



**PETUNJUK PRAKTIKUM BIOKIMIA
SESUAI BLOK**

Penyusun:

dr. Ika Rahmawati Sutejo

dr. Hairrudin, M.Kes

dr. Sugiyanta, M.Kes

dr. Erfan Efendi, Sp.An

**LABORATORIUM BIOKIMIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2013

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa dengan terselesainya penyusunan Buku Petunjuk Praktikum Biokimia Sesuai Blok. Modul praktikum ini merupakan penyempurnaan modul terdahulu, disusun sesuai pembagian materi yang disesuaikan dengan kompetensi tiap-tiap blok. Evaluasi kurikulum yang dilakukan dengan bantuan proyek HPEQ telah memetakan materi praktikum biokimia sesuai materi tiap-tiap blok.

Dengan buku petunjuk praktikum ini diharapkan peserta didik belajar menyiapkan diri sebagai seorang mahasiswa kedokteran dan calon dokter dengan membangun suatu pemahaman yang komprehensif tentang biokimia sebagai dasar ilmu kedokteran, untuk menunjang karirnya di masa depan. Buku petunjuk praktikum disusun untuk memudahkan dan menunjang kegiatan praktikum mahasiswa supaya tujuan pembelajaran utama pada blok tercapai.

Terima kasih kepada narasumber, sejawat, dan seluruh pihak yang terlibat dalam penyusunan buku petunjuk praktikum ini. Semoga buku ini dapat digunakan sesuai tujuan yang diharapkan. Kritik dan saran untuk perbaikan sangat diharapkan demi kesempurnaan buku ini.

Jember, Februari 2013

Tim Penyusun

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
TATA TERTIB PRAKTIKUM LAB BOKIMIA.....	1
1. BLOK 2: PENGENALAN ALAT	3
2. BLOK 3: PENGARUH PH DAN SUHU TERHADAP REAKSI ENZIMATIK	8
3. BLOK 4: JEJAS SEL & ADAPTASI	8
4. BLOK 5: PENGARUH PH DAN SUHU TERHADAP REAKSI ENZIMATIK	13
5. BLOK 6: PENGUKURAN KADAR PROTEIN TOTAL SERUM	19
6. BLOK 8: PENGUKURAN KADAR KOLESTEROL SERUM.....	29
7. BLOK 10: EMPEDU-INDOL.....	32
8. BLOK 11: VITAMIN.....	36
DAFTAR PUSTAKA	38

TATA TERTIB PRAKTIKUM LAB BIOKIMIA

Semua mahasiswa yang mengikuti praktikum di laboratorium Biokimia FK UNEJ diwajibkan:

1. Menghubungi koordinator laboratorium minimal 1 minggu sebelum jadwal praktikum berlangsung
2. Hadir minimal 5 menit sebelum praktikum dimulai (mahasiswa yang terlambat tidak diperkenankan mengikuti praktikum)
2. Memakai jas praktikum dan tanda pengenal
3. Membawa dan telah membaca petunjuk praktikum
4. Mengumpulkan tugas pendahuluan sebelum praktikum dimulai
5. Dilarang makan, minum, dan mengoperasikan HP di dalam ruang laboratorium.
6. Mengikuti praktikum dengan serius dan penuh tanggung jawab
7. Menggunakan bahan-bahan praktikum sesuai dengan kebutuhan (secukupnya)
8. Menjaga kebersihan, kerapian, dan ketenangan laboratorium
9. Membuat laporan praktikum dan dikumpulkan maksimal 1 minggu setelah praktikum selesai.

Untuk menjaga keselamatan selama praktikum hendaknya mahasiswa memperhatikan beberapa hal di bawah ini:

1. Lakukan praktikum dengan hati-hati dan tanggung jawab
2. Hati-hati ketika melakukan percobaan menggunakan cairan tubuh, seperti darah/urina (untuk menghindari penularan penyakit-penyakit tertentu)
3. Ketika bekerja dengan bahan-bahan yang mudah terbakar seperti eter, benzen, alkohol jauhkan dari benda panas/api
4. Gunakanlah alat khusus yang disediakan untuk mengambil, mengukur, dan memindahkan asam keras, basa keras atau zat yang bersifat racun. Dilarang menghisap menggunakan mulut.

5. Waktu memanaskan cairan didalam tabung reaksi, goyang-goyangkanlah tabung tersebut untuk menghindari agar cairan itu tidak tumpah ke luar, arahkan mulut tabung ke tempat/ruang kosong.
6. Jangan menuang atau memasak asam atau basa yang kuat di atas meja praktikum. Tapi kerjakan di dalam lemari asam dengan menghidupkan kipas penghisap di atasnya.
7. Cucilah tangan setelah menuang asam atau basa keras dari botolnya. Waktu menuang asam atau basa kuat dari botolnya, usahakan agar etiket berada di atas untuk menjaga agar tidak rusak.
8. Ketika menggunakan bahan-bahan yang mudah menguap harus dilakukan dalam lemari asap dengan kipas penghisap yang diputar. Jauhkan dari api. Bila tumpah, keringkanlah dengan segera.
9. Dilarang membuang sisa bahan kimia, jarum suntik, dan sampah secara sembarangan.

MATERI PRAKTIKUM BLOK 2

PENGENALAN ALAT

1. Pendahuluan

Di dalam laboratorium Biokimia dapat ditemukan berbagai macam alat mulai dari yang sederhana, seperti alat-alat dari gelas, sampai kepada alat yang cukup rumit, seperti pH meter ataupun alat lainnya. Alat-alat sederhana di laboratorium tersebut ada yang terbuat dari kaca, plastik, karet, kuarsa, platina, logam, dan lain-lain. Peralatan tersebut ada yang berfungsi sebagai wadah, alat bantu, dan pengukuran volume dengan berbagai ukuran. Kesalahan dalam menggunakan alat dan bahan dapat menimbulkan hasil yang didapat tidak akurat. Oleh karena itu, pemahaman fungsi dan cara kerja peralatan serta bahan harus mutlak dikuasai oleh mahasiswa sebelum melakukan praktikum di laboratorium biokimia.

Ketepatan pembacaan skala pada alat sangat mempengaruhi hasil laboratorium, karena pada alat-alat tertentu belum memiliki tingkat ketelitian yang tinggi. Hal ini tergantung pada diameter alat yang digunakan, sebab semakin kecil diameter alat maka semakin besar tingkat ketelitian dan resiko kesalahan penggunaan alat akan semakin kecil. Peralatan wadah pengukur volume larutan ada yang perlu ditera dengan teliti dan ada yang tidak perlu ditera dengan teliti karena pengukuran dengan alat tersebut akan mempengaruhi hasil secara kuantitatif.

Analisis yang baik biasanya peduli kerapian. Mahasiswa dengan meja praktikum yang teratur, kecil kemungkinan melakukan kesalahan dalam mencampur sample, salah menambahkan reagensia, menumpahakan larutan dan memecahkan peralatan kaca. Kerapian dalam laboratorium tentu saja harus berlanjut dari meja praktikum sampai ke rak tempat bahan-bahan dan lemari asam.

Bukan hal yang mustahil bila terjadi kecelakaan dalam laboratorium karena kesalahan dalam pemakaian atau penggunaan alat-alat dan bahan yang

digunakan dalam melakukan suatu praktikum yang berhubungan dengan bahan kimia yang berbahaya, karena itu mahasiswa harus selalu berhati-hati.

2. Membersihkan Alat Gelas

Sesudah selesai bekerja alat-alat gelas dicuci dalam air hangat dengan sabun cair atau detergent, kemudian bilas sampai bersih dengan air kran dan kemudian bilas dengan aquadest. Alat-alat tak berukuran dapat dikeringkan dalam oven, tetapi alat gelas berukuran atau volumetrik tidak boleh dipanaskan karena ukurannya menjadi kurang tepat. Bila alat gelas berukuran atau volumetrik yang basah dengan sedikit alkohol, lalu dibiarkan mengering sendiri atau tiup dengan udara kering sampai kering bagian dalamnya.

3. Mengencerkan Larutan

Mahasiswa diharuskan dapat memahami bagaimana caranya mengencerkan larutan. Sebagai contoh misalnya larutan 10 % menjadi 5 % ? Hal ini dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: (1) dengan pipet kering 50 ml kita isap larutan 10 % dan masukkan ke dalam lab 100 ml (bagian bawah dari garis tanda tidak perlu kering, bagian atas harus kering). Kemudian ditambah aquadest sampai pada garis tanda. Tutuplah dengan sumbat dan kocoklah dengan baik; (2) Dengan pipet kering 50 ml kita isap larutan 10 % dan masukkan ke dalam gelas beker (harus kering). Dengan pipet lain kita isap 50 ml aquadest. Campurlah dengan baik.

4. Perhitungan konsentrasi kimia

Sebelum mengikuti praktikum mahasiswa juga diwajibkan memahami tentang perhitungan konsentrasi kimia. Konsentrasi yang biasa digunakan pada perhitungan kimia dapat dibagi menjadi 3, yaitu: (1) konsentrasi berdasarkan volume; (2) konsentrasi berdasarkan berat; (3) konsentrasi berdasarkan derajat kelarutan.

Konsentrasi berdasarkan volume dinyatakan berdasarkan jumlah bahan yang terlarut per unit volume. Paling sering digunakan di laboratorium Biokimia, meliputi molaritas, normalitas, weight/volume percent (% w/v), miligram percent (mg %) dan osmolaritas. Molaritas adalah jumlah mol bahan terlarut per liter

larutan. Normalitas merupakan jumlah equivalent (Eq) dari bahan terlarut per liter larutan.

Kadar suatu bahan juga dapat dinyatakan dalam % (w/v) dimaksudkan yaitu jumlah bahan yang harus dilarutkan tersebut (solut) dalam gam per 100 ml larutan (solution). Singkatan w/v berarti weight/volume (berat/volume). (catatan: berat yang dimaksud disini adalah massa). Sebagai contoh misalnya NaCl 5%. Untuk membuat larutan NaCl 5% dalam air, larutkanlah 5 g NaCl dalam sedikit air, kemudian tambahkan air sampai volumenya mendekati 100 ml. Kocokkanlah larutan tersebut lalu tambahkan air sampai garis 100 ml. Kocok lagi.

Kadang-kadang kadar larutan dinyatakan dalam o/oo (permille = perseribu). Jadi larutan NaCl 10 o/oo berarti 10 g NaCl dalam 1 liter larutan. Untuk mengubah o/oo menjadi % hendaknya angka itu dibagi 10, misalnya : $10 \text{ o/oo} = 1 \%$.

Kadar suatu bahan dalam cairan tubuh seringkali dinyatakan dalam bentuk yang lebih kecil, yaitu mg % atau mg/dl, yang berarti berat bahan terlarut (dalam mg) per 100 ml larutan. Satuan ini sering digunakan pada laboratorium klinik. Sebagai contoh misalnya kadar gula darah, BUN dan kreatinin serum. Kadar gula darah seorang penderita 225 mg%. Artinya terdapat 225 mg glukosa per 100 ml serum darah penderita. Dapat pula dinyatakan dalam m mol/liter. Kadar dalam berat/volume lebih jelas apabila dinyatakan dalam satuan berat per satuan volume.

Kadar dapat pula dinyatakan dalam berat per berat (w/w = weight/weight). Contoh: H_2SO_4 2,0 % (w/w) berarti 2,08 gam H_2SO_4 dalam 100 g larutan atau dalam 100 g larutan terdapat 2,08 g H_2SO_4 dan 97,92 gam H_2O .

Kadar suatu bahan dilaboratorium saat ini lebih seringkali dinyatakan dalam Molaritas (M) = mol (gam molekul, mole) per liter. Misalnya larutan NaCl 1 M atau larutan NaCl 1 Molar berarti: NaCl sebanyak 1 mol dilarutkan dalam air dalam labu ukur, dikocok, kemudian tambahkan air sampai volumenya mencapai garis 1 liter, lalu kocok lagi. Jadi larutan NaCl 0,15 M = 0,15 mol/liter = $0,15 \times 40 \text{ g/l}$. Untuk bahan berbentuk kristal yang mengandung H_2O misalnya $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ maka untuk membuat MgCl_2 1 M sebanyak 1 L kita harus menimbang sebanyak 203,306 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Berat atom Mg = 24,31, Cl =

35,45, H = 1,008, O = 16) untuk dilarutkan dengan air dalam labu ukur sampai mencapai volume akhir 1 liter.

Bila kita ingin mengetahui berapa molaritas suatu asam pekat, misalnya H_2SO_4 pekat maka kita baca data pada botol asli : Berat molekul = 98,08. Berat 1 L = 1,84 kg. Kadar 96% (95%-97%) Kadar ini dalam w/w (berat/berat). Dalam 100g larutan terdapat 96 g H_2SO_4 . Berarti dalam 1 L larutan H_2SO_4 pekat tersebut terdapat H_2SO_4 sebanyak $1840 \text{ g} \times 96\%/100\text{g}$ atau = $[(1840\text{g} \times 96 \text{ g}/100 \text{ g}) : 98,08]$ mol = 18,01 mol. Jadi larutan H_2SO_4 pekat dalam botol tersebut merupakan larutan H_2SO_4 18,01 M atau 36,02 N. Bagaimana mengubah molaritas larutan asam atau basa menjadi normalitas? Normalitas menunjukkan jumlah gam ekuivalen solut dalam 1 liter larutan .

Untuk membuat larutan H_2SO_4 1 M kita mengambil 1/18 liter H_2SO_4 pekat di atas, masukkan dalam labu ukur 1 liter yang sudah berisi air separuh labu, campurkan baik-baik, tambahkan air lagi sampai hampir mencapai garis 1 liter, campur baik-baik, kemudian tambahkan air sampai garis 1 liter, campur lagi.

TUGAS PENDAHULUAN

1. Jelaskan fungsi & cara kerja alat-alat berikut (gambar alat dilengkapi dalam laporan yang diserahkan setelah pelaksanaan praktikum)!

No.	Nama Alat	Gambar	Fungsi	Cara kerja	Ket.
1.	Lemari Asap/ Asam				
2.	Water Bath/penangas				
3.	Magnetic Stirrer				
4.	Kompor Gas				
5.	pH meter				
6.	Sentrifuge				
7.	Pipet tip				
8.	Pipet Volumetrik/gondok				
9.	Tabung Reaksi				
10	Labu Erlenmeyer				
11	Gelas Ukur				
12	Rak Tabung Reaksi				
13	Buret				
14	Bulp/pipet filler				
15	Pipet tetes				
16	Eppendorf				
17	Spektrofotometer				
18	Vortex				
19	Penjepit tabung reaksi				
20	Botol Semprot				
21	Cuvet				
22dst				

2. Jelaskan prosedur penggunaan sentrifuge!
3. Jelaskan prinsip kerja spektrofotometri!

MATERI PRAKTIKUM BLOK 3

PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP REAKSI ENZIMATIK

Prinsip Praktikum

Enzim sebagai katalisator ikut bereaksi dan mempercepat reaksi kimia, tetapi pada akhir reaksi akan didapatkan kembali dalam bentuk semula, sehingga dapat mengkatalisis reaksi kimia berikutnya. Kenyataan ini mengakibatkan tubuh tidak perlu memproduksi enzim dalam jumlah yang besar (kadar enzim di dalam tubuh kecil), sehingga pengukuran enzim tidak bisa dilakukan secara langsung. Pengukuran jumlah enzim dilakukan berdasarkan kecepatan reaksi yang dikatalisisnya. Pengukuran tersebut dilakukan dengan cara : (1) dibandingkan dengan enzim murni yang diketahui kadarnya (satuan: μg); (2) berdasarkan jumlah substrat yang bereaksi atau produk yang terbentuk per satuan waktu (Satuan: unit). Satu internasional unit merupakan jumlah enzim yang mengkatalisis pembentukan 1 $\mu\text{ mol}$ produk per menit pada kondisi tertentu.

Untuk mengetahui pengaruh pH pada reaksi enzimatik, dilakukan pengamatan reaksi antara amilum sebagai substrat dan amilase sebagai enzim yang dilakukan pada beberapa pH yang berbeda. Faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi reaksi enzimatik dibuat sama. Amilum merupakan suatu polisakarida yang berwarna biru bila bereaksi dengan yodium. Enzim amilase mencerna amilum secara bertahap, menghasilkan produk diantaranya suatu disakarida yang tidak berwarna bila direaksikan dengan yodium. Perubahan warna yang terjadi (berkurangnya warna biru) menunjukkan sebagian substrat telah dicerna oleh enzim amilase. Perubahan warna tersebut dapat diukur menggunakan alat spektrofotometer.

Untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap reaksi enzimatik dilakukan percobaan seperti diatas menggunakan pH 6,5 dan dilakukan pada beberapa macam suhu yang berbeda yaitu, 0, 27, 40 dan 70° Celsius sedangkan faktor-faktor lain yang berpengaruh pada reaksi enzimatik dibuat sama.

Reagensia

Reagen yang digunakan pada praktikum ini, adalah:

1. Larutan enzim amilase
2. Larutan NaCl 0,9 %
3. Larutan amilum 1 %
4. Larutan penyangga, masing-masing kelompok dengan satu macam pH (pH 4; 5; 6,5; 8 dan 10)
5. Larutan KI-KIO₃ :

KI	5,0 g
KIO ₃	0,357 g
NaOH 1 N	2,0 ml
Aqua ad	1 L
6. Larutan HCL 0,05 N

Prosedur

1. Prosedur Pengaruh pH terhadap Reaksi Enzimatik

- Sediakan 5 tabung reaksi, berilah tanda masing-masing 0', 5', 10', 15', dan 20'.
- Masukkan ke dalam sebuah labu erlenmeyer 15 ml larutan penyangga dengan berbagai pH yang telah ditentukan, 3 ml larutan amilum dan 6 ml larutan NaCl 0,9 %. Kocoklah agar semua larutan tercampur.
- Isilah masing-masing tabung reaksi yang telah diberi tanda dengan 1 ml larutan HCl 0,05 N.
- Ambillah 1 ml cairan dari labu erlenmeyer dan masukkan ke dalam tabung reaksi dengan tanda 0', kocok sebentar.
- Tambahkan 1 ml larutan enzim ke dalam labu erlenmeyer dan campur dengan cepat. Tepat pada saat penambahan enzim ini catatlah waktunya (jalankan stopwatch).
- Mendekati 5 menit setelah enzim dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, pipetlah 1 ml larutan dari labu erlenmeyer. Masukkan larutan dalam pipet tersebut ke dalam tabung reaksi bertanda 5' tepat pada saat penunjuk waktu menunjukkan 5 menit. Kocok sebentar.

- Demikian seterusnya : tepat setiap 5 menit kemudian masukkan 1 ml larutan dari labu erlenmeyer berturut-turut ke dalam tabung-tabung reaksi dengan tanda 10', 15', dan 20' seperti di atas. Kocok sebentar.
- Setelah semua selesai, ke dalam tiap tabung reaksi tambahkan 1 ml larutan KI-KIO₃, campur baik-baik sampai merata, tunggu 5 – 10 menit.
- Tentukan intensitas warna yang terjadi dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

Jumlah substrat yang dicerna pada setiap waktu yang telah ditentukan dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Substansi yang dicerna} = 100\% - \frac{(\text{Absorbance}) \text{ waktu } t}{(\text{Absorbance}) \text{ waktu } t_0} \times 100\%$$

Catat hasil yang didapat, kemudian berdasarkan data tersebut buatlah grafik hubungan antara % substrat yang dicerna (ordinat) dengan waktu (absis).

2 Prosedur Pengaruh Suhu Terhadap Reaksi Enzimatis

- Isilah labu erlenmeyer dengan:
15 ml larutan penyangga pH 6,5; 3 ml larutan amilum, 6 ml larutan NaCl 0,9%. Campur baik-baik, lalu letakkan pada suhu yang telah ditentukan selama kira-kira 30 menit.
- Sediakan 5 tabung reaksi, beri tanda 0', 5', 15' dan 20'.
- Isilah masing-masing dengan 10 ml larutan HCl 0,05 N.
- Ambillah 1 ml larutan dari erlenmeyer, masukkan ke dalam tabung reaksi tanda 0'. Lalu masukkan 1 ml larutan enzim ke dalam erlenmeyer. Campur dengan cepat dan jalankan pencatat waktu. Setiap 5 menit setelah ini, masukkan 1 ml, larutan dari erlenmeyer berturut-turut ke dalam tabung 5', 10' 15' dan 20'.
- Setelah semua selesai, tambahkan 1 ml larutan KI-KO₃ ke dalam tiap-tiap tabung reaksi, campur baik-baik dan tunggu 5-10 menit.
- Tentukan intensitas warna yang timbul dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

- Buat grafik yang menunjukkan hubungan antara % substrat tercerna (ordinat) dengan waktu (absis) pada bermacam suhu di atas.

Dasar Teori

Untuk mempercepat reaksi kimia dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu (1) Menaikkan suhu; (2) menambahkan katalisator. Manusia mempunyai suhu yang cenderung konstant (normal), karena itu untuk mempercepat reaksi kimia tergantung pada cara ke-dua. Katalisator mempercepat reaksi kimia dengan cara menurunkan energi aktivasi. Energi aktivasi adalah jumlah energi yang diperlukan untuk membawa semua molekul dalam satu mole suatu bahan pada suatu suhu tertentu dari keadaan awal menuju keadaan transisi. Pada keadaan transisi kemungkinan terbentuk dan terputusnya ikatan kimia sangat besar.

Secara umum katalisator mempunyai sifat-sifat sebagai berikut:

1. Ikut bereaksi
2. Mempercepat reaksi dan tercapainya keseimbangan
3. Tidak merubah K_{eq} dan perubahan energi bebas (ΔG).
4. Tidak mempunyai hubungan stoikiometrik
5. Pada akhir reaksi didapat kembali dalam bentuk semula.

Enzim merupakan protein yang bertindak sebagai biokatalisator. Reaksi enzimatik dipengaruhi oleh pH, suhu, kadar substrat, kadar enzim, aktivator dan inhibitor. Enzim merupakan protrein jadi peka terhadap perubahan pH. Enzim hanya aktif dalam batas-batas pH tertentu, pH dapat mempengaruhi muatan enzim maupun subtrat. Pada pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah, enzim akan mengalami denaturasi.

Pada umumnya reaksi kimia berjalan lebih cepat pada suhu yang lebih tinggi, tetapi pada suhu yang tinggi enzim dapat mengalami denaturasi (pada suhu 70°C , sebagian besar enzim menjadi inaktif). Kenaikan suhu akan menyebabkan energi kinetik dari molekul-molekul yang bereaksi menjadi semakin besar, sehingga kecepatan suatu reaksi kimia menjadi bertambah besar. Suhu yang tinggi juga dapat menyebabkan perubahan stuktur molekul protein.

Enzim merupakan suatu protein yang pada suhu tertentu dapat mengalami denaturasi.

Tugas Pendahuluan

1. Buatlah bagan dari percobaan yang akan saudara lakukan secara singkat/jelas.
2. Sebutkan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas suatu reaksi enzimatik ?
3. Jelaskan perbedaan antara kecepatan sesaat, kecepatan awal (*initial velocity*) dan kecepatan rata-rata suatu reaksi enzimatik?
4. Apa yang dimaksud dengan pH optimum pada reaksi enzimatik?
5. Apa fungsi larutan NaCl, HCl, HgCl₂ dan KI-KIO₃ pada percobaan di atas ?

MATERI PRAKTIKUM BLOK 4

PENGUKURAN KADAR GLUKOSA

DASAR TEORI

Glukosa merupakan monosakarida utama dalam darah. Glukosa di dalam darah berasal dari makanan yang mengandung karbohidrat, hasil dari proses glikogenolisis, dan glukoneogenesis. Kadar glukosa normal berkisar antara 50-150 mg/dl. Kadar glukosa darah ini dipertahankan agar tetap normal dengan melibatkan berbagai hormon. Meskipun tubuh dapat memperoleh energi melalui oksidasi bahan selain glukosa, tetapi kadar glukosa tidak boleh kurang dari harga normal. Salah satu alasannya adalah karena sel saraf dan eritrosit hanya bisa menggunakan glukosa sebagai sumber energi.

Diabetes millitus (DM) merupakan kelainan metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah. Penderita DM makin meningkat jumlahnya. DM dapat menimbulkan komplikasi yang cukup luas mulai dari ujung rambut sampai ujung kaki. Komplikasi tersebut dapat dibedakan menjadi komplikasi akut dan kronis. Kadar glukosa darah merupakan indikator yang baik untuk memonitor terapi pada penderita DM, sehingga pengukuran kadar glukosa darah perlu dilakukan secara rutin. Pengukuran kadar glukosa darah dapat dilakukan dengan cara o-toluidin dan cara enzimatis menggunakan enzim glukooksidase.

Hormon yang penting dalam mengatur kadar glukosa darah adalah insulin. Insulin merupakan suatu polipeptida (hormon protein) yang mengandung dua rantai asam amino yang dihubungkan oleh jembatan disulfida. Insulin dibentuk di ribosom sel beta pankreas yang akan membentuk proinsulin. Setelah diproduksi, insulin akan mengalami proses pematangan, kemudian dikemas dan disimpan dalam ganula-ganula di aparatus golgi. Insulin dikeluarkan dari ganula-ganula dengan cara eksositosis. Ganula-ganula tersebut bergerak ke dinding sel melalui suatu proses yang melibatkan mikrotubulus, kemudian membran ganula berfusi dengan membran sel dan terjadilah sekresi insulin

Struktur porcine insulin yang merupakan satu rantai polipeptida yang panjang, susunan asam-asam amino dari proinsulin adalah susunan polipeptida B yang pada ujung karboksilnya disambung melalui polipeptida yang terdiri dari 33 asam amino pada ujung amino dari polipeptida A.

Insulin terdiri dari dua rantai polipeptida yaitu rantai A dan rantai B. Pada rantai A terdapat ikatan disulfida yang menghubungkan sistein. Pada manusia rantai A terdiri dari 21 asam amino, rantai B terdiri 30 asam amino. Dalam bentuk kristal, insulin akan mengikat Zn ditengah polimer. Antara rantai A dan rantai B terdapat dua ikatan disulfida, yang menghubungkan sistein. Alkali ataupun senyawa pereduksi akan memutuskan ikatan disulfida dengan akibat anaktivasi insulin. Enzim-enzim proteolitik akan mencernakkan insulin yang diberikan secara per oral.

Sekresi insulin sebanding dengan kadar glukosa darah (KGD). Pada saat KGD tinggi, sekresinya akan meningkat, begitu pula sebaliknya. Insulin dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan cara mempercepat transportasi glukosa dari darah ke dalam sel dengan bantuan reseptor insulin yang terdapat di permukaan sel target. Insulin juga mempercepat penurunan KGD dengan cara: (1) merangsang perubahan glukosa menjadi glikogen (glikogenesis) dan asam lemak (lipogenesis); (2) menghambat pembentukan glukosa dari glikogen (glikogenolisis) dan senyawa-senyawa nonkarbohidrat (glukoneogenesis). Jadi, sekresi insulin dipengaruhi KGD dan berperan penting pada pengendalian KGD.

Stimulasi reseptor insulin akan mengaktifkan *tyrosine kinase* yang ada pada sub unit B dari reseptor insulin, sehingga terjadi proses fosforilasi pada tirosin. Tirosin terfosforilasi akan merangsang aktivitas beberapa protein intraseluler dalam jalur *signaling insulin*. Sebagai hasil rangkaian aktivasi, glukosa transporter akan bergerak ke arah membran untuk memasukkan glukosa yang ada dalam darah, akibatnya terjadi penurunan KGD. Glukosa darah yang masuk ke dalam sel selanjutnya akan mengalami proses glikolisis atau disimpan terutama di otot dan di hati, melalui proses glikogenesis.

Preparat insulin yang tersedia di antaranya adalah:

1. Short acting insulin

Antara lain: regular insulin, crystallin zinc insulin, semilente insulin.

2. Long acting insulin

- a. Protamin zinc insulin (PZI). Kombinasi insulin dengan protamin. Penyerapannya lambat. Penurunan glukosa darah lebih dari 24 jam.
- b. Ultra lente insulin merupakan slow acting insulin. Kristal besar dengan adanya konsentrasi yang tinggi dari asetat dan Zn. Onset dan duration pelan.

3. Intermediate acting insulin

- a. Lente insulin: campuran ultralente insulin dengan regular insulin dengan perbandingan 7:3
- b. Globin insulin : gabungan insulin dengan protein (globin). Efek antara regular insulin dan PZA (duration antara 12-15 jam)

Ginjal mempunyai peran yang penting pada pengendalian kadar glukosa darah. Glukosa dapat melalui filter glomerulus, tetapi direabsorpsi kembali ke peredaran darah melalui tubulus ginjal. Kemampuan tubulus untuk mereabsorpsi glukosa terbatas (sekitar 350 mg/menit). Pada seseorang yang mengalami peningkatan kadar glukosa darah, kadar glukosa yang mencapai tubulus juga meningkat. Jika jumlah glukosa dalam tubulus melebihi kemampuannya untuk mereabsorpsi, sisa glukosa akan dibuang bersama urine. Keadaan ini disebut dengan glikosuria.

Metode

GOD-PAP: enzymatic photometric test

Prinsip

Menentukan kadar glukosa serum setelah direaksikan dengan enzim glucose oksidase. Quinoneimine menjadi indikator reaksi kolorimetri, yang terbentuk dari 4-aminoantipyrine dan phenol pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim peroksidase.

Reagen

Komponen dari reagen:

1. buffer phosphate
2. phenol
3. 4-aminoantipyrine
4. glucose oxidase
5. peroxidase

Spesimen

Serum atau plasma. serum dapat digunakan paling lambat dalam waktu 1 jam setelah pengambilan sampel. jaga serum tetap bersih, serum terkontaminasi hrs dibuang

Cara Kerja

1. Tiga buah tabung reaksi ukuran 5 ml, masing-masing diberi label RB (Reagen Blanko), STD (Reagen Standar), dan SPL (Reagen Sampel)
2. Tabung RB diberi 3000 uL reagen GOD-PAP.
3. Tabung STD diberi 30 uL reagen standar glukosa dan ditambah dengan 3000 uL reagen GOD-PAP , dicampur hingga homogen.
4. Tabung SPL diberi 30 uL serum dan ditambah dengan 3000 uL reagen GOD-PAP, di campur hingga homogen.
5. Tabung SK di beri 30 uL serum kontrol dan ditambah 3000 uL reagen GOD-PAP, di campur hingga homogen.
6. Masing-masing di inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar.
7. Absorbansi (DA) standar dan Abs sampel di ukur terhadap reagen blanko (RB) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm.

	RB	STD	SPL
Sample (ul)			30
Standar (ul)		30	
Reagen	3.000	3.000	3.000
Campur, inkubasi 20 menit (20-25 °C) atau 10 menit pada suhu 37 °C, kemudian			

ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm Abs standar (STD), sampel (SPL), terhadap blanko reagen (RB) dalam 10 menit.

Perhatian: mahasiswa hanya mengerjakan pengukuran glukosa sampel (SPL)

Perhitungan nilai

$$\text{Glukosa} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right] = \frac{\text{Abs Sample} - \text{Abs Blanko}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanko}} \times \text{Nilai Standard}$$

Nilai referensi

Anak-anak (puasa)	
Umur 1 – 6 tahun	74 – 127
Umur 7 – 19 tahun	70 – 106
Dewasa (puasa)	
Glukosa darah vena	70 – 115

PENGUKURAN KADAR GLUKOSA URINE

Glukosa dapat bertindak sebagai reduktor. Jika senyawa yang mudah menerima elektron (oksidator) direaksikan dengan glukosa dapat terjadi reaksi oksidasi reduksi. Sebagai contoh oksidator misalnya Cu^{++} pada CuSO_4 yang berwarna biru. Cu^{++} akan direduksi oleh glukosa menjadi Cu^+ dalam bentuk Cu_2O yang berupa endapan berwarna merah bata, sedangkan glukosanya dioksidasi menjadi asam glukonat. Makin tinggi kadar glukosa, maka warna merah bata yang terbentuk akan makin kuat.

Reagen yang dipakai pada praktikum ini meliputi:

1. Reagen benedict
2. Larutan glukosa
3. Larutan vitamin C

Prosedur pengukuran kadar glukosa urin adalah sebagai berikut:

1. Ambil 5 tabung reaksi, beri tanda U, G1, G2, C1 dan C2.
2. Isilah masing-masing tabung reaksi dengan 2-3 ml reagen benedict
3. Tambahkan pada:
 - Tabung U : 1 ml urine
 - Tabung G1: 1 ml urine + 1 tetes larutan glukosa
 - Tabung G2: 1 ml urine + 5 tetes larutan glukosa
 - Tabung C1: 1 ml urine + 1 tetes larutan vitamin C
 - Tabung C2: 1 ml urine + 5 tetes larutan vitamin C
4. Panaskan di atas api sampai mendidih
5. Amati hasilnya

TUGAS PENDAHULUAN

1. Tulislah persamaan reaksi yang terjadi pada pengukuran kadar glukosa serum
2. Hormon apa saja yang mempengaruhi kadar glukosa darah.
3. Jelaskan tentang renal treshold/ ambang batas ginjal untuk glukosa!
4. Jelaskan tentang penilaian/pembacaan hasil pada pengukuran kadar glukosa dalam urine!
5. Jelaskan kelemahan pengukuran kadar glukosa urin!

MATERI PRAKTIKUM BLOK 5

PENGUKURAN KADAR PROTEIN TOTAL SERUM

Dasar Teori

Protein adalah bentuk polimer dari asam amino. Asam amino yang dapat membentuk protein ini disebut asam amino dasar (common amino acid), yang terdiri dari 20 jenis asam amino. Antara asam amino yang satu dengan yang lain terikat dengan ikatan peptida membentuk rantai polipeptida dan membentuk struktur primer, sekunder, tertier dan kwartener.

Protein mempunyai peran penting pada berbagai fungsi vital seperti enzim, penyusun struktur sel, alat transportasi, sistem penyangga, antibody dan masih banyak fungsi lainnya. Beberapa hormon juga tersusun dari protein. Asam amino penyusun protein juga mempunyai peran penting pada biosintesis pada senyawa-senyawa tertentu seperti kreatin, melanin dan serotonin.

Kita membutuhkan protein kurang lebih 30-60 gram per hari, namun kualitas protein, yaitu proporsi asam amino esensial di dalam makanan terhadap proporsinya pada protein yang menjalani sintesis, merupakan faktor penting yang sangat menentukan. Asam amino yang berlebih tidak akan disimpan. Tanpa memperdulikan sumbernya, asam amino yang tidak segera disatukan menjadi protein baru, akan segera diuraikan dengan cepat. Jadi konsumsi asam amino secara berlebihan tidak memberikan manfaat apapun selain pembentukan energi yang juga bisa dilakukan oleh karbohidrat dan lipid dengan biaya yang lebih rendah.

Penguraian dan resintesis protein atau yang kita kenal dengan pertukaran protein terjadi pada semua protein sel yang berlangsung terus-menerus dan merupakan proses fisiologis yang penting dalam semua bentuk kehidupan. Manusia menukar atau menggantikan 1-2% dari total protein tubuh per hari, khususnya protein otot. Dari asam amino yang dibebaskan, 75-80% digunakan kembali untuk sintesis protein yang baru. Protein serum terdiri dari albumin, globulin, faktor-faktor pembekuan darah, enzim, dan hormon. Albumin dan globulin merupakan fraksi yang terbesar.

Metode

photometric test dengan larutan biuret

Prinsip

Ion Cu^{2+} bereaksi dengan ikatan peptida dalam larutan alkali menghasilkan kompleks senyawa berwarna lembayung. Absorbansi dari warna larutan yang terbentuk sebanding dengan kadar protein.

Reagen

Komponen dari reagen (R1 & R2):

6. sodium hidroksida
7. potassium sodium tartat
8. potassium iodida
9. copper sulfat

Cara membuat monoreagen yaitu dengan mencampurkan R1 dan R2 dengan perbandingan 4:1

Spesimen

Serum atau plasma dengan heparin atau EDTA

Cara kerja

No	Bahan	Jumlah
1	Serum	60 μL
2	Monoreagen	3000 μL
Campurkan, inkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C , kemudian ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm		

Perhitungan nilai

$$\text{Protein total} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right] = \frac{\text{Abs Sample} - \text{Abs Blanko}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanko}} \times \text{Nilai Standard}$$

Standart: 5 g/dL

Nilai referensi

No	Klasifikasi	Konsentrasi	
1	Dewasa	6.6-8.8 g/dl	
2	Anak	Perempuan	Laki-laki
	1-30 hr	4.2-6.2	4.1-6.3
	1-6 bulan	4.4-6.6	4.7-6.7
	6 bulan – 1 tahun	5.6-7.9	5.5-7.0
	1-18 tahun	5.7-8.0	5.7-8.0

Tugas pendahuluan

1. Sebutkan fungsi albumin di dalam tubuh!
2. Berapa nilai normal kadar albumin, globulin dan total protein di dalam tubuh!
3. Apa saja yang dapat menyebabkan kadar albumin kurang dari normal?
Jelaskan!
4. apa akibatnya jika kadar albmin kurang dari normal? Jelaskan!

MATERI PRAKTIKUM BLOK 6

CARA KERJA BEBERAPA ENZIM

Pada praktikum ini akan dipelajari cara kerja beberapa enzim seperti urease, suksinat dehidrogenase, xantin oksidase dan peroksidase. Enzim urease menguraikan ureum dan membentuk amonium karbonat yang bersifat alkalis. Terbentuknya amonium karbonat dapat diketahui menggunakan indikator phenolphtalein (phenolphtalein tidak berwarna pada pH netral dan berwarna merah pada pH alkalis).

5.1 Urease

Prosedur yang harus dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan ureum 1% tambahkan 1 tetes phenolphtalein 2% kemudian 1 ml larutan urease. Perhatikan apa yang terjadi. Mengapa demikian ?
2. Lakukanlah percobaan seperti no. 1, tetapi terlebih dahulu panaskan larutan urease sampai mendidih.
3. Lakukanlah percobaan seperti no. 1, tetapi terlebih dahulu masukkanlah tetes sublimat ke dalam 1 ml larutan urease yang akan dipakai. Perhatikan apa yang akan terjadi.

5.2 Suksinat Dehidrogenase :

Enzim dehidrogenase adalah enzim yang dapat mengkatalisis pengeluaran hidrogen dari substrat tetapi tidak dapat menggunakan oksigen sebagai akseptor hidrogen yang dilepaskannya. Pada peristiwa-peristiwa oksidasi biologis, atom hidrogen yang dilepas dari suatu substrat oleh enzim dehidrogenase biasanya ditangkap NAD⁺ atau NADP⁺. Enzim dehidrogenase yang berperan penting pada pengadaan energi dalam tubuh umumnya menggunakan NAD⁺ sebagai akseptor Hidrogen yang dilepaskannya. Pada keadaan aerobik reduksi dari NAD⁺ tersebut akan diikuti oleh pemindahan hidrogen dan elektron melalui flavoprotein, koenzim Q, sistem sitokrom, akhirnya ke oksigen dan terbentuk H₂O. Rangkaian

1. Mula-mula jaringan otot katak (yang mengandung enzim suksinat dehidrogenase dilumatkan dahulu sampai halus).
2. Ambil tiga tabung reaksi, tandai dengan nomor I, II, III isi masing-masing dengan 10 g daging katak di atas, kemudian tambahkan 1 ml larutan penyangga pospat pH 6,8.
3. Taruhlah tabung I dalam air mendidih selama 5 menit.
4. Masukkan ke dalam tabung I, dan II masing-masing 1 ml Natrium suksinat 0,05 N. ke dalam tabung III masukkan 1 ml air.
5. Tambahkan pada tiap tabung 1 ml larutan metilen biru (1 : 20.000), kocok pelan-pelan. Kemudian lapisi dengan 10 tetes parafin (karena berat jenisnya lebih kecil dari air, parafin berada pada larutan permukaan, memisahkan larutan di bawahnya dari udara luar). Jangan dikocok !
6. Inkubasikan ke tiga tabung ; pada suhu 37° C di dalam water-bath, selama 1 jam.

Apa yang nampak pada masing-masing tabung ? jelaskan !

5.3 Xantin Oksidase

Enzim ini termasuk golongan oksidase, yaitu kelompok enzim yang juga dapat melepaskan hidrogen dari substrat dengan menggunakan oksigen sebagai akseptornya. Enzim-enzim kelompok ini menghasilkan air atau hidrogen peroksida sebagai produk reaksi. Enzim yang termasuk ke dalam kelompok oksidase misalnya asam amino oksidase, sitokrom oksidase, glukosa oksidase dan xantin oksidase. Sitokrom oksidase merupakan hemoprotein yang tersebar luas dalam banyak jaringan yang mempunyai gugus prostetik heme.

Xantin oksidase tersebar luas di dalam tubuh dan terdapat di dalam susu, usus halus, ginjal serta hati. Susu sapi juga mengandung xantin oksidase, yang dapat mengoksidasi xanthine. Enzim ini juga mempunyai sifat dapat mengoksidasi aldehid. Di dalam percobaan ini metilen biru digunakan sebagai akseptor hidrogen.

Prosedur yang harus dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Sediakan 3 tabung reaksi, beri tanda X, Y, dan Z.

2. Masukkan ke dalam tabung X dan dan Y 3 ml susu yang mentah.
Pada tabung Z masukkan 3 ml susu masak (warna biru)
3. Beri metilen biru formaldehid (25 mg MB dilarutkan dalam 195 ml air dan 5 ml formaldehid 40%) sebanyak 5-6 tetes pada X, Y dan Z. Kocok sampai warnanya rata.
4. Tambahkan pada tabung X 8 tetes parafin. Jangan dikocok !
5. Inkubasi pada 37° C selama 1 jam. Perhatikan apa yang terjadi pada X, Y dan Z.
Bagaimana perubahan warna pada masing-masing tabung ? Jelaskan.

5.4 Peroksidase

Peroksidase termasuk kelompok enzim hidroperoksidase, yaitu kelompok enzim yang menggunakan hidrogen peroksida atau peroksida organik sebagai substrat. Terdapat dua jenis enzim yang termasuk kelompok ini, yaitu peroksidase dan katalase. Hidroperoksidase melindungi tubuh terhadap senyawa-senyawa peroksida. Susu mengandung enzim peroksidase, yang berperan dalam mencegah terjadinya penumpukan hidrogen peroksida di dalam tubuh. Peroksidase mengkatalisis reaksi berikut ini:

Peroksidase



Prosedur yang harus dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Sediakan 2 tabung reaksi, beri tanda P dan Q.
Masukkan ke dalam tabung P dan Q masing-masing 2 ml susu mentah (warna biru)
2. Panaskan tabung P hati-hati selama 5 menit (didihkan), kemudian dinginkan kembali.
3. Tambahkan pada tabung P dan Q : 1 ml benzidin 4% dan 1 ml H₂O₂ 3%.
4. Kocoklah dan perhatikan apa yang terjadi

5.5 Tugas Pendahuluan

Sebelum praktikum dimulai, jawablah pertanyaan di bawah ini:

1. Sebutkan macam-macam enzim dan cara kerjanya!
2. Apakah guna parafin pada percobaan di atas ?
3. Buatlah skema dari percobaan-percobaan di atas!
4. Mengapa dilakukan inkubasi pada suhu 37°C pada percobaan enzim?
5. Sebut dan jelaskan macam-macam inhibitor kerja enzim!

MATERI PRAKTIKUM BLOK 8

PENGUKURAN KADAR KOLESTEROL SERUM

Dasar Teori

Kolesterol merupakan molekul biologi dari golongan lipid yang sangat penting, terutama peranannya dalam membentuk struktur membran serta sebagai prekursor dalam sintesis hormon steroid (seperti kortisol, testosteron, estrogen, dan progesteron), vitamin D dan asam empedu. Kolesterol mempunyai peran biologis yang amat vital, misalnya pembentukan membran sel, hormon-hormon steroid dan asam empedu. Asam empedu yang merupakan hasil konversi dari kolesterol sangat dibutuhkan pada proses absorpsi lipid dari saluran cerna. Di sisi lain kelebihan kolesterol diduga bertanggungjawab terhadap berbagai penyakit yang disebabkan oleh aterosklerosis, yang insidensinya terus meningkat, disamping juga batu empedu

Kolesterol berwarna kekuningan, berbentuk seperti lilin dan disebut sebagai steroid. Ia merupakan produk khas hewani dan banyak terdapat dalam makanan yang berasal dari hewan seperti kuning telur, daging, hati, usus dan otak. Makanan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan pasti tidak mengandung kolesterol, tetapi memiliki sterol lain seperti ergosterol dan fitosterol.

Kolesterol dalam sirkulasi dibawa oleh partikel lipoprotein. Pengaturan metabolisme kolesterol dalam tubuh diatur sangat ketat untuk menghindari terjadinya akumulasi yang berlebihan serta deposisi abnormal dalam tubuh. Keadaan klinis yang sangat penting akibat deposisi abnormal kolesterol antaralain aterosklerosis pada pembuluh darah arteri yang penting sehingga menimbulkan penyakit serebrovaskuler, vaskuler perifer dan koroner.

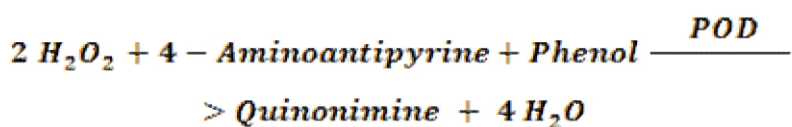
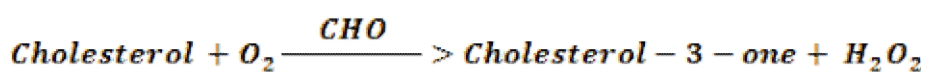
Metode

CHOD-PAP: enzymatic photometric test

Prinsip

menentukan kadar kolesterol serum setelah penguraian kolesterol dan esternya dengan reaksi oksidasi dan hidrolisis. quinoneimine menjadi indikator reaksi kolorimetri, yang terbentuk dari 4-aminoantipyrine dan phenol pada reaksi hidrogen peroksida yang dikatalisis oleh enzim peroksidase.

Reaksi



Reagen

Komponen dari reagen:

1. buffer phosphate
2. phenol
3. 4-aminoantipyrine
4. cholesterol esterase
5. cholesterol oxidase
6. peroxidase

Spesimen

Serum atau plasma dengan heparin atau EDTA

Cara kerja

No	Bahan	Jumlah
1	Serum	30 μL
2	Reagen	3000 μL

Campurkan, inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar atau 10 menit pada suhu 37° C,

kemudian ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm

Perhitungan nilai

$$\text{Cholesterol} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right] = \frac{\text{Abs Sample} - \text{Abs Blanko}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanko}} \times \text{Nilai Standard}$$

Standart: 200 mg/dL

Nilai referensi

No	Klasifikasi	Konsentrasi
1	Kadar yang diinginkan	≤ 200 mg/dL
2	Borderline	200-240 mg/dL
3	Resiko tinggi	> 240 mg/dL

Tugas pendahuluan

1. Sebutkan nilai normal kadar kolesterol serum!
2. Sebutkan peran hati dalam metabolisme kolesterol!
3. Jelaskan tentang klasifikasi lipoprotein!
4. Jelaskan arti penting pengukuran kolesterol darah!

MATERI PREKTIKUM BLOK 10

EMPEDU-INDOL

Dasar Teori: Empedu

Inti steroid, termasuk inti yang dimiliki kolesterol tidak dapat dikatabolisme menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Oleh karena itu kolesterol harus dikonversi atau dibuang secara utuh dari tubuh. Satu-satunya organ yang dapat melakukannya secara efektif adalah hati. Sekitar 80 persen dari kolesterol tubuh di konversi oleh hati menjadi berbagai asam empedu. Asam empedu bersama dengan kolesterol utuh selanjutnya diekskresikan ke dalam saluran empedu untuk dikeluarkan dari tubuh bersama tinja.

Konversi kolesterol meliputi penambahan gugus OH, pemendekan rantai, penghilangan ikatan rangkap, dan penambahan gugus karbonil. Dua asam empedu yang dihasilkan melalui proses konversi ini adalah asam kolat dan asam kenodeoksikolat. Keduanya digolongkan menjadi asam empedu primer. Kolat merupakan derivat kolesterol yang mengalami oksidasi pada atom C ke-24 (C-24), terhidroksilasi (C-7 dan C-12), dan tereduksi (ikatan ganda C-5,6). Kenodeoksikolat, tidak memiliki gugusan hidroksil pada C-12.

Bahan terpenting dalam empedu adalah: (1)Garam empedu; (2) zat warna empedu. Garam empedu merupakan hasil kondensasi dari asam empedu. Garam empedu yang utama, yaitu glikokolat, dihasilkan melalui kondensasi kolat dan glisin.. Derivat KoA dari kolat, yaitu kolil-KoA, ditimbulkan sebelum reaksi kondensasi tersebut. Selain glisin, taurin juga dapat mengkonjugasi asam empedu membentuk taurokolat. Garam empedu merupakan molekul amfipatik yang berfungsi dalam usus kecil untuk melarutkan lipid dalam makanan sehingga sehingga lebih mudak diabsorpsi

Garam empedu, setelah disitiesis, disimpan dalam kantong empedu, kemudian diangkut melalui duktus koledokus yang bermuara pada ampula vateri melalui spinkter Oddi dalam duodenum. Sesampainya di usus, sebagian asam kolat diubah oleh bakteri usus menjadi turunannya, yaitu asam deoksikolat, sedangkan asam kenodeoksikolat diubah menjadi asam litokolat. Asam

deoksikolat dan asam litokolat yang terbentuk di dalam lumen usus tersebut dikenal sebagai asam-asam empedu sekunder.

1 Reaksi Pattenkoffer

Reaksi Pattenkoffer dipakai untuk menunjukkan adanya garam empedu. Prinsip reaksi ini adalah mereaksikan H_2SO_4 dengan sukrosa. H_2SO_4 akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa yang selanjutnya membentuk furfural. Furfural tersebut bersama dengan asam empedu akan membentuk, warna merah. Makin tinggi kadar sukrosa furfural yang terbentuk makin banyak. Hal ini mengakibatkan menyebabkan warna coklat/hitam yang sering terlibat di bawah warna merah.

Prosedur yang dikerjakan pada praktikum ini dapat diuraikan sebagai berikut. Ke dalam tabung reaksi masukkan 2 ml larutan empedu yang telah diencerkan 10 X, beri 1 tetes sukrosa 10%, campur. Tuangkan H_2SO_4 pekat kira-kira 2 ml secara pelan-pelan pada dinding tabung reaksi tersebut yang dimiringkan. Setelah beberapa waktu akan kelihatan lingkaran yang berwarna merah.

2 Reaksi Hay

Lipid tidak dapat larut pada pelarut polar, dengan kata lain lipid bersifat hidrofob. Lipid dalam makan, supaya dapat diabsorpsi melalui usus harus diemulsifikasi terlebih dulu. Empedu bekerja sebagai emulgatornya. Empedu dapat menurunkan tegangan permukaan. Hal ini diperlukan untuk fungsi emulsifikasi lipid dalam usus. Reaksi Hay digunakan untuk menunjukkan salah satu fungsi garam empedu tersebut.

Prosedur pada reaksi Hay sebagai berikut. Ambillah 2 tabung reaksi yang agak besar. Tabung yang satu diisi dengan air, yang lain diisi dengan larutan empedu encer, sampai kira-kira setengah tabung reaksi. Pada permukaan dari kedua cairan tersebut ditaburkan bubuk belerang dan biarkan untuk beberapa saat. Amati apa yang terjadi !

3 Reaksi Gmellin

Reaksi Gmellin dipakai untuk menunjukkan adanya bilirubin (zat warna empedu).

Prinsip reaksi Gmellin adalah mengoksidasi bilirubin dengan HNO_3 pekat.

Prosedur reaksinya adalah :

Ke dalam satu tabung reaksi yang sudah berisi 3 ml empedu yang belum di encerkan (empedu pekat) tuangkan HNO_3 pekat dengan hati-hati lewat dinding tabung. Akan terbentuk lingkaran-lingkaran dengan bermacam warna.

Dasar Teori: Indol

Indol merupakan hasil pembusukan asam amino triptofan oleh bakteri usus. Indol ini terserap masuk ke dalam peredaran darah dan akan mengalami proses detoksifikasi di hati dengan cara pengikatan dengan sulfat menjadi indoksil sulfat. Indoksil sulfat akan dikeluarkan melalui urine dalam bentuk indikan (indican) yaitu bentuk garam K/Na-nya.

Adanya indikan dapat ditunjukkan dengan reaksi Jolles dan reaksi Obermeyer.

Pada praktikum ini akan dilakukan reaksi Jolles, dengan prinsip sebagai berikut. Indoksil sulfat di dalam urine berbentuk sebagai garam K-nya oleh HCl diubah menjadi indoksil. Indoksil oleh FeCl_3 dioksidasi menjadi indigo biru (bila oksidasi berjalan cepat) atau indigo merah (bila oksidasi berjalan lambat). Timol (naftol) melambatkan oksidasi sehingga warna yang terbentuk lebih merah.

Prosedur Reaksi Jolles adalah sebagai berikut.

Ke dalam tabung reaksi masukkan 5 ml urine dan 15 tetes larutan timol 5% dalam alkohol yang baru dibuat. Tabung ditutupi, dibolak-balik lalu ditambah 5 ml larutan FeCl_3 0,3 % dalam HCL 37 %. Campurkan lagi dengan cara membolak-balikkan tabung. Kemudian masukkan 1 ml chloroform, lalu tabung dibalik-balik dengan pelan sebanyak 10 kali. Perhatikan apa yang terjadi!

Tugas Pendahuluan

Sebelum praktikum dimulai, jawablah pertanyaan di bawah ini:

1. Buatlah skema praktikum diatas!

2. Sebutkan bahan-bahan yang proses absorpsinya membutuhkan bantuan asam empedu!
3. Jelaskan proses terjadinya batu empedu?
4. Apa akibatnya jika terjadi obstruksi pada saluran empedu?

MATERI PRAKTIKUM BLOK 11

VITAMIN

Pada bab ini akan diuraikan tentang pengukuran kualitatif vitamin A, B1 dan B2 serta pengukuran kuantitatif vitamin C. Pengukuran kualitatif digunakan untuk mengetahui apakah suatu bahan makanan mengandung vitamin yang kita maksud, sedangkan pengukuran kuantitatif vitamin C pada praktikum ini digunakan untuk mengetahui kadar vitamin C yang diekskresikan melalui urin pada waktu tertentu.

9.1 Vitamin A (axerophthol)

Adanya vitamin A pada suatu bahan dapat ditunjukkan dengan menggunakan reaksi Carr dan Price. Apabila larutan $SbCl_3$ dalam chloroform dicampur dengan larutan yang mengandung vitamin A, maka akan terjadi warna biru. Larutan yang mengandung vitamin A yang digunakan pada praktikum ini adalah minyak ikan. Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut. Ambil tabung reaksi kering. Teteskan satu tetes minyak ikan dan 5-6 tetes chloroform kering ke dalam tabung tersebut. Kemudian tambahkan 1-2 tetes asam cuka anhidrida (untuk menghilangkan sisa-sisa air) dan 20 tetes antimonium trichlorida dalam chloroform yang baru dan jenuh. Terjadilah sekarang warna biru, yang dalam beberapa detik mencapai maksimumnya, kemudian berubah menjadi biru keabu-abuan.

9.2 Vitamin B1 (thiamin)

Pengujian kuantitatif vitamin B1 dilakukan melalui suatu reaksi yang didasarkan atas kenyataan bahwa vitamin B1 mudah dioksidasi oleh bahan oksidator lemah dalam suasana alkali membentuk thiochrom. Thiochrom dapat di ekstraksi oleh isobutil alkohol dan memberi fluoresensi biru di bawah sinar ultra violet.

Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut. 1 ml larutan vitamin B1 diberi 1 ml metil alkohol dan 0,6 ml NaOH 40 %. Tambahkan 3 tetes larutan

kalium ferricyanida dan 5 ml isobutil alkohol. Tabung dibolak-balik beberapa kali, supaya vitamin B1 terlarut dalam isobutil alkohol. Lihatlah hasilnya dibawah sinar ultraviolet ! (Perhatikan warna fluoresensinya)

9.3 Vitamin B2 (riboflavin)

Prinsip reaksi pengujian vitamin B2 didasarkan atas kenyataan bahwa riboflavin menunjukkan fluoresensi hijau dibawah sinar ultra violet. Pada praktikum ini digunakan susu sapi.

Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut. Ke dalam tabung pemusing masukkan 5 ml alkohol 80 %, kemudian masukkan 2 ml susu sapi, dan kocok. Suspensikan lalu dipusingkan. Ambil fitratnya, pindahkan ke dalam tabung yang kering dan lihat di bawah sinar ultraviolet!

9.4 Vitamin C (asam askorbat)

Prinsip pengukuran kuantitatif vitamin C dilakukan berdasarkan daya reduksi yang kuat dari vitamin C. Salah satu cara ialah menggunakan 2,6 dichlorophenol-indophenol, suatu senyawa yang berwarna biru dalam keadaan basa. Oleh vitamin C zat warna ini direduksi menjadi senyawa yang tak berwarna. Dalam suasana asam, kelebihan 2,6 dichlorophenol indophenol akan berwarna merah. Reaksi ini tidak khusus untuk vitamin C, karena zat warna tersebut dapat pula direduksi oleh senyawa-senyawa reduktor yang lain.

Untuk menentukan kadar vitamin C dalam suatu larutan kita menggunakan cara titrasi dengan larutan 2,6 dichlorophenol-indophenol. Oleh karena itu sebelumnya kita perlu melakukan standardisasi larutan 2,6 dichlorophenol-indophenol atau mencari tahu 1 ml larutan 2,6 dichlorophenol-indophenol yang kita pakai setara dengan berapa mg vitamin C.

Mula-mula kita membuat larutan vitamin C (asam askorbat) standar misalnya dengan kadar 50 mg/L, lalu lakukan standardisasi larutan 2,6 dichlorophenol-indophenol. Ambil dengan pipet 5 ml larutan asam askorbat standar (tiap liternya mengandung 50 mg asam askorbat) dan masukkan ke dalam mangkok porselin. Tambahkan 2 ml larutan asam cuka trichlorida 10 %,

sesudah itu titrasi dengan lar. 2,6 dichlorophenol-indophenol (dengan menggunakan mikro buret) sampai terlihat warna merah muda yang tak hilang selama 30 detik. Penentuan titik akhir titrasi tidak begitu mudah oleh karena warna merah muda itu mungkin kurang jelas. Untuk memudahkan, dapat dilakukan perbandingan dengan mangkok lain yang di beri air sama banyak. Titrasi dilakukan dalam duplo, lalu dihitung banyaknya asam askorbat yang dapat dititrasi oleh 1 ml lar. 2,6 dichlorophenol-indophenol.

Standardisasi Lar. 2,6 dichlorophenol-indophenol, harus dilakukan setiap kali kita melakukan percobaan vitamin C.

Lar 2,6 dichlorophenol-indophenol dibuat dengan cara sebagai berikut :

130 mg garam dari 2,6 dichlorophenol-indophenol dilarutkan dalam 500 ml air mendidih. Setelah didinginkan lar disaring dan ditambahkan 150 mg. Larutan kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 3 hari dan disaring sekali lagi. Larutan harus selalu disimpan didalam ruang gelap dan tidak lebih dari sebulan.

Bila seseorang sudah cukup akan vitamin C maka pemberian sejumlah vitamin C sebagian besar akan dikeluarkan kembali melalui urine dalam waktu 12 jam berikutnya. Bila tubuh kekurangan vitamin C maka vitamin C yang diberikan tersebut tidak akan dikeluarkan tetapi sebagian atau seluruhnya akan ditahan oleh tubuh tergantung pada berat/ringannya kekurangan vitamin C yang diberikan. Pada umumnya dapat dikatakan bahwa tubuh tak kekurangan vitamin C apabila pada pemberian 200 mg vitamin C dikeluarkan 20 mg dalam waktu 4 jam.

Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut. Jam 6.00 pagi orang pecobaan disuruh kencing dan kencingnya dibuang. Kemudian ia diberi 200 mg vitamin C per oral.

Jam 10.00 (4 jam kemudian) orang tersebut disuruh kencing dan diukur volumenya (bila diantara jam 6.00 dan 10.00 ia kencing maka urine itu juga harus diukur volumenya dan volumenya ini harus ditambah pada volume urine jam 10.00).

Dari jumlah urine ini diambil 20 ml dan beri 5 ml asam metaphosphat 20 % (semua harus dilakukan dengan teliti dan pipet). Ambil 9 ml dari campuran tersebut dan tambahkan 3 ml larutan asam phosphowolframat (terdiri dari 10 gam

asam phosphowolframat, 25 ml H₂SO₄ 15 %, ditambah aquadest sampai menjadi 100 ml) Dengan pemberian larutan ini banyak bahan-bahan yang tidak diperlukan diendapkan. Sesudah dipusingkan, ambil 3 ml cairan lapisan atas dan tuangkan perlahan-lahan dalam suatu mangkok porselin. Titrasi seperti yang tersebut dalam A, kemudian dengan memperhatikan pengenceran hitunglah pengeluaran asam askorbat dalam urine selama 4 jam tersebut.

Tugas pendahuluan

1. Buatlah skema alur metode pengukuran Vitamin A, B1, B2 dan C!
2. Sebutkan fungsi masing-masing reagen pada metode pengukuran:
 - a. Vitamin A: chloroform & kristal SbCl₃
 - b. Vitamin B1: Kalium ferricyanida & NaOH
 - c. Vitamin C: asam metafosfat
3. Jika volume titran yang dibutuhkan untuk menghasilkan warna merah muda adalah 1 mL, volume urine total 100 mL dan volume larutan standart 5 mL DPIP setara dengan 9 mg Vitamin C, berapa kandungan vit C dalam Urine yg diperiksa?

DAFTAR PUSTAKA

- Bagian Biokimia FKUI. 2001. Biokimia Eksperimen Laboratorium. Jakarta: Widya Medika.
- Bintang, M. 2010. Biokimia Teknik Penelitian. Jakarta: Erlangga.
- Brownie AC & Kernohan JC, 1999. Biochemistry. Harcourt Publishers Ltd. Edinburgh. pp 69-130.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. 1999. Free Radical in Biology and Medicine 3rd ed. Newyork: Oxford University Press. pp 301-495.
- Horton, HR et al, 2002. Principles of Biochemistry. Pearson Education. New Jersey. pp 264-275
- Martini, Tri. Petunjuk Praktikum Biokimia. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Mayes PA, 2003. Oksidasi Asam Lemak: Ketogenesis dalam Biokimia Harper Edisi 25. EGC. Jakarta. hal 225-234.
- Mayes PA, 2003. Pengangkut dan Penyimpanan Lipid Edisi 25. EGC. Jakarta. Hal 254-269.
- Montgomery. Conway. Spector. 1993. Biokimia Berorientasi Pada Kasus Klinik. Jakarta: Binarupa Aksara. Hal. 417-421.
- Panil, S. 2008. Memahami Teori dan Praktik Biokimia Dasar Medis. EGC. Jakarta.
- Stryer, L. 2000. Biochemistry ed. 4. San Fransisco: W. H. Freeman and Company.
- Tejasari. 2005. Nilai-Gizi Pangan. Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Voet, D & Voet, JG, 2004. Biochemistry 3rd Edition. John Willey & Son. New York. pp765-796; 909-928.