

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS PROF. DR. HAMKA

MODUL PRAKTIKUM BIOKIMIA

HANIFAH RAHMI, S.SI, M.BIOMED.
RIZKY ARCINTHYA RACHMANIA, M.SI.
FITRI YUNIARTI, M.SI.

2020



PENGESAHAN

MODUL PRAKTIKUM BIOKIMIA

TIM PENYUSUN

HANIFAH RAHMI, S.SI., M.BIOMED.

RIZKY ARCINTHYA RACHMANIA, M.SI.

FITRI YUNIARTI, M.SI.

JAKARTA, 5 MARET 2020

KETUA PROGRAM STUDI

APT. KORI YATI, M.FARM.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah Yang Maha Esa, atas limpahan rahmat dan petunjuknya sehingga modul kegiatan praktikum dapat diselesaikan. Modul praktikum ini disusun guna memberi petunjuk dan membantu para mahasiswa dalam pelaksanaan kegiatan praktikum biokimia, Program Studi Farmasi UHAMKA.

Materi praktikum yang disajikan dalam penyusunan praktikum ini terdiri dari beberapa topik percobaan yang meliputi pengenalan sifat-sifat enzim secara umum, penentuan aktivitas enzim, kemampuan mengisolasi enzim, dan aplikasi enzim dalam bidang industri.

Mahasiswa peserta praktikum diharapkan mampu mengaplikasikan teori-teori yang ada dengan praktek yang dilakukan, baik pada saat kegiatan praktikum berlangsung maupun saat melakukan penelitian skripsi. Meskipun Praktikum Biokimia ini merupakan mata kuliah dasar, namun prakteknya dapat diaplikasikan di berbagai bidang ilmu kesehatan.

Penyusun menyadari bahwa modul praktikum ini masih jauh dari sempurna dan masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penyusun sangat mengharapkan kritik dan saran guna perbaikan untuk dapat lebih menyempurnakan di kemudian hari.

DAFTAR ISI

<u>KATA PENGANTAR</u>	3
<u>DAFTAR ISI</u>	4
<u>DAFTAR GAMBAR</u>	7
<u>TATA TERTIB PRAKTIKUM</u>	8
<u>DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM</u>	9
<u>PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM</u>	10
<u>PRAKTIKUM 1: PEMBUATAN VCO SECARA ENZIMATIS</u>	11
1. KOMPETENSI DASAR	11
2. INDIKATOR CAPAIAN	11
3. TUJUAN PRAKTIKUM	11
4. URAIAN TEORI	11
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	13
6. EVALUASI	14
7. SOAL LATIHAN	15
8. DAFTAR PUSTAKA	16
<u>PRAKTIKUM 2: FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI AKTIVITAS ENZIM : PENGARUH SUHU DAN pH TERHADAP AKTIVITAS KATALASE SECARA KUALITATIF</u>	17
1. KOMPETENSI DASAR	17
2. INDIKATOR CAPAIAN	17
3. TUJUAN PRAKTIKUM	17
4. URAIAN TEORI	18
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	20
6. EVALUASI	22
7. SOAL LATIHAN	23
8. DAFTAR PUSTAKA	24
<u>PRAKTIKUM 3: FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI AKTIVITAS ENZIM : PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT, PENETAPAN K_m DAN V_{max} ENZIM AMILASE</u>	25
1. KOMPETENSI DASAR	25
2. INDIKATOR CAPAIAN	25
3. TUJUAN PRAKTIKUM	25
4. URAIAN TEORI	25
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	27

6. EVALUASI	28
7. SOAL LATIHAN	30
8. DAFTAR PUSTAKA	31

**PRAKTIKUM 4: FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI
AKTIVITAS ENZIM : PENGARUH KONSENTRASI ENZIM DAN
LOGAM TERHADAP AKTIVITAS AMILASE** **32**

1. KOMPETENSI DASAR	32
2. INDIKATOR CAPAIAN	32
3. TUJUAN PRAKTIKUM	32
4. URAIAN TEORI	32
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	34
6. EVALUASI	36
7. SOAL LATIHAN	38
8. DAFTAR PUSTAKA	39

PRAKTIKUM 5: GLIKOLISIS ANAEROB DALAM SEL RAGI **41**

1. KOMPETENSI DASAR	41
2. INDIKATOR CAPAIAN	41
3. TUJUAN PRAKTIKUM	41
4. URAIAN TEORI	41
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	44
6. EVALUASI	45
7. SOAL LATIHAN	46
8. DAFTAR PUSTAKA	47

**PRAKTIKUM 6: ISOLASI AMILASE DARI CAIRAN PANKREAS
DENGAN TEKNIK *SALTING OUT*** **48**

1. KOMPETENSI DASAR	48
2. INDIKATOR CAPAIAN	48
3. TUJUAN PRAKTIKUM	48
4. URAIAN TEORI	48
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	50
6. EVALUASI	51
7. SOAL LATIHAN	52
8. DAFTAR PUSTAKA	54

**PRAKTIKUM 7: ISOLASI AMILASE DARI CAIRAN PANKREAS
DENGAN TEKNIK DIALISIS (LANJUTAN)** **55**

1. KOMPETENSI DASAR	55
2. INDIKATOR CAPAIAN	55
3. TUJUAN PRAKTIKUM	55
4. URAIAN TEORI	55
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	56
6. EVALUASI	57

7. SOAL LATIHAN	58
8. DAFTAR PUSTAKA	59
<u>PRAKTIKUM 8: PENGUKURAN KADAR PROTEIN</u>	<u>60</u>
1. KOMPETENSI DASAR	60
2. INDIKATOR CAPAIAN	60
3. TUJUAN PRAKTIKUM	60
4. URAIAN TEORI	60
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	61
6. EVALUASI	62
7. SOAL LATIHAN	63
8. DAFTAR PUSTAKA	64
<u>PRAKTIKUM 9: PENENTUAN AKTIVITAS AMILASE SECARA KUANTITATIF</u>	<u>65</u>
1. KOMPETENSI DASAR	65
2. INDIKATOR CAPAIAN	65
3. TUJUAN PRAKTIKUM	65
4. URAIAN TEORI	65
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	66
6. EVALUASI	67
7. SOAL LATIHAN	69
8. DAFTAR PUSTAKA	70
<u>PRAKTIKUM 10: ISOLASI KASEIN DARI SUSU SECARA KIMIA</u>	<u>71</u>
1. KOMPETENSI DASAR	71
2. INDIKATOR CAPAIAN	71
3. TUJUAN PRAKTIKUM	71
4. URAIAN TEORI	71
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	73
6. EVALUASI	73
7. SOAL LATIHAN	75
8. DAFTAR PUSTAKA	76
<u>PRAKTIKUM 11: HIDROLISIS PROTEIN DENGAN CARA KIMIA</u>	<u>77</u>
1. KOMPETENSI DASAR	77
2. INDIKATOR CAPAIAN	77
3. TUJUAN PRAKTIKUM	77
4. URAIAN TEORI	77
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	79
6. EVALUASI	80
7. SOAL LATIHAN	82
8. DAFTAR PUSTAKA	83

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Reaksi hidrolisis pada peptida.....	12
Gambar 2. Mekanisme pembuatan minyak dengan enzim.....	12
Gambar 3. (a) Kurva Michaelis-Menten (b) Garis Lineaweaver-Burk.....	26
Gambar 4. Pengaruh konsentrasi enzim dengan kecepatan reaksi enzim	33
Gambar 5. Glikolisis dan oksidasi asam piruvat pada kondisi aerob dan anaerob	42
Gambar 6. Fermentasi anaerob pada sel ragi	43
Gambar 7. Hidrolisis pati secara enzimatik menggunakan amilase	49
Gambar 8. Dialisis terjadi hingga tercapai keseimbangan	56
Gambar 9. Hidrolisis Tripeptida	79

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Para praktikum harus sudah siap di depan ruang praktikum lima belas menit sebelum waktu praktikum dimulai
2. Sebelum praktikum, eksperimen yang akan dikerjakan harus sudah dipersiapkan, dibuat rencana kerja dan pembagian waktu dalam sebuah buku catatan, serta latar belakang teori yang sudah dikuasai
3. Praktikan yang oleh asisten dinilai tidak siap, tidak diperbolehkan mengikuti praktikum
4. Segala pengamatan ditulis dalam buku catatan lab, dan pula lembar laporan dalam buku penuntun praktikum
5. Setiap kelompok diharuskan membuat satu laporan untuk setiap eksperimen, dan laporan harus dikumpulkan selambat-lambatnya satu minggu setelah eksperimen dikerjakan
6. Praktikan hanya diperbolehkan menggunakan laboratorium pada waktu praktikumnya sendiri, kecuali jika mendapat izin dari penanggung jawab praktikum
7. Di dalam laboratorium praktikan diharuskan memakai baju dan perlengkapan praktikum (jas lab, sepatu tertutup, masker, sarung tangan dan penutup kepala)
8. Inventarisasi alat-alat dilakukan pada waktu-waktu yang ditetapkan sebelum dan sesudah masa praktikum. Alat-alat yang diterima menjadi tanggung jawab kelompok. Jika ada alat yang pecah atau hilang kelompok harus sudah mengganti paling lambat satu minggu setelah alat pecah.
9. Selama praktikum harus dijaga ketenangan dan kebersihan
10. Selama kegiatan praktikum tidak diperbolehkan makan, minum dan merokok di dalam laboratorium.
11. Dilarang menghisap pipet dengan mulut untuk asam dan basa kuat seperti HCl, H₂SO₄, NH₄OH, dan NaOH.
12. Apabila terjadi kontak dengan bahan-bahan berbahaya, korosif, atau beracun, segera bilas dengan air sebanyak-banyaknya selama ± 15 menit dan segera lapor kepada asisten/dosen.
13. Pelanggaran tata tertib akan mengakibatkan sanksi akademis

DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM

Peningkatan kemampuan praktek di dalam laboratorium menjadi keharusan bagi mahasiswa di Bidang Ilmu Farmasi. Biokimia menjadi salah satu mata kuliah praktikum yang sangat penting dalam meningkatkan *hard skill* dan *soft skill* dari peserta kegiatan praktikum. Modul ini disusun untuk mengenalkan dan mengasah kemampuan mahasiswa dalam menggunakan metode-metode penentuan dan pengukuran aktivitas enzim serta mengisolasi protein maupun enzim dari beberapa senyawa yang memiliki aktivitas biokimia. Mahasiswa yang mengikuti mata kuliah ini harus memenuhi kriteria tertentu, yaitu telah menyelesaikan mata kuliah Biokimia.

Percobaan-percobaan yang terdapat di dalam modul ini diharapkan dapat digunakan sebagai pembelajaran Ilmu Biokimia yang didasarkan pada pengalaman pada saat mempraktekkan teknik-teknik yang tercantum di dalamnya. Teknik-teknik yang diajarkan meliputi cara pembuatan VCO yang telah diketahui memiliki banyak manfaat bagi kesehatan, melakukan penentuan aktivitas enzim, serta faktor-faktor yang mempengaruhinya. Selain itu, mahasiswa juga melakukan pembuktian teori glikolisis anaerob (fertilisasi) serta memisahkan protein dari suatu sampel biologis hingga menganalisis hasil isolasi. Semua teknik tersebut melibatkan beberapa instrument yang harus dikuasai mahasiswa.

Instrumen-instrumen yang digunakan pada kegiatan praktikum ini tidak hanya peralatan gelas tetapi juga inkubator, refluks, sentrifuse, dan spektrofotometer. Alat tersebut sejatinya harus dikuasai oleh calon sarjana farmasi disamping alat lainnya. Sesuai namanya, mata kuliah ini tidak hanya berisi eksperimen dan instrumen, melainkan juga mempelajari reaksi-reaksi biokimia yang terjadi di dalam sampel yang digunakan. Bagaimana reaksi enzimatik yang terjadi pada pembuatan VCO hingga protein dipisahkan dari campuran sampel biologi dapat dipelajari pada Mata Kuliah Praktikum Biokimia.

Tidak hanya dituntut memiliki keterampilan, mahasiswa juga diharapkan mampu menganalisis hasil-hasil eksperimen yang diperoleh serta melaporkannya dalam bentuk jurnal. Seperti halnya kegiatan praktikum yang lain, kehadiran pada mata kuliah ini adalah 100% yang artinya mahasiswa tidak diperkenankan absen dan jika berhalangan hadir, maka diwajibkan mengganti pada hari lain dengan materi yang sama. Penilaian mata kuliah ini meliputi kinerja di laboratorium, kedisiplinan menyelesaikan tugas, keterampilan, serta kemahiran menjawab pertanyaan yang diberikan baik saat ujian akhir, ujian tengah semester, maupun soal di dalam modul ini.

PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM

Modul praktikum ini bersifat eksperimen yang dilengkapi dengan tujuan, uraian dan prosedur kerja.

1. Mahasiswa dianjurkan membaca modul ini sebelum kegiatan praktikum berlangsung agar kegiatan dapat dikerjakan dengan baik dan lancar.
2. Percobaan-percobaan dilakukan sesuai prosedur yang ada di dalam modul ini.
3. Hasil percobaan ditulis dan dilaporkan pada lembar yang disediakan dalam modul ini.
4. Soal atau pertanyaan yang ada dapat dikerjakan langsung setelah kegiatan praktikum berlangsung pada lembar yang tersedia.
5. Hasil percobaan kerja kelompok ditulis dan dilaporkan pada lembar yang berbeda berupa jurnal. Dengan demikian, hasil percobaan dapat didiskusikan secara lebih mendalam berdasarkan teori yang di dapat.
6. Setelah melengkapi hasil kegiatan praktikum dan menjawab soal pertanyaan, modul dapat dikumpulkan untuk dinilai oleh dosen. Pengumpulan modul paling lambat 2 hari setelah kegiatan berlangsung. Apabila terlambat dari waktu yang ditentukan, maka dianggap tidak melengkapi modul.
7. Pengumpulan jurnal (poin 5) paling lambat pada pertemuan selanjutnya (seminggu).
8. Modul yang sudah dinilai dapat diambil pada rak yang telah disediakan, tepatnya 3 hr setelah dikumpulkan.
9. Penilaian modul dan jurnal merupakan nilai tugas dengan komposisi 25% dari keseluruhan nilai yang ada.

PRAKTIKUM 1: PEMBUATAN VCO SECARA ENZIMATIS

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu menjelaskan mekanisme pembuatan VCO dari santan kelapa menggunakan enzim papain atau bromelin.
- b. Mahasiswa mampu menjelaskan keunggulan VCO dari proses enzimatis.

2. Indikator Capaian

- a. Ketepatan dalam menjelaskan mekanisme pembuatan VCO
- b. Ketepatan dalam menjelaskan keunggulan VCO dari proses enzimatis

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

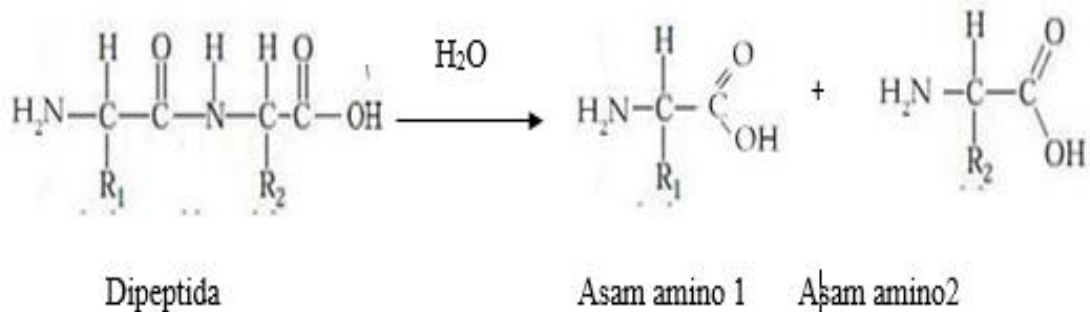
- a. Memahami reaksi hidrolisis peptide menjadi senyawa yang lebih sederhana.
- b. Memahami proses pembuatan VCO secara enzimatis.

4. Uraian Teori

Kandungan kimia pada daging kelapa adalah air, protein, dan lemak yang merupakan jenis emulsi dengan emulgatornya. Emulsi adalah zat cair yang tidak dapat tercampur yang terdiri dari dua fase (air dan minyak). Emulgator adalah zat yang berfungsi untuk mempererat emulsi, dalam hal ini emulgatornya adalah protein. Pada ikatan protein akan membungkus butiran butiran minyak kelapa dengan suatu lapisan tipis sehingga butiran butiran minyak tidak bisa bergabung, begitu juga dengan air. Emulsi tidak akan terpecah, karena masih ada tegangan muka protein air yang lebih kecil dari protein minyak. Untuk merusak ikatan emulsi lemak pada santan kelapa menggunakan metode enzimatis.

Santan adalah cairan yang berwarna putih yang diperoleh dari pemerasan. Jika santan didiamkan akan terpisah menjadi dua fase yaitu fase skim yang jernih bagian bawah dan fase krim yang berwarna putih susu di bagian atas. Minyak dapat

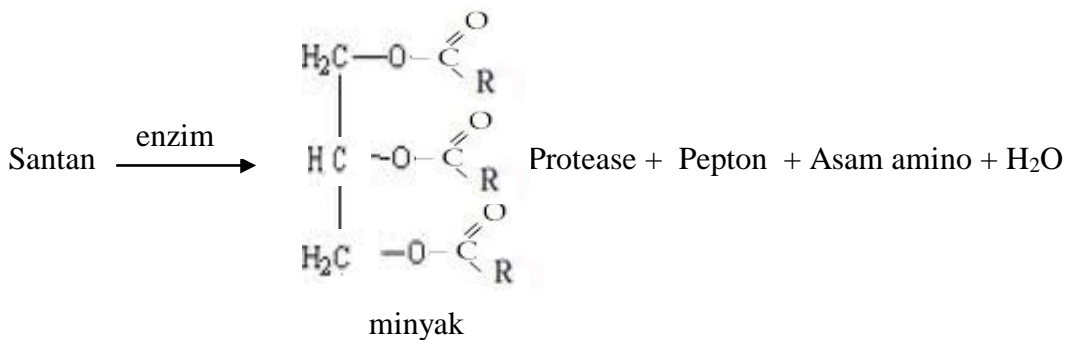
dikeluarkan dari sistem emulsi apabila ikatan peptida pada protein rusak. Mekanisme reaksi hidrolisis digambarkan skema sebagai berikut :



Gambar 1. Reaksi hidrolisis pada peptida (Hawab, 2004).

Pembuatan VCO dengan cara enzimatik merupakan minyak dalam santan dengan penambahan enzim. Ikatan protein minyak yang ada pada emulsi santan bisa juga dipecah dengan bantuan enzim. Enzim yang digunakan untuk memecahkan ikatan lipoprotein dalam emulsi lemak adalah enzim hidrolase dan protease seperti bromelin dari buah nanas atau papain dari getah pepaya. Protein menyerap molekul-molekul air dengan bantuan enzim, maka protein akan terdegradasi menjadi senyawa protease, pepton dan asam-asam amino (Wirahadikusumah, M. 2008).

Hal inilah yang menyebabkan protein sebagai emulgator pada krim santan akan terdegradasi melalui proses hidrolisis dengan bantuan enzim hidrolase, pemecahan protein menyebabkan sistem emulsi menjadi tidak stabil sehingga minyak dapat terpisah dari sistem emulsi. Mekanisme pembentukan minyak adalah sebagai berikut :



Gambar 2. Mekanisme pembuatan minyak dengan enzim (Haeniyah, 2004)

Reaksi hidrolisis ini ikatan peptide pada protein dapat diputus sehingga protein akan terdegradasi menjadi bagian yang sederhana yaitu komponen asam amino dan komponen karboksil, sehingga minyak yang terikat oleh ikatan tersebut akan keluar dan menggumpal menjadi satu. Karena minyak memiliki massa jenis lebih rendah dibandingkan air, maka posisi minyak berada paling atas, kemudian disusul dengan protein (blondo) dan terakhir air.

VCO yang dihasilkan dari proses enzimatik memiliki keunggulan antara lain VCO berwarna bening, kandungan asam lemak di dalam VCO tidak banyak berubah sehingga khasiatnya tetap tinggi, tidak mudah tengik karena komposisi asam lemaknya tidak banyak berubah. Rendahnya yang dihasilkan tinggi. Kelemahannya dalam pembuatan VCO dengan metode ini adalah membutuhkan waktu yang lama dalam proses denaturasi protein untuk memisahkan minyak dari ikatan lipoprotein, waktu yang dibutuhkan dalam proses denaturasi protein adalah sekitar 20 jam. Menurut Setiadji (2004), minyak kelapa (VCO) merupakan obat antivirus termasuk virus HIV. Minyak tersebut mengandung 48% asam laurat, yaitu asam lemak jenuh dengan rantai karbon sedang (MCFA, Medium Chain Fatty Acids) yang mudah diserap oleh tubuh, sehingga dapat langsung masuk dalam metabolisme menghasilkan energi, dan tidak menyebabkan timbunan jaringan lemak. Selain itu di dalam tubuh asam laurat akan diubah menjadi monolaurat yang bersifat antimikrobia.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Bahan : Santan kelapa 500 ml, Enzim bromelin atau papain.

Alat : Botol Air mineral, Gelas plastik, alumunium foil, sendok pengaduk dan sendok besar, Timbangan, Corong pisah, Gelas ukur, Kertas saring.

b. Prosedur Kerja

Pembuatan Krim Santan Buah Kelapa

Pembuatan krim santan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging buah kelapa yang sudah tua. Daging buah kelapa dibersihkan dan diparut kemudian ditambahkan air dengan komposisi 1:1 (b/b) selanjutnya diperas

hingga diperoleh santan. Santan kelapa yang diperoleh disaring menggunakan kain saring. Kemudian santan kelapa ditampung dalam stoples transparan, didiamkan selama satu jam sehingga terbentuk dua lapisan krim pada bagian atas dan skim pada bagian bawah. Untuk memperoleh krim santan, maka skim yang terlarut dalam air pada bagian bawah dibuang.

Pembuatan VCO dengan bantuan enzim papain

Pembuatan VCO menggunakan krim santan yang diperoleh pada perlakuan di atas. Krim santan dimasukkan dalam gelas beaker sebanyak 200 gram kemudian dicampurkan dengan ekstrak enzim papain kasar dari getah pepaya sebanyak 2 gram dan diaduk sampai homogen selama 32 menit, selanjutnya gelas beaker tersebut ditutup menggunakan kertas alumunium. Campuran ini didiamkan selama 20 jam sehingga terbentuk tiga lapisan air pada bagian dasar, protein pada bagian tengah dan minyak pada bagian atas. Kemudian lapisan minyak paling atas diambil dengan pipet tetes dan disaring dengan kertas saring. VCO yang dihasilkan dihitung rendemennya.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{VCO yang dihasilkan}}{\text{Krim Santan}} \times 100 \%$$

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

Krim santan	Blanko 200 mL	Uji 200 mL
Papain kasar	----	2 gram
Rendemen	?	?

b. Pembahasan

Dari hasil percobaan dan perhitungan yang didapat, lakukan analisa dan pembahasan tentang hasil rendemen yang di dapat antara blanko dan uji.

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Pada praktikum pembuatan VCO secara enzimatis, kita menggunakan enzim bromelin atau papain dalam membantu proses pembuatannya. Mengapa enzim tersebut bisa membantu dalam proses pembuatan VCO?

- b. Pada proses pembuatan VCO, ikatan peptida pada protein santan harus dihidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana, jelaskan mengapa hal tersebut harus dilakukan.

8. Daftar Pustaka

- Arum Palupi. 2011, pengaruh penambahan ekstrak getah pepaya pada pembuatan minyak kelapa murni. Skripsi. Fakultas Farmasi UHAMKA, Jakarta.
- Haeniyah. (2004). Pembuatan VCO secara enzimatis menggunakan papain dan bromelin. (Skripsi tidak publikasikan). Malang: Universitas Brawijaya.
- Hawab, H.M. 2004. Pengantar Biokimia. Bayumedia Publshing : Malang.
- Setiadji, Bambang. 2004. Memancing Minyak Dengan Minyak Kelapa. TEMPO, 18 Juli 2004.
- Wirahadikusumah, M. (2008). Biokimia protein enzim dan asam nukleat. Bandung: ITB.

PRAKTIKUM 2 :
FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI AKTIVITAS
ENZIM : PENGARUH SUHU DAN pH TERHADAP
AKTIVITAS KATALASE SECARA KUALITATIF

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu menunjukkan hubungan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim katalase secara kualitatif
- b. Mahasiswa mampu menunjukkan bahwa variasi pH mempengaruhi aktivitas enzim katalase secara kualitatif dilihat dari katalase mendekomposisi substrat H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2
- c. Mahasiswa mampu menganalisis aktivitas enzim katalase dari berbagai macam sumber enzim yang berbeda dilihat dari katalase mendekomposisi substrat H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2

2. Indikator Capaian

- a. Ketepatan dalam menunjukkan hubungan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim katalase secara kualitatif
- b. Ketepatan dalam menunjukkan bahwa variasi pH mempengaruhi aktivitas enzim katalase secara kualitatif
- c. Ketepatan dalam menganalisis aktivitas enzim katalase dari berbagai macam sumber enzim yang berbeda dilihat dari katalase

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Memahami pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim katalase secara kualitatif
- b. Menganalisis aktivitas enzim katalase dari berbagai macam sumber enzim dalam menghidrolisis H_2O_2 .

4. Uraian Teori

Enzim atau ferment adalah suatu protein yang berfungsi sebagai biokatalisator reaksi-reaksi biokimia pada makhluk biologi. zat-zat yang diuraikan oleh reaksi disebut substrat, dan yang baru terbentuk dari reaksi disebut produk. Spesifisitas enzim sangat tinggi terhadap substratnya, dan enzim mempercepat reaksi kimia spesifik tanpa pembentukan produk samping. Enzim ini bekerja dalam cairan larutan encer, suhu, dan pH yang sesuai dengan kondisi fisiologis biologis (Poedjadi A., & Supriyani, 2006). Melalui aktivitasnya, sistem enzim terkoordinasi dengan baik sehingga menghasilkan hubungan yang harmonis diantara sejumlah aktivitas metabolik yang berbeda, semuanya mengacu atau menunjang kehidupan. Enzim merupakan suatu protein, maka sintesisnya dalam tubuh diatur dan dikendalikan oleh sistem genetika, seperti halnya dengan sintesis protein pada umumnya (Wirahadikusumah, M. 2008).

Aktivitas enzim disebut juga sebagai kinetik enzim. Kinetik enzim adalah kemampuan enzim dalam membantu reaksi kimia. Kemampuan enzim ini dapat dihitung dengan mengukur jumlah produk yang terbentuk, atau dengan menghitung kurangnya substrat dalam satuan waktu tertentu. Selain itu, dapat juga dihitung kurangnya substrat dalam satuan waktu tertentu. Selain itu dapat juga dihitung dengan peningkatan atau penurunan koenzim. Menghitung jumlah substrat, produk, atau koenzim di laboratorium tidak mudah karena jumlahnya yang sangat sedikit. Oleh karena itu, praktek menghitung aktivitas enzim adalah dengan mengukur perubahan absorbansi dalam satuan waktu, pH, dan suhu tertentu sewaktu reaksi berjalan. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu : suhu, pH, kadar substrat, kadar enzim, inhibitor, dan toksik enzim (Salwanee S, *et al.*, 2013).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

Sebagian besar enzim memiliki suhu optimum yang sama dengan suhu normal sel organisme tersebut. Tiap enzim memerlukan suhu optimum yang berbeda-beda karena enzim adalah protein, yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu berubah. Enzim adalah protein, yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu berubah. Kenaikan suhu di atas suhu optimum dapat

mengakibatkan peningkatan atau penurunan aktivitas enzim. Secara umum, tiap kenaikan suhu 10°C , kecepatan reaksi menjadi 2 kali lipat dalam batas suhu yang wajar. Hal tersebut juga berlaku pada enzim. Panas yang ditimbulkan akibat kenaikan suhu dapat mempercepat reaksi sehingga kecepatan molekuler meningkat. Hasilnya adalah frekuensi dan daya tumbukan molekuler juga meningkat (Soewoto H, dkk., 2001).

Akibat kenaikan suhu dalam batas wajar, terjadi perubahan struktur enzim (denaturasi). Enzim yang terdenaturasi akan kehilangan kemampuan katalisnya. Sebagian besar enzim mengalami denaturasi yang tidak dapat balik pada suhu $55\text{-}65^{\circ}\text{C}$. pada suhu kurang dari suhu optimum, aktivitas enzim mengalami penurunan. Enzim masih beraktivitas pada suhu kurang dari 0°C dan aktivitasnya hampir terhenti pada suhu 196°C .

Pengaruh pH (keasaman) terhadap aktivitas enzim

Seluruh enzim peka terhadap perubahan pH. Enzim menjadi nonaktif jika diperlukan pada asam basa yang sanfat kuat. Sebagian besar enzim dapat bekerja paling efektif pada kisaran pH lingkungan yang agak sempit. Di luar pH optimum tersebut, kenaikan atau penurunan pH menyebabkan penurunan aktivitas enzim dengan cepat. Pengaruh pH terhadap kerja enzim dapat terdeteksi karen enzim terdiri atas protein. Jumlah muatan positif dan negatif yang terkandung di dalam molekulprotein serta bentuk permukaan protein sebagian ditentukan oleh pH (Soewoto H, dkk., 2001).

Pengaruh konsentrasi enzim, substrat dan kofaktor terhadap aktivitas enzim

Jika pH dan suhu suatu sistem enzim dalam keadaan konstan serta jumlah substrat berlebihan, laju reaksi adalah sebanding dengan enzim yang ada. Jika pH, Suhu dan konsentrasi enzim dalam keadaan konstan, reaksi awal hingga batas tertentu sebanding dengan substrat yang ada. Jika sistem enzim memerlukan suatu koenzim atau ion kofaktor, konsentrasi substrat dapat menentukan laju keseluruhan sistem enzim (Bettelheim FA, *et al.* 2010).

Pengaruh inhibitor terhadap aktivitas enzim

Kerja enzim juga dipengaruhi oleh molekul lain. Inhibitor adalah molekul yang menurunkan aktivitas enzim, sedangkan aktivator adalah yang meningkatkan aktivitas enzim. Banyak obat dan racun adalah inhibitor enzim. Zat kimia tersebut merupakan senyawa selain substrat yang biasa terikat pada sisi aktif enzim (substrat normal) sehingga antara substrat dan inhibitor terjadipersaingan untuk mendapatkan sisi aktif. Persaingan tersebut terjadi karena inhibitor mempunyai kemiripan kimiawi dengan substrat normal. Pada konsentrasi substrat yang rendah akan terlihat dampak inhibitor terhadap laju reaksi, kondisi tersebut berbalik bila konsentrasi substrat naik (Pereira JC, *et al.*, 2017).

5. Pelaksanaan Praktikum

1) Pengaruh suhu pada aktivitas enzim katalase dengan H₂O₂

a. Alat dan Bahan

Alat : Tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, pisau, penggaris, termometer, kompor listrik.

Bahan : Kentang, H₂O₂, air panas, air dingin/es.

b. Prosedur Kerja

Prosedur 1

1. Kupas kentang dan potong dadu ukuran 5mm.
2. Ambil tabung reaksi, berilah tanda garis dari dasar tabung 5 cm. Kemudian masukan potongan kentang dibawah garis.
3. Tambahkan H₂O₂ hingga tanda garis
4. Setelah satu menit, ukur ketinggian busa/gelembung gas.

Prosedur 2

1. Isi beaker glass dengan air panas 40-45 ° C. Masukan 5 ml H₂O₂ ke tabung reaksi. m asukan tabung reaksi tersebut kedalam air panas selama 3 menit

2. Siapkan tabung reaksi berisi kentang seperti prosedur 1. Tambahkan H_2O_2 ke tabung yang berisi kentang, ukur ketinggian busa/gelembung gas

Prosedur 3

Lakukan hal seperti prosedur 2, namun H_2O_2 direndam dalam air dingin dan masukkan pada potongan kentang. Amati ketinggian gelembung yang terbentuk.

2) Pengaruh pH pada reaksi enzim katalase dengan H_2O_2

a. Alat dan Bahan

Alat : Tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, pisau, penggaris, termometer,

Bahan : H_2O_2 , HCl 1M, NaOH 1 M, hati sapi/ayam

b. Prosedur :

Prosedur 1

1. Gerus hati sapi/ayam dan tempatkan dalam tabung reaksi.
2. Ambil tabung reaksi, berilah tanda garis dari dasar tabung 1 cm. Kemudian masukan gerusan hati dibawah garis.
3. Tambahkan H_2O_2 , hingga tanda garis.
4. Ukur ketinggian busa/gelembung gas.

Prosedur 2

1. Masukan 1ml H_2O_2 ke tabung reaksi.
2. Siapkan tabung reaksi berisi hati seperti prosedur 1. Tetesi dengan beberapa tetes HCl 1M.
3. Tambahkan H_2O_2 , ke tabung yang berisi gerusan hati dan HCl, ukur ketinggian busa/gelembung

Prosedur 3

Lakukan hal seperti prosedur 2, namun masukkan pada NaOH pada gerusan hati. Tambahkan H_2O_2 , amati ketinggian gelembung yang terbentuk.

3) Pengaruh berbagai macam substrat pada reaksi enzim katalase dengan H_2O_2

a. Alat dan Bahan

Alat : Tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, pisau, penggaris, termometer.

Bahan : Hati, jantung, pepaya, pasir, H_2O_2 , air panas, air dingin/es

b. Prosedur

1. Ambil beberapa tabung reaksi. Berilah tanda garis dari dasar tabung 1 cm.
2. Siapkan gerusan hati, jantung, pepaya, dan pasir dan tempatkan dalam tabung reaksi hingga ketinggian dibawah 1 cm.
3. Tambahkan H_2O_2 hingga tanda garis.
4. Ukur ketinggian busa/gelembung gas pada masing-masing tabung reaksi yang berisi substrat.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

- Pengaruh suhu pada aktivitas enzim katalase dengan H_2O_2

Prosedur	Tinggi busa/gelembung gas
Prosedur 1	
Prosedur 2	
Prosedur 3	

- Pengaruh pH pada reaksi enzim dengan H_2O_2

Prosedur	Tinggi busa/gelembung gas
Prosedur 1	
Prosedur 2	
Prosedur 3	

- Pengaruh berbagai macam sampel pada reaksi enzim katalase dengan H_2O_2

Sampel	Tinggi busa/gelembung gas
Hati	
Jantung	
Pepaya	
Pasir	
Kentang	

b. Pembahasan

Dari hasil percobaan dan pengukuran tinggi busa yang didapatkan, lakukan analisa dan pembahasan tentang hasil dari aktivitas enzim katalase terhadap ke tiga parameter yang digunakan.

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Pada praktikum kali ini dilakukan pengukuran tinggi busa yang dihasilkan dari aktivitas enzim katalase. Jelaskan apa yang menyebabkan terbentuknya gelembung busa pada praktikum ini?

- b. Pada praktikum ini dilakukan penambahan H_2O_2 sebagai substratnya. Jelaskan tujuan penambahan H_2O_2 tersebut?

8. Daftar Pustaka

- Poedjiadi, A., Supriyani, T.F.M.. 2006. Dasar-dasar Biokimia, Eksperimen Laboratorium, Widya Medika, Bagian Biokimia FKUI. Jakarta
- Bettelheim FA, Brown WH, Campbell MK, Farrel SO. 2010. Introduction to General, Organic, and Biochemistry. 9th Edition. Brooks/Cole, Cengage Learning. Belmont.
- Pereira JC, Giese EC, Moretti MM, Gomes S, Perrone OM, Boscolo M, Silva R, Gomes E, Alonso D, Martins B. (2017). Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. In M. Senturk (Ed.), Enzyme Inhibitors and activators (pp. 139-164). Rijeka, Croatia: InTech.
- Salwanee S, Wanaida WM, Mamot S, Maskat MY, Ibrahim S. (2013). Effects of Enzyme Concentration, Temperature, pH and Time on the Degree of Hydrolysis of Protein Extract from Viscera of Tuna. *Sains Malaysian*, 42(3), 279-287.
- Soewoto H, Sadikin M, Kurniati V, Wanandi SI, Retno D, Abadi P, Prijanti AR, Harahap IP, Jusman SW. 2001. Biokimia, Eksperimen Laboratorium, Widya Medika, Bagian Biokimia FKUI. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. (2008). Biokimia protein enzim dan asam nukleat. Bandung: ITB.

PRAKTIKUM 3 :

FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI AKTIVITAS ENZIM : PENETAPAN K_m DAN V_{max} ENZIM AMILASE

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu menunjukkan bahwa konsentrasi substrat mempengaruhi aktivitas enzim amilase secara kuantitatif.

2. Indikator Capaian

- a. Ketepatan dalam menentukan nilai K_m dan V_{max} enzim amylase dengan menggunakan kurva Michaelis-Menten dan Lineweaver Burk

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Memahami pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase dalam menghidrolisis pati.
- b. Memahami tetapan K_m dan Lineweaver-Burk serta kaitannya dengan aktivitas enzim amilase.

4. Uraian Teori

Penyelidikan tentang mekanisme kerja enzim dapat didekati dari beberapa arah, antara lain dari struktur tiga dimensi ataupun dari kecepatan reaksi enzim. Suatu penyelidikan tentang kecepatan reaksi yang terjadi karena perubahan parameter secara eksperimental disebut penyelidikan kinetik enzim.

Telah diketahui, bahwa konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik (katalitik). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzimatik dapat dinyatakan secara kuantitatif. Kurva yang menggambarkan hubungan ini mempunyai bentuk umum hiperbolik. Bentuk kurva hiperbolik itu dapat diekspresikan secara aljabar dan disebut sebagai persamaan Michelis-Menten, dengan $[S]$ = konsentrasi substrat, V_0 = kecepatan reaksi enzimatik pada t

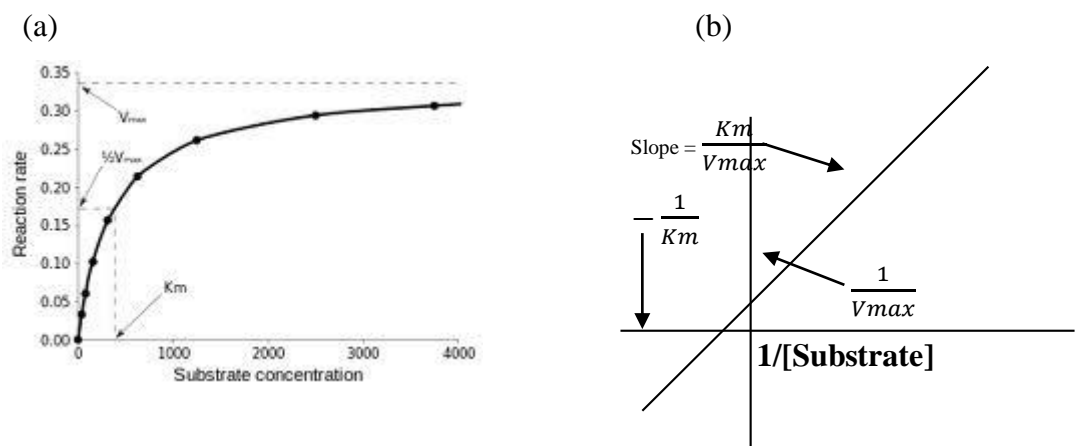
= 0, V_{\max} = kecepatan reaksi enzimatik maksimum dan K_m = tetapan Michaelis-Menten. Persamaan Michaelis-Menten tersebut adalah sebagai berikut :

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Persamaan ini dapat pula diubah secara aljabar ke dalam bentuk yang lebih operasional untuk menghubungkan data yang diperoleh pada percobaan, yaitu dengan dibalik sehingga diperoleh persamaan

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Persamaan ini disebut persamaan Lineaweaver-Burk. Persamaan ini berbentuk garis lurus dengan slope (kemiringan garis) = $a = 1/V_{\max}$ dan intercept (titik potong) pada absis = $-1/K_m$, titik potong pada sumbu tegak (ordinat) = b , adalah K_m/V_{\max} dan garis yang diperoleh disebut lineaweaver-burk Plot.



Gambar 3: (a) Kurva Michaelis-Menten. (b) Garis Lineaweaver-Burk

Gambar diatas menunjukkan grafik dari kedua persamaan tersebut, secara aljabar, hanya diperlukan 3 titik untuk membuat garis lurus, sedangkan untuk membuat garis lengkung seperti hiperbola diperlukan lebih banyak titik. Secara operasional, hal ini akan sangat mempermudah penentuan kedua nilai bilangan tetap tersebut, karena dengan menggunakan persamaan Lineaweaver-Burk pengukuran kecepatan reaksi cukup dilakukan dalam 3 atau 4 konsentrasi substrat saja. Selain itu, dengan menggunakan persamaan tersebut nilai K_m dan V_{\max} dapat langsung dilihat atau dihitung. Sebaliknya, untuk membuat hiperbola yang tepat,

sesuai dengan persamaan, diperlukan jumlah titik yang lebih banyak. Nilai maksimum (V_{max}) sukar ditetapkan, sedangkan nilai K_m harus dihitung secara grafis dari kurva.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat : Tabung reaksi, rak tabung, beaker gelas, Erlenmeyer, gelas ukur, pipet tetes, labu semprot, water bath, spektro Uv-Vis

Bahan : Liur sebagai sumber amilase. Tampunglah 2 mL dalam gelas kimia atau tabung reaksi yang bersih dan kering, larutan pati dalam berbagai konsentrasi, larutan iodium.

b. Prosedur Kerja

1. Encerkan liur 100X dengan air suling.
2. Siapkan larutan pati dengan berbagai konsentrasi (0, 0.2, 0.4, 2, 4, 8, 10 mg/dL)
3. Siapkan 7 pasang tabung reaksi yang bersih dan kering. Tiap pasangan tabung diberi tanda B untuk blanko dan U untuk uji.
4. Pipetkan ke dalam tiap-tiap tabung (lihat tabel)
5. Segera baca serapan (A) pada panjang gelombang 680 nm. Hitung selisih serapan (ΔA) antara tabung B (A pada $t = 0$ menit) dengan tabung U dari tiap suhu.

LARUTAN	TABUNG B	TABUNG U
Larutan pati berbagai konsentrasi	1 mL	1 mL
Kerem pada suhu 37°C paling sedikit 5 menit		
Liur	-	200 μ L
Campurkan baik-baik, keram tepat 1 menit		
Larutan iodium	1 mL	1 mL
Akuades	8 mL	8 mL

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

a. Apakah perbedaan dari tetapan Michaelis-Menten dan Lineweaver-Burk pada praktikum ini ?

b. Persamaan Michaelis-Menten merupakan persamaan kecepatan reaksi enzimatis substrat tunggal yang menyatakan hubungan kuantitatif antara kecepatan reaksi awal (V_0) dengan

8. Daftar Pustaka

- Yohanis Ngili. 2009. Biokimia Metabolisme dan Bioenergetika, Edisi pertama, Graha Ilmu, Jakarta.
- Anna Poedjiadi, F.M. Titin Supriyani. 2006. Dasar-dasar Biokimia, Eksperimen Laboratorium, Widya Medika, Bagian Biokimia FKUI. Jakarta.
- Hafiz Soewoto dkk,. 2001. Biokimia, Eksperimen Laboratorium, Widya Medika, Bagian Biokimia FKUI. Jakarta.
- Bambang subardjo. 2005, Penuntun Praktikum Biokimia. Depdiknas. Universitas Jendral Sudirman. Purwokerto.

PRAKTIKUM 4:
FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI AKTIVITAS
ENZIM : PENGARUH KONSENTRASI ENZIM DAN LOGAM
TERHADAP AKTIVITAS AMILASE

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu menunjukkan hubungan pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim amilase secara kuantitatif.
- b. Mahasiswa mampu menganalisis aktivitas enzim amilase dari berbagai macam logam yang berbeda.

2. Indikator Capaian

- a. Kemampuan dalam menghitung aktivitas enzim amylase dan membuat kurva pengaruh konsentrasi enzim.
- b. Kemampuan dalam menghitung persentase peningkatan aktivitas dan persentase penurunan aktivitas enzim dengan adanya penambahan berbagai macam ion logam.

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat :

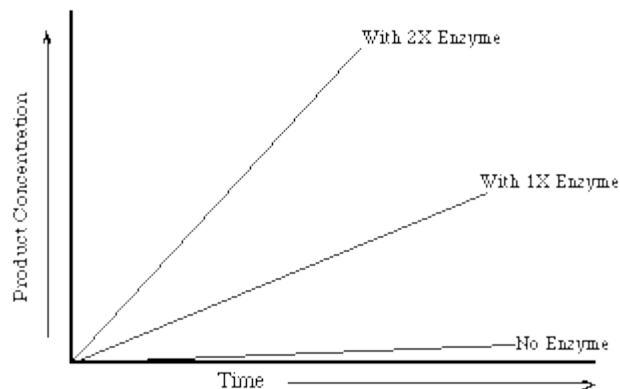
- a. Menunjukkan dan menganalisis hubungan pengaruh konsentrasi enzim dan logam terhadap aktivitas enzim amilase secara kuantitatif.
- b. Mempraktekkan teori bahwa konsentrasi enzim berbanding lurus dengan aktivitas enzim.
- c. Menentukan logam yang dapat meningkatkan aktivitas enzim dan inhibitor enzim.

4. Uraian Teori

Pengetahuan tentang teori kinetik enzim sangat penting dalam melakukan analisis aktivitas enzim agar dapat memahami mekanisme enzimatik dan memilih metode untuk analisis enzim. Sifat biologi enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai

faktor fisiko-kimia. Sama halnya dengan protein, enzim berkerja pada kondisi tertentu yang relatif ketat (Soewoto H, dkk. 2001). Beberapa faktor yang mempengaruhi berlangsungnya kecepatan reaksi enzimatik antara lain, suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, adanya inhibitor dan aktivator.

Apabila konsentrasi substrat dipertahankan konstan dan konsentrasi enzim ditingkatkan, maka kecepatan reaksi enzim juga akan meningkat. Konsentrasi enzim memiliki hubungan linearitas (berbanding lurus) dengan kecepatan atau aktivitas reaksi enzim (Salwanee S, *et al.* 2001). Eksperimen yang dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi enzim 2 kali lipat, menghasilkan peningkatan kecepatan reaksi enzim sebanyak 2 kali lipatnya. Begitu pula, jika konsentrasi enzim ditingkatkan 3 kalinya maka kecepatan reaksi enzim akan meningkat secara linear (Bettelheim, *et al.* 2010).



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi enzim dengan kecepatan reaksi enzim (<http://www.worthington-biochem.com>).

Beberapa ion logam dapat berinteraksi dan membentuk kompleks dengan protein begitu juga dengan enzim sebagai donor elektron, aseptor, ataupun sebagai regulator struktural. Ion logam ini dapat bertindak sebagai aktivator maupun inhibitor terhadap aktivitas suatu enzim, ion ini berinteraksi pada gugus amina atau asam karboksilat dari asam amino pada enzim (Pereira J, *et al.* 2016). Beberapa studi melaporkan ion logam yang dapat mengaktifkan dan menginaktivasi enzim, diantaranya Co^{2+} , Mg^{2+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} dapat mengaktifkan enzim

endoglukanase, sedangkan ion Fe^{2+} dan Cu^{2+} dilaporkan menghambat aktivitas enzim endoglukanase, eksoglukanase, β -glukosidase (Tejirian, A., Xu, F., 2010).

Penelitian yang bertujuan mengetahui aktivator maupun inhibitor enzim amilase telah banyak dilakukan. Amilase termasuk metaloenzim yaitu enzim yang melibatkan ion logam dalam menjalankan aktivitas katalitiknya. Amilase dari genus *Bacillus* sering dimanfaatkan untuk industri karena bersifat tahan panas. Selain karakteristik amilase terhadap suhu dan pH, pengaruh beberapa ion logam terhadap amilase juga dilakukan pengujian (Carvalho RV, *et al.* 2008).

Ion logam yang sering dilaporkan dapat meningkatkan aktivitas amilase yaitu Ca^{2+} , ion ini memiliki afinitas yang lebih kuat dengan enzim dibandingkan ion lainnya (Sudha, 2012). Menurut Carvalho RV, *et al.* (2008), ion Cu^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} dan Mn^{2+} dapat menurunkan aktivitas enzim amilase hingga 80%. Selain itu, senyawa kimia tertentu dilaporkan juga dapat menghambat aktivitas amilase yaitu EDTA, NaClO, dan H_2O_2 .

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu : Pipet tetes, pipet ukur ukuran 1 mL dan 10 mL, *Beaker glass* ukuran 50 mL dan 100 mL, gelas ukur, labu ukur 10 mL, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *waterbath*, pH meter, spektrofotometer, dan *bulp/filler* karet.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu :

- Air liur sebanyak 5 mL
- Larutan pati 0.4 mg/mL yang dilarutkan dengan buffer pH 1, 3, 5, 7, 9, 11
- Larutan pati pH 7 yang dilarutkan bersama ion logam dan EDTA
- Larutan iodium 2% (b/v)
- Akudes

b. Prosedur Kerja

i. Pengaruh variasi konsentrasi enzim

- Encerkan liur 100x, 200x, 300x, 400x dan 500x dengan akuades.
- Siapkan 5 pasang tabung reaksi yang bersih dan kering. Tiap pasangan tabung diberi tanda B untuk blanko dan U untuk uji.
- Pipetkan ke dalam tiap-tiap tabung.

LARUTAN	TABUNG B	TABUNG U
Larutan pati	1 mL	1 mL
Inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit		
Liur yang telah diencerkan (100x – 500x)	-	200 µL
homogenkan baik-baik, inkubasi pada suhu 37°C tepat 1 menit		
Larutan iodium	1 mL	1 mL
Akuades	8 mL	8 mL

- Segera baca serapan (A) pada panjang gelombang 680 nm. Hitung selisih serapan (ΔA) antara tabung B (A pada $t = 0$ menit) dengan tabung U dari tiap suhu.

ii. Pengaruh ion logam dan EDTA

- Encerkan liur 100x dengan akuades.
- Siapkan 6 pasang tabung reaksi yang bersih. Tiap pasangan tabung diberi tanda B untuk blanko dan U untuk uji.
- Pipetkan ke dalam tiap-tiap tabung.
- Segera baca serapan (A) pada panjang gelombang 680 nm. Hitung selisih serapan (ΔA) antara tabung B (A pada $t = 0$ menit) dengan tabung U dari tiap suhu.
- Buatlah kurva yang menggambarkan hubungan kecepatan reaksi enzimatik ($v = \Delta A/\text{menit}$) dengan logam dan EDTA.

LARUTAN	TABUNG B	TABUNG U
Larutan pati dan ion logam/EDTA	1 mL	1 mL
Inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit		
Liur yang telah diencerkan 100x	-	200 µL
homogenkan baik-baik, inkubasi pada suhu 37°C tepat 1 menit		
Larutan iodium	1 mL	1 mL
Akuades	8 mL	8 mL

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

i. Pengaruh variasi konsentrasi enzim

Pengenceran enzim	AB	AU	$\Delta A/\text{menit (v)}$
500X			
400X			
300X			
200X			
100X			

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

Kurva :

ii. Pengaruh ion logam dan EDTA

Ion Logam/EDTA	A_B	A_U	Δ A/menit (v)
EDTA			

Hitung persentase peningkatan atau penurunan aktivitas amilase ?

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

a. Seorang peneliti melakukan eksperimen enzimatik menggunakan katalase yang memiliki aktivitas sebesar 10 Unit untuk mengkatalisis 10 mol hidrogen peroksida. Dalam waktu 1 menit produk yang dihasilkan adalah air dan oksigen. Dari pernyataan di atas buatlah definisi dari aktivitas enzim ?

- b. Dari percobaan yang telah dilakukan bagaimana reaksi katalisis amilase yang terjadi ? Kaitkan hasil percobaan dengan definisi di atas ?
- c. Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, ion logam apakah yang bertindak sebagai aktivator maupun inhibitor ?

8. Daftar Pustaka

- Bettelheim FA, Brown WH, Campbell MK, Farrel SO. 2010. Introduction to General, Organic, and Biochemistry. 9th Edition. Brooks/Cole, Cengage Learning. Belmont.
- Carvalho RV, Correa TLR, Silva JCM, Mansur LRCO, Martins MLL. (2008). Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp.. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 102-107.
- Pereira JC, Giese EC, Moretti MM, Gomes S, Perrone OM, Boscolo M, Silva R, Gomes E, Alonso D, Martins B. (2017). Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. In

- M. Senturk (Ed.), Enzyme Inhibitors and activators (pp. 139-164). Rijeka, Croatia: InTech.
- Salwanee S, Wanaida WM, Mamot S, Maskat MY, Ibrahim S. (2013). Effects of Enzyme Concentration, Temperature, pH and Time on the Degree of Hydrolysis of Protein Extract from Viscera of Tuna. *Sains Malaysian*, 42(3), 279-287.
- Soewoto H, Sadikin M, Kurniati V, Wanandi SI, Retno D, Abadi P, Prijanti AR, Harahap IP, Jusman SW. 2001. Biokimia, Eksperimen Laboratorium, Widya Medika, Bagian Biokimia FKUI. Jakarta.
- Sudha. (2012). Effect of different concentrations of metal ions on alpha amylase production by *Bacillus myloliquefaciens*. *Research in Biotechnology*, 3(4), 67-71.
- Tejirian, A., Xu, F., 2010. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7673–7682.

PRAKTIKUM 5: GLIKOLISIS ANAEROB DALAM SEL RAGI

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip proses glikolisis di dalam sel ragi
- b. Mahasiswa mampu menganalisa hasil reaksi proses glikolisis
- c. Mahasiswa mampu menunjukkan pengaruh inhibitor terhadap proses glikolisis

2. Indikator Capaian

- a. Kesesuaian dalam menjelaskan proses glikolisis di dalam sel ragi
- b. Kemampuan dalam menganalisa hasil reaksi proses glikolisis
- c. Ketepatan dalam menunjukkan pengaruh inhibitor terhadap proses glikolisis

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat :

- a. Menjelaskan proses glikolisis dalam sel ragi.
- b. Menganalisa hasil reaksi proses glikolisis.
- c. Menunjukkan pengaruh inhibitor pada proses glikolisis tersebut.

4. Uraian Teori

Glikolisis berasal dari bahasa Yunani glikos yang artinya manis dan lysis yang artinya terurai. Glikolisis adalah jalur dimana glukosa melalui fruktosa 1,6 bifosfat diubah menjadi piruvat dengan menghasilkan 2 mol ATP/ mol glukosa. Jalur ini terdiri 10 tahapan reaksi enzimatik, yang berfungsi sebagai metabolisme energi inti yang menyediakan energi untuk digunakan oleh sebagian besar organisme dan persiapan glukosa dan karbohidrat lain pada penguraian oksidasi.

Tahapan-tahapan reaksi dalam glikolisis dapat dikelompokkan menjadi 2 yaitu tahapan persiapan dan tahap pembentukan ATP. Tahap persiapan terdiri dari 5 tahap yang merupakan reaksi fosforilasi oleh ATP. Berfungsi untuk mengumpulkan rantai karbon semua heksosa yang telah dimetabolisasi dalam satu

bentuk produk umum, yaitu gliseraldehid 3-fosfat. Tahapan pembentukan ATP (upah glikolisis) terdiri dari 5 tahapan juga, merupakan tahapan dihasilkannya energi dalam bentuk ATP maupun NADH. Energi yang dibebaskan pada saat dua molekul gliseraldehid 3-fosfat diubah menjadi dua molekul piruvat disimpan oleh fosforilasi keempat molekul ADP menjadi ATP.

Untuk melanjutkan glikolisis, NAD^+ dimana sel hanya mempunyai dalam jumlah terbatas, harus didaur ulang setelah direduksi menjadi NADH oleh GAPDH. Dalam keadaan cukup oksigen, NADH masuk ke dalam mitokondria untuk dioksidasi lebih lanjut. Sebaliknya, jika tidak cukup oksigen NAD^+ akan banyak digunakan untuk mereduksi piruvat. Kondisi ini disebut kondisi anaerob dimana asam piruvat dapat difermentasi menjadi asam laktat atau etanol dan CO_2 tergantung dari organisme tempat berlangsungnya fermentasi tersebut.

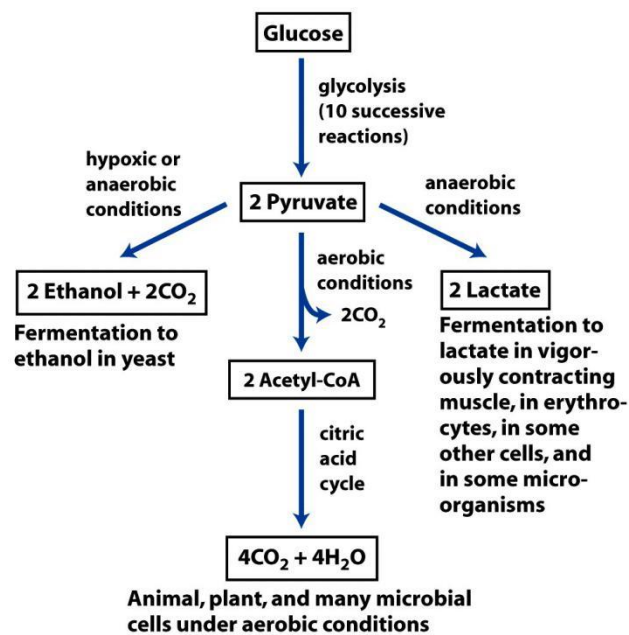


Figure 14-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

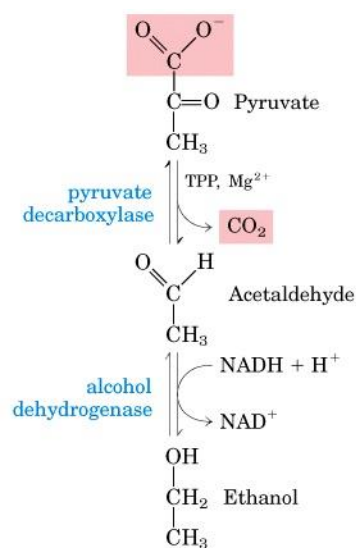
Gambar 5. Glikolisis dan oksidasi asam piruvat pada kondisi aerob dan anaerob.

Pada yeast, dalam keadaan anaerob, NAD^+ didaur ulang melalui cara yang telah dimanfaatkan oleh manusia selama ribuan tahun yaitu konversi piruvat

menjadi ethanol dan CO₂. Ethanol merupakan bahan aktif dalam anggur dan CO₂ membuat roti menjadi lembut. Yeast menghasilkan alcohol dalam 2 tahapan reaksi:

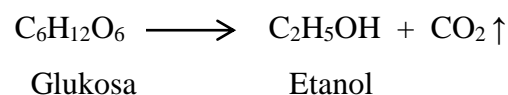
1. Karboksilasi piruvat membentuk asetaldehid dan CO₂, dikatalisis oleh piruvat dekarboksilase, suatu enzim yang tidak ditemukan pada hewan. Enzim ini mengandung koenzim thiamin pirofosfat (TPP).

2. Asetaldehide selanjutnya direduksi menjadi ethanol oleh NADH yang dikatalisis oleh alcohol dehidrogenase.



Gambar 6. Fermentasi anaerob pada sel ragi.

Sehingga berdasarkan uraian di atas proses glikolisis di dalam sel ragi akan mengubah glukosa menjadi etanol dan CO₂ secara enzimatik dapat diringkas sebagai berikut :



Proses glikolisis dalam sel ragi dikatalisis oleh sejumlah enzim multireaksi. Kerja enzim-enzim ini sangat dipengaruhi oleh inhibitor. Keberadaan inhibitor dapat menghambat kerja enzim sehingga sangat mempengaruhi hasil dari fermentasi atau glikolisis. Pengaruh tersebut bisa saja proses berjalan lambat dengan produk yang terbentuk sedikit atau tidak terbentuk produk sama sekali.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Bahan : Tabung peragian, Suspensi ragi, Larutan glukosa 2%, Larutan fluorida Pereaksi Benedict, Larutan kalium dikromat, H₂SO₄.

Alat : Tabung peragian, pipet tetes, tabung reaksi, penangas air.

b. Prosedur Kerja

1. Sediakan 3 tabung peragian yang bersih dan kering

- a) Tabung 1 sebagai kontrol positif
- b) Tabung 2 sebagai kontrol negatif
- c) Tabung 3 untuk melihat pengaruh inhibitor

2. Pipet ke dalam setiap tabung :

Tabung	1	2	3
Suspensi Ragi	14 mL	-	13,5 mL
Suspensi Ragi yang telah dipanaskan	-	14 mL	-
Larutan fluorida	-	-	0,5 mL
Larutan glukosa 2%	2 mL	2 mL	-

3. Campurkan isi tabung dengan membalik-balikkan 3 sampai 4 kali, sehingga lengan tertutupnya terisi dengan suspensi ragi. Biarkan 15 menit dalam suhu ruang.

4. Setelah 15 menit lakukan pengukuran pada setiap tabung tersebut :

- a) Tinggi kolom gas CO₂ yang terbentuk pada lengan tertutup.
- b) Kadar glukosa secara semikuantitatif (Uji Benedict).

- c) Uji etanol secara kualitatif

Uji Benedict

1. Pipetkan ke dalam tabung reaksi baru :
 - a) Pereaksi Benedict 2,5 mL
 - b) Tambahkan 4 tetes suspensi ragi hasil glikolisis.
2. Panaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit.
3. Dinginkan perlahan-lahan pada suhu ruang
4. Amati endapan yang diperoleh.

Uji Etanol atau Uji Esterifikasi

1. Pipetkan ke dalam tabung reaksi :
 - a) 1 mL suspensi ragi hasil glikolisis
 - b) Kemudian, 1 mL larutan kalium dikromat dalam suasana asam atau dengan penambahan asam karboksilat dan kalis asam kuat jika menggunakan esterifikasi.
 - c) Amati perubahan warna yang terjadi atau bau yang terbentuk.

6. Evaluasi

- a. Hasil Percobaan

Tabung	1	2	3
Tinggi kolom CO ₂ yang terbentuk (cm)			
Kadar Glukosa			
Uji Etanol /Esterifikasi			

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

1. Senyawa yang akan diubah dalam fermentasi anaerob sel ragi dari hasil glikolisis adalah....
 - a. asam piruvat
 - b. glukosa-6-fosfat
 - c. fruktosa 6-fosfat
 - d. glukosa
 - e. dihidroksi aseton fosfat
2. Produk dalam fermentasi anaerob sel ragi adalah....
 - a. asam laktat
 - b. asam piruvat
 - c. glukosa-6-fosfat
 - d. alcohol dan CO₂
 - e. fruktosa
3. Senyawa yang berperan sebagai inhibitor dari percobaan di atas adalah.....
4. Jelaskan peranan tabung 1, 2 dan 3 pada percobaan di atas!
5. Jelaskan analisis Anda bila uji dengan Benedict menghasilkan reaksi yang positif terhadap fermentasi anaerob!

8. Daftar Pustaka

- Lehninger, Nelson, & Cox. (1997). Principles of Biochemistry. 2nd edition. Worth Publishers. Albert L.
- Lehninger. (1995). Dasar-dasar Biokimia. (Alih bahasa: Maggy Thenawidjaja). Penerbit Erlangga, Jakarta.

PRAKTIKUM 6: ISOLASI AMILASE DARI CAIRAN PANKREAS DENGAN TEKNIK *SALTING OUT*

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu menjelaskan teknik pemisahan protein dengan *salting out*.
- b. Mahasiswa mampu melakukan pemisahan protein dari cairan pankreas dengan menggunakan larutan garam divalen konsentrasi tinggi (*salting out*).
- c. Mahasiswa mampu menjelaskan pemisahan protein dari campuran protein dengan teknik sentrifugasi.

2. Indikator Capaian

- a. Ketepatan dalam menjelaskan teknik pemisahan protein dengan *salting out*.
- b. Kemampuan dalam melakukan pemisahan protein dari cairan pankreas dengan menggunakan larutan garam divalen konsentrasi tinggi (*salting out*).
- c. Ketepatan dalam menjelaskan pemisahan protein dari campuran protein dengan teknik sentrifugasi.

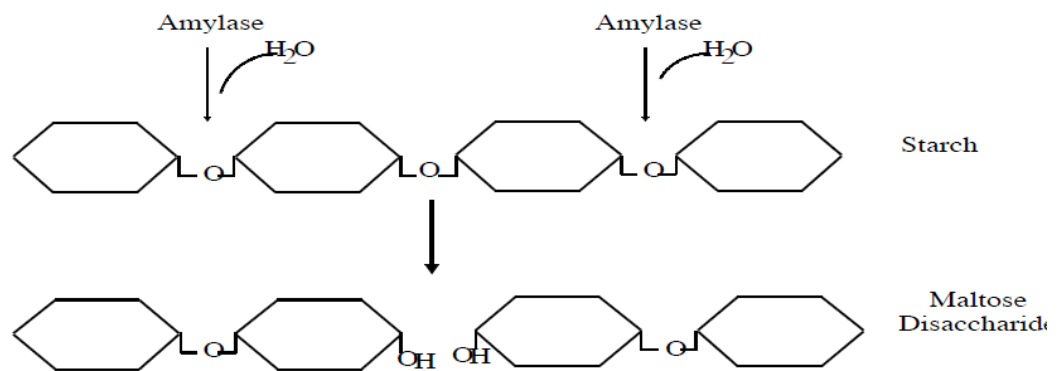
3. Tujuan Praktikum

- a. Melakukan pemisahan protein dari cairan pankreas dengan menggunakan larutan garam divalen konsentrasi tinggi (*salting out*).
- b. Memisahkan protein yang mengendap akibat *salting out* dengan sentrifugasi.

4. Uraian Teori

α -Amylase (1,4- α -D-glucan-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) adalah enzim pencernaan utama yang bekerja pada pati atau glikogen dan terdapat pada tanaman, hewan, bakteri dan jamur. Pada hewan, α -amilase terdapat pada pankreas, parotid, serum, urin, dan kadang-kadang dalam jumlah yang lebih kecil di jaringan atau tumor lain; protein amilase saliva dan pankreas sangat mirip. Amylase saliva mengawali

pencernaan karbohidrat di mulut dan amilase pankreas adalah enzim utama untuk pencernaan luminal karbohidrat ke usus kecil. A-amilase pankreas manusia memiliki bobot protein 57 Kda, yang tersusun atas 512 asam amino. Amilase pankreas mirip dengan protein sekretori lainnya dan disintesis dalam retikulum endoplasma kasar (Williams J., 2017).



Gambar 7. Hidrolisis pati secara enzimatik menggunakan amilase.

Umumnya protein seperti amilase memiliki kelarutan yang baik terhadap air karena gugus amina dan karboksilnya dapat berinteraksi dengan air melalui ikatan hidrogen, sedangkan rantai sampingnya ada yang bersifat hidrofilik dan bermuatan, sehingga sangat mudah berinteraksi dengan molekul air (Soewoto H, 2001). Larutan garam menyebabkan kelarutan protein terhadap air berkurang. Hal ini dikarenakan larutan garam menetralkan muatan yang ada pada protein sehingga terbentuknya endapan protein (Betelheim FA, 2010).

Amonium sulfat umumnya sering digunakan untuk salting out karena kelarutannya yang tinggi, selain itu senyawa ini juga memiliki kekuatan ionik yang tinggi, harganya yang murah, serta ketersediaannya dalam bentuk murni (Duong-Ly, KC. & Gabelli, SB., 2014). Pengendapan protein dengan cara ini tidak mengubah struktur kimianya, sehingga perubahan tersebut dikatakan *reversible*. Kelarutan dan fungsi protein akan pulih kembali seperti semula (Soewoto H, 2001).

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

- Cairan Pankreas
- Garam Ammonium Sulfat
- Dapar Fosfat pH 7,4
- Beaker Glass
- Tabung mikrosentrifuse
- Mikropipet 1000 uL
- Batang gelas pengaduk
- Spatel/sudip stainless steel
- Mortar/Blender
- Gelas ukur

b. Prosedur Kerja

- Pankreas dihaluskan dengan digerus atau diblender dengan menambahkan buffer fosfat 1:1.
- Sebanyak 10 mL cairan pankreas disentrifuse pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, supernatan diambil dan ditambahkan dengan 70% garam ammonium sulfat tetes demi tetes (Tabel 1).
- Presipitasi protein dilakukan selama 1 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya endapan hasil sentrifugasi didialisis melalui membran semipermeable untuk praktikum selanjutnya.

Tabel 1. Presipitasi ammonium sulfat (www.sigmaaldrich.com).

Starting percent saturation	Final percent saturation to be obtained																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533	
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

- a. Mahasiswa ingin memisahkan protein yang terdapat di dalam darah dengan penjuhan garam $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ sebesar 90%. Apabila darah yang digunakan telah mengalami penjuhan 50%, maka berapa gram $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ yang perlu ditambahkan ?

b. Jelaskan prinsip pengendapan dengan garam berlebih seperti $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$?

c. Selain ammonium sulfat, garam apa saja yang dapat digunakan untuk *salting out* protein ?

d. Berdasarkan bobot molekulnya, berada pada bagian apa protein dengan bobot besar setelah melalui sentrifugasi ? Jelaskan ?

8. Daftar Pustaka

Bettelheim FA, Brown WH, Campbell MK, Farrel SO. 2010. Introduction to General, Organic, and Biochemistry. 9th Edition. Brooks/Cole, Cengage Learning. Belmont.

Duong-Ly, KC. & Gabelli, SB., (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in enzymology*. 541: 85- 94.

Soewoto H, Sadikin M, Kurniati V, Wanandi SI, Retno D, Abadi P, Prijanti AR, Harahap IP, Jusman SW. 2001. Biokimia, Eksperimen Laboratorium, Widya Medika, Bagian Biokimia FKUI. Jakarta

Williams, JA. 2017. Amylase. *Pancreapedia*. DOI: 10.3998/panc.2017.04

PRAKTIKUM 7: ISOLASI AMILASE DARI CAIRAN PANKREAS DENGAN TEKNIK DIALISIS (LANJUTAN)

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu melakukan pemisahan protein dari larutan garam dengan menggunakan teknik dialisis
- b. Mahasiswa mampu melakukan uji kandungan garam dengan larutan barium klorida

2. Indikator Capaian

- a. Kemampuan dalam melakukan pemisahan protein dari larutan garam dengan menggunakan teknik dialisis.
- b. Kemampuan dalam melakukan uji kandungan garam dengan larutan barium klorida.

3. Tujuan Praktikum

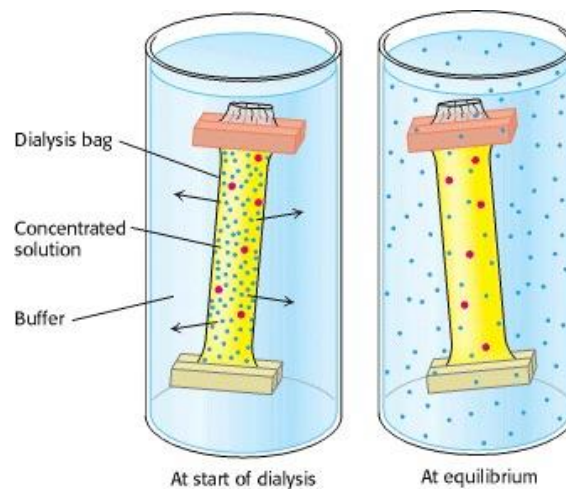
- a. Melakukan pemisahan protein dari larutan garam dengan menggunakan teknik dialisis.
- b. Menguji kandungan garam dengan larutan barium klorida.

4. Uraian Teori

Dialisis merupakan pergerakan molekul dengan cara berdifusi melewati membran semi-permiabel, pergerakan molekul terjadi dari konsentrasi tinggi menuju konsentrasi rendah. Hanya molekul berukuran kecil yang dapat melewati pori membran dengan ukuran tertentu, pergerakan molekul berlangsung hingga tercapainya keseimbangan antara kedua sistem larutan (Evan DR, Romero JK, Westoby M, 2009).

Dialisis merupakan teknik yang sering dilakukan untuk menghilangkan garam atau protein yang tidak diinginkan dari suatu proses pemurnian protein (Duong-Ly, KC. & Gabelli, SB., 2014). Protein hasil pengendapan memiliki berat

molekul lebih besar daripada ukuran pori membran, sehingga protein akan tertahan sedangkan garam akan keluar membran. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses dialisis, antara lain : volume dapar, komposisi dapar, waktu, suhu, dan ukuran pori membran (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2002).



Gambar 8. Dialisis terjadi hingga tercapai keseimbangan.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan antara lain, hasil pengendapan protein (*salting out*), membran selofan (Dialisis), larutan buffer 0,2 M pH 7.4, BaCl_2 , HCl 1N, NaOH 1N, EDTA, Beaker glass, mikropipet 1000 uL, *magnetik stirer*, batang magnet, dan tali remi/tali kasur steril.

b. Prosedur Kerja

- Membran selofan dididihkan selama 5 menit dalam alkali EDTA. Setelah didinginkan, membran selofan dicuci dengan dapar, kemudian salah satu ujungnya diikat dengan benang rami.
- Membran yang terbuka diisi dengan endapan hasil dari presipitasi dan ujung yang satunya diikat kembali.

- Endapan hasil presipitasi dimasukkan ke dalam tabung selofan dengan ukuran 14.000 Dalton dan selanjutnya didialisis dengan merendam selofan dengan larutan dapar fosfat 0,2 M pH 7,4.
- Dialisis dilakukan dengan menggunakan magnetik *stirrer* dengan kecepatan 125 rpm, pada suhu 4°C selama 24 jam dengan penggantian pelarut dapar beberapa kali.
- Untuk mengetahui dialisis sudah selesai, lakukan pengamatan dengan uji sulfat pada larutan dapar dengan ditambahkan BaCl₂ dan HCl (1:1), apabila sudah tidak terbentuk endapan putih maka dialisis dihentikan.
- Label dan simpan hasil dialisis pada suhu 4°C untuk digunakan pada praktikum selanjutnya.

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

a. Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, apakah yang dimaksud dialisis ? Berada pada bagian apa, protein yang memiliki bobot 66,000 Dalton ?

b. Indikator apakah yang digunakan untuk menentukan dialisis telah selesai ? Jelaskan ?

8. Daftar Pustaka

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002). Biochemistry 5th Ed. New York: W H Freeman.

Duong-Ly, KC. & Gabelli, SB. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in enzymology*. 541: 85- 94.

Evan DR, Romero JK, Westoby M. (2009). Concentration of protein and removal of solutes. In Richard BR & Deutscher MP, Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology Volume 463 (2nd ed., pp 97-118). London. UK: Elsevier.

PRAKTIKUM 8: PENGUKURAN KADAR PROTEIN

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu melakukan identifikasi protein dengan cara kuantitatif
- b. Mahasiswa mampu menentukan kadar protein dengan spektrofotometer.

2. Indikator Capaian

- a. Kemampuan dalam mengidentifikasi kadar protein secara kuantitatif.
- b. Kemampuan membuat kurva standar protein dan menentukan kadar protein secara kuantitatif.

3. Tujuan Praktikum

- a. Membuat kurva standar protein menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA).
- b. Mengukur kadar protein secara kualitatif menggunakan spektrofotometer.

4. Uraian Teori

Saat melakukan pemisahan dan pemurnian protein, kita perlu tahu berapa kadar protein yang ada di dalam sampel. Pengujian konsentrasi protein telah dikembangkan, dan beberapa sering digunakan di laboratorium penelitian, termasuk Biuret, Lowry, Bradford, absorban UV (Warburg-Christian), dan uji BCA. Masing-masing metode ini memiliki kekuatan dan kelemahan (Evan DR, Romero JK, Westoby M. 2009).

Kelebihan metoda A_{280} yaitu, cahaya pada 280 nm diserap oleh asam amino tirosin dan triptofan. Metode umum ini hanya untuk mengetahui kadar protein dalam larutan dengan spektrofotometer. Namun pada panjang gelombang ini, tidak hanya protein menyerap cahaya pada 280 nm, tetapi banyak senyawa lain yang juga menyerap cahaya pada panjang gelombang tersebut. Kontaminan paling umum yang harus kita perbaiki adalah asam nukleat (Hofmann A. 2010).

Metode Warburg-Christian dikembangkan untuk memperbaiki kontaminasi asam nukleat, sehingga hanya absorbansi protein yang diperoleh. Oleh karena asam nukleat menyerap kuat cahaya pada 260 nm sedangkan protein tidak, metode ini menggunakan faktor koreksi yang dihitung dari rasio absorbansi pada A_{280} nm dan A_{260} nm. Warburg-Christian menggunakan nilai A_{280} dan A_{260} untuk menghitung konsentrasi protein. Tujuan menggunakan kedua nilai ini adalah untuk mengoreksi kontaminasi asam nukleat dalam sampel protein (Scopes RK. 1994).

5. Pelaksanaan Praktikum

c. Alat dan Bahan

- Dialisat Protein
- Akuades
- Bovine Serum Albumin (BSA)
- Kuvet
- Spektrofotometer UV/VIS

d. Prosedur Kerja

- Buat kurva standar BSA dengan menyiapkan larutan BSA konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 ug/mL.
- Encerkan dialisat protein sebanyak 200 kali.
- Ukur serapan protein pada A_{280} dan A_{260} nm.
- Hitung kadar protein
- Perhitungan:

$$y = \frac{A_{280}}{A_{260}}$$

$y = bx \pm a$

$$x = \text{Konsentrasi protein (ug/mL)} \times \text{Faktor Pengenceran} \dots\dots\dots(1)$$

6. Evaluasi

d. Hasil Percobaan

e. Pembahasan

f. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

a. Apa prinsip penentuan kadar protein dengan metode yang telah dilakukan ?

b. Tuliskan kelebihan dan kekurangan metode pengukuran kadar enzim Biuret, Lowry, Bradford, absorban UV (Warburg-Christian), dan uji BCA ?

- c. Selain BSA, apakah ada senyawa lain yang dapat digunakan sebagai kurva standar protein ? Tuliskan dan jelaskan ?

8. Daftar Pustaka

- Evan DR, Romero JK, Westoby M. (2009). Concentration of protein and removal of solutes. In Richard BR & Deutscher MP, Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology Volume 463 (2nd ed., pp 97-118). London. UK: Elsevier.
- Hofmann A. (2010). Spectroscopic techniques I : Spectrofotometric techniques. In Wilson K & Walker J, Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology (7th ed, pp 482-485). UK: Cambridge University Press.
- Scopes RK. (1994). Protein Purification : Principles and Practice, 3rd Edition. New York: Springer.

PRAKTIKUM 9: PENENTUAN AKTIVITAS AMILASE SECARA KUANTITATIF

1. Kompetensi Dasar

- a. Kemampuan dalam menentukan kecepatan reaksi enzim amilase secara kuantitatif.
- b. Kemampuan membuat kurva standar glukosa dan menghitung aktivitas amilase.

2. Indikator Capaian

- a. Mahasiswa mampu memahami dan menentukan aktivitas enzim amilase.
- b. Mahasiswa mampu menetapkan nilai aktivitas spesifik enzim.

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat :

- a. Membuat kurva standar glukosa menggunakan spektrofotometer vis.
- b. Mengukur aktivitas amilase secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer vis.

4. Uraian Teori

Aktivitas enzim dihitung dalam satuan U (unit) per ml ekstrak enzim. Satu unit enzim (U) didefinisikan sebagai banyaknya ml enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μ mol standar tiap menit dengan substrat (Yusriah dan Nengah 2013).

Aktivitas enzim amilase dilakukan dengan metode dinitrosalisilat. Metode dinitrosalisilat (DNS) terdapat prinsip untuk mengukur gula pereduksi dengan teknik spektrofotometri, seperti glukosa. Gugus aldehida yang dimiliki oleh glukosa akan dioksidasi oleh asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi gugus karboksil dan menghasilkan asam 3-amino-5-salisilat pada kondisi basa dengan suhu 90-100°C.

Senyawa ini dapat dideteksi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Reaksi DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehida gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Bila terjadi gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi, sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Miller 1959).

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan adalah dialisat protein, glukosa, pereaksi Dinitrosalisilat (DNS), amilum 1%, *hot plate*, mikropipet, *waterbath*, dan spektrofotometer vis.

b. Prosedur Kerja

i. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum Glukosa

Pembuatan larutan stok glukosa 1000 $\mu\text{g/ml}$ dari 100 mg glukosa dalam 100 ml akuades, diencerkan menjadi 20 $\mu\text{g/ml}$. Larutan glukosa 20 $\mu\text{g/ml}$ dipipet 1 ml ke dalam tabung kemudian ditambahkan pereaksi Dinitrosalisilat (DNS) 1,5 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, lalu didinginkan dengan air mengalir, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-600 nm (Supriyatna 2015).

ii. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosa

Larutan stok glukosa 1000 $\mu\text{g/ml}$ dibuat konsentrasi 6, 12, 18, 24,30 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian ke dalam tabung dipipet 1 ml kemudian ditambahkan pereaksi Dinitrosalisilat (DNS) 1,5 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, lalu didinginkan dengan air mengalir, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang pada tahap sebelumnya (Supriyatna 2015).

iii. Penentuan Aktivitas Enzim Amilase

Penentuan aktivitas enzim amilase dilakukan dengan menambahkan amilum 1% sebanyak 1 ml pada ekstrak enzim sebanyak 1 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan 3 ml DNS, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya larutan dinginkan pada suhu 37°C. Aktivitas amilase ditentukan dengan mengukur absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang pada tahap sebelumnya. Blanko yang digunakan campuran akuades dan pereaksi DNS (Supriyatna 2015). Aktivitas enzim amilase dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas amilase} = \frac{\text{glukosa } (\mu\text{g/ml}) \times 1000 \times \text{fp}}{\text{BM glukosa} \times \text{waktu inkubasi (menit)}} \dots\dots\dots(2)$$

6. Evaluasi

a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

8. Daftar Pustaka

- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31: 426–428
- Soewoto H, Sadikin M, Kurniati V, Wanandi SI, Retno D, Abadi P, Prijanti AR, Harahap IP, Jusman SW. 2001. *Biokimia, Eksperimen Laboratorium, Widya Medika, Bagian Biokimia FKUI*. Jakarta
- Supriyatna A, Amalia D, Jauhari AA, Holydaziah D. 2015. *Aktivitas Enzim Amilase, Lipase, Dan Protease Dari Larva*. ISSN. 9(2): 19-20.
- Yusriah dan Nengah DK. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*. 2(1): 2337-3520.

PRAKTIKUM 10: ISOLASI KASEIN DARI SUSU SECARA KIMIA

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip isolasi kasein.
- b. Mahasiswa mampu mengendapkan kasein menggunakan asam asetat glacial (titik isoelektrik).
- c. Mahasiswa mampu menunjukkan cara isolasi kasein dengan pelarut yang berbeda kepolaran yaitu alkohol dan eter.

2. Indikator Capaian

- a. Ketepatan dalam menjelaskan prinsip isolasi kasein serta menunjukkan cara isolasi kasein dari pelarut yang berbeda kepolaran.
- b. Kemampuan dalam mengendapkan kasein menggunakan asam asetat glacial .

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat :

- a. Mengendapkan dan mengisolasi kasein dari air susu.
- b. Menjelaskan prinsip isolasi kasein yang dilakukan.

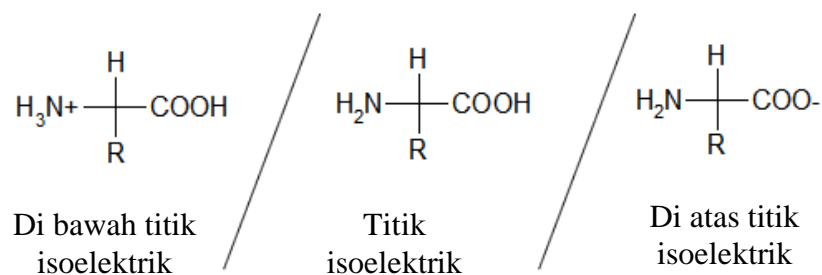
4. Uraian Teori

Sebagai makanan cadangan, susu merupakan sumber protein yang kaya. Ditinjau dari pandangan nutrisi susu merupakan sumber makanan alami yang hampir sempurna. Oleh karena itu disamping untuk makanan bayi susu juga dikonsumsi orang untuk semua umur dan digunakan untuk membuat keju dan mentega. Susu mengandung protein, lipida, karbohidrat, mineral dan vitamin. Sedangkan kandungan besi, tembaga dan vitamin C dan D-nya relatif sangat rendah. Nilai gizi susu ditinjau dari kandungan protein, laktosa, asilgliserol dan asam lemak rendah (oleat, palmitat, stearate dan laurat), kalsium dan fosfat.

Casein merupakan protein dasar yang meliputi 80% dari total protein air susu sapi. Sesudah diambil “cream” nya. Susu skim (skim milk) jika diasamkan sampai pH 4,7 kaseinnya akan mengendap supernatannya merupakan “whey” mengandung 20% protein dari total protein. Shah et al. (2010) menjelaskan bahwa kasein mudah sekali mengendap pada titik isoelektrik yaitu pada pH 4,6-5,0 dan memiliki kelarutan yang rendah pada kondisi asam. pH dapat mempengaruhi struktur kasein.

Titik Isoelektrik adalah suatu nilai pH dimana protein memiliki jumlah muatan negatif yang sama dengan jumlah muatan positifnya, atau dengan kata lain protein bermuatan netral atau tidak bermuatan. Pada nilai pH yang lebih rendah dari titik isoelektriknya, protein memiliki muatan positif, dan pada nilai pH yang lebih besar dari titik isoelektriknya, protein akan bermuatan negatif.

Nilai titik isoelektrik suatu protein memberikan pengaruh penting pada sifat biokimia protein tersebut yang dapat dimanfaatkan pada proses pemurnian dan elektroforesis. Pada elektroforesis, jika pH larutan penyangga (buffer) lebih besar daripada titik isoelektriknya, maka molekul protein akan bermigrasi menuju kutub positif. Sementara jika pH buffer lebih rendah daripada titik isoelektriknya, maka molekul protein akan bermigrasi menuju kutub negatif. Dan jika pH buffer sama dengan titik isoelektrik, maka protein akan diam di tempat atau tidak bermigrasi sama sekali.



5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Bahan: susu kambing atau sapi alami tanpa campuran apapun, asam asetat glacial, etanol 95%, campuran etanol : eter = 1:1 dan eter

Alat: Beaker glass 250 ml, penangas air, termometer, pipet tetes, kain muslin, batang pengaduk, corong kaca, corong buchmer, erlenmeyer dan gelas arloji.

b. Prosedur Kerja

- a. Masukkan 100 ml air susu ke dalam beaker glass 250 ml kemudian panaskan sampai 40°C pada penangas air.
- b. Tambahkan setetes demi setetes 1 ml asam asetat glacial sambil diaduk sehingga semua kasein dengan kain muslin dan kemudian airnya diperas.
- c. Suspensikan endapan kasein ke dalam 50 ml larutan 95%. Supernatannya di dekantasi. Ulangi lagi dengan menggunakan 50 ml larutan etanol:eter = 1:1.
- d. Pindahkan kasein dengan menggunakan 50 ml eter alkohol lainnya ke dalam corong Buchner. Kemudian cuci lagi dengan 50 ml eter.
- e. Isaplah corong Buchner dan endapannya di keringkan diatas gelas arloji sehingga diperoleh kasein untuk percobaan selanjutnya.

Awas: Bekerja dengan eter harus jauh dengan api untuk menghindari kebakaran.

6. Evaluasi

- a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

1. Suatu nilai pH dimana protein memiliki jumlah muatan negatif yang sama dengan jumlah muatan positifnya, atau dengan kata lain protein bermuatan netral atau tidak bermuatan disebut....
 - a. Titik isoelektrik
 - b. Titik akhir
 - c. Titik ekuivalen
 - d. Titik didih
 - e. Titik jenuh
2. Kasein mudah sekali mengendap pada titik isoelektrik yaitu pada pH 4,6-5,0 dan memiliki kelarutan yang rendah pada kondisi....
 - a. Basa
 - b. Asam
 - c. Netral
 - d. Dingin
 - e. Panas
3. Senyawa yang berperan untuk membuat kasein mengendap pada titik isoelektriknya adalah.....
 - a. Etanol
 - b. Eter
 - c. Asam asetat glasial
 - d. Campuran etanol eter
 - e. Akuades
4. Pelarut yang berperan untuk melarutkan pengotor nonpolar pada susu dalam isolasi kasein adalah....
 - a. Etanol
 - b. Eter
 - c. Asam asetat glasial
 - d. Campuran etanol eter
 - e. Akuades
5. Pelarut yang berperan untuk melarutkan pengotor nonpolar pada susu dalam isolasi kasein adalah....
 - a. Etanol
 - b. Eter
 - c. Asam asetat glasial
 - d. Campuran etanol eter
 - e. Akuades

8. Daftar Pustaka

- Shah, R., A. H. Jana, K. D. Aparnathi and P. S. Prajapati. (2010). Process standardization for rennet casein based Mozzarella cheese analogue. *J. Food Sci and Technol* 47: 574-578.
- Clark JM and RL Switzer. (1964). *Experimental Biochemistry*. WH Fremen & Co, San Fransisco.

PRAKTIKUM 11: HIDROLISIS PROTEIN DENGAN CARA KIMIA

1. Kompetensi Dasar

- a. Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip dari hidrolisis protein kasein secara kimia
- b. Mahasiswa mampu melakukan hidrolisis ikatan peptida dari protein secara kimia yang terurai menjadi asam amino dengan bantuan panas dan asam.
- c. Mahasiswa mampu menganalisis hasil uji kualitatif ikatan peptida menggunakan pereaksi biuret.

2. Indikator Capaian

- a. Kemampuan dalam melakukan hidrolisis ikatan peptida dari protein secara kimia.
- b. Kesesuaian hasil hidrolisis dengan uji kualitatif ikatan peptida menggunakan pereaksi biuret.

3. Tujuan Praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat :

- a. Melakukan hidrolisis ikatan peptida dalam protein sehingga terurai menjadi asam-asam amino dengan cara kimia.
- b. Mengidentifikasi kandungan protein berdasarkan adanya ikatan peptida.

4. Uraian Teori

Kasein kasar merupakan campuran dari beberapa protein yang berbeda komposisi asam aminonya dan dapat dipisahkan dengan cara elektroforesis. Hasil elektroforesis pada suasana alkalis menunjukkan kasein terdiri dari α -kasein, β -kasein, γ -kasein dan κ -kasein. α - dan β - kasein kaya akan fosfat terutama sebagai residu θ -fosfoserin. Satuan dasar struktur protein adalah asