambahkan 4 mL reagen Folin-ciocalteu

pada masing-masing tabung. Warna yang terbentuk diperjelas dengan pemanasan dalam penangas air mendidih selama 5 mL. Dinginkan dan tambahkan air hingga volume akhir 10 mL. Baca absorbansinya 540 nm.

Blanko : 2 mL aquades + 1 mL buffer pH 4,5 (diperlakukan sama seperti sampel)

#### Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

Pipet sukrosa 0,25 M (volume berdasarkan data konsentrasi substrat yang memberikan aktivitas enzim paling baik) ke dalam tabung reaksi yang telah diberi nomor. Buat volume tabung menjadi 1 mL dengan penambahan aquades. Tambahkan 1 mL buffer pH 4,5 pada masing-masing tabung, biarkan pada suhu kamar selama 5 menit. Pada selang waktu 15 menit tambahkan 1 mL larutan enzim (berdasarkan data pengenceran enzim yang aktivitasnya paling baik) ke dalam masing-masing tabung, aduk dan biarkan pada suhu kamar; 40; 60; 100°C selama 15 menit. Hentikan reaksi dengan memasukan tabung reaksi pada remukan es selama 10 menit. Tambahkan 4 mL reagen Folin-ciocalteu pada masing-masing tabung. Warna yang terbentuk diperjelas dengan pemanasan dalam penangas air mendidih selama 5 mL. Dinginkan dan tambahkan air hingga volume akhir 10 mL. Baca absorbansinya 540 nm.

Blanko : 2 mL aquades + 1 mL buffer pH 4,5 (diperlakukan sama seperti sampel)

#### Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Pipet sukrosa 0,25 M (volume berdasarkan data konsentrasi substrat yang memberikan aktivitas enzim paling baik) ke dalam tabung reaksi yang telah diberi nomor. Buat volume tabung menjadi 1 mL dengan penambahan aquades. Tambahkan 1 mL buffer pH 4,5 dan 7 pada masing-masing tabung, biarkan pada suhu kamar selama 5 menit. Pada selang waktu 15 menit tambahkan 1 mL larutan enzim (berdasarkan data pengenceran enzim yang aktivitasnya paling baik) ke dalam masing-masing tabung, aduk dan biarkan pada suhu kamar selama 15 menit. Hentikan reaksi dengan memasukan tabung reaksi pada remukan es selama 10 menit. Tambahkan 4 mL reagen Folin-ciocalteu pada masing-masing tabung. Warna yang terbentuk diperjelas dengan pemanasan dalam penangas air mendidih selama 5 mL. Dinginkan dan tambahkan air hingga volume akhir 10 mL. Baca absorbansinya 540 nm.

Blanko : 2 mL aquades + 1 mL buffer pH 4,5 (diperlakukan sama seperti sampel)

**Standar gula invert:** kedalam tabung reaksi dipipet 0,1; 0,4; 0,7; dan 1 mL larutan 0,0025 M gula invert (campuran 0,0025 M glukosa dan 0,0025 M fruktosa , dengan perbandingan 1:1). Buat semua tabung menjadi 2 mL dengan penambahan aquades. Selanjutnya masing-masing tabung ditambahkan 1 mL sukrosa sukrosa 0,25M dan 1 mL bufer pH 4,5. Tambahkan 4 mL reagen Folin-ciocalteu pada masing-masing tabung. Warna yang terbentuk diperjelas dengan pemanasan dalam penangas air mendidih selama 5 mL. Dinginkan dan tambahkan air hingga volume akhir 10 mL. Baca absorbansinya 540 nm.

## **PERCOBAAN X**

### **VITAMIN DAN MINERAL**

#### **Pengantar**

Vitamin C atau asam askorbat merupakan zat gizi organik yang diperlukan dalam jumlah kecil pada makanan manusia dan hewan untuk pertumbuhan dan fungsinya yang baik sebagai prekursor esensial berbagai koenzim. Vitamin ini terdapat pada semua hewan dan jaringan tumbuhan tingkat tinggi. Kebanyakan hewan dan hampir semua tumbuhan tingkat tinggi dapat mensintesis vitamin C dari glukosa. Namun vitamin ini tidak terdapat atau diperlukan oleh mikroorganisme. Ketidaksediaan vitamin C pada makanan menyebabkan penyakit defisiensi sariawan.

Selain vitamin, manusia dan hewan juga memerlukan mineral. Unsur tersebut dikelompokkan dalam unsur makro dan mikro. Unsur makro (Ca, Mg, Na, K, P, S, Cl) diperlukan dalam jumlah relatif besar. Sedangkan unsur mikro (Zn, I, Cu, Zn, Co, Mo, Ni, selenium) dibutuhkan hanya dalam jumlah kecil.

#### **Alat dan Bahan**

Alat : Erlenmeyer, buret, gelas ukur, timbangan, oven, piringan porselen, mortar, kertas saring, batang pengaduk, kertas saring

Bahan : Tablet vitamin C, Jus nanas, jus jeruk,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, larutan iod 0,1 N, larutan tiosulfat 0,1 N, tulang, amonium oksalat 1%, pereaksi molibdat, asam asetat encer,  $\text{HNO}_3$  10%,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$  (urea) 10%, ferosulfat

#### **Prosedur**

##### Penentuan kadar vitamin C dengan cara titrasi

Larutkan 300 mg tablet vitamin C dalam 20 mL aquades dingin (yang telah dididihkan). Tambahkan 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N dan segera tambahkan 50 mL larutan iod 0,1 N. Lakukan titrasi dengan larutan tiosulfat 0,1 N. Untuk jus nanas dan jus jeruk diperlakukan sama dengan sampel vitamin C.

Blanko: 20 mL aquades, diperlakukan sama dengan sampel.

Hitung jumlah mL tiosulfat yang digunakan dan tentukan kadar vitamin C dalam sampel.

Diketahui 1 mL tiosulfat 0,1 N setara dengan 8,80 mg vitamin C.

### Penentuan kadar vitamin C dengan cara titrasi

Lakukan proses pengabuan dari 5 gram tulang dalam piringan porselin bersih sampai terbentuk serbuk kelabu. Dinginkan selanjutnya gerus dan panaskan kembali sampai berwarna putih. Dinginkan dan pindahkan ke dalam gelas piala kecil. Tambahkan 50 mL asam nitrat ( $\text{HNO}_3$  10%) dan aduk baik-baik. Panaskan sebentar hingga abu larut, tambahkan 50 mL aquades dan saring. Filtrat ditambah amonia pekat sampai terbentuk endapan putih tabal dari fosfat, selanjutnya lakukan penyaringan. Uji filtrat dan endapan secara terpisah.

Pengujian endapan. Tambahkan asam asetat encer pada endapan di atas kertas saring dan ujilah filtrat ini.

Uji kalsium. Tambahkan 1 mL larutan amonium oksalat 1% ke dalam 2 mL filtrat. Endapan putih yang terbentuk menunjukkan adanya kalsium

Uji fosfat. Ke dalam 1 mL filtrat tambahkan 1 mL urea dan 10 mL pereaksi olibdat, campur. Selanjutnya tambahkan 1 mL larutan ferosulfat. Warna biru yang terbetuk makin lama makin menjadi tua menunjukkan adanya fosfat.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Muliawati S., Purwo A., Wirahadikusuma, M. (1994), Penuntun Praktikum Biokimia, Laboratorium Biokimia, Jurusan Nimia, ITB, Bandung
- Puji Ardiningsih (2008), Penuntun Praktikum Biokimia, Edisi II, Laboratorium Kimia, FMIPA, Universitas Haluoleo, Kendari
- Slamet Sudarmadji (1995), Analisis Bahan Makanan, Gramedia, Yogyakarta
- Yazid, E., Nursanti, L. (2006), Penuntun Praktikum Biokimia untuk Mahasiswa Analis, Penerbit Andi, Yogyakarta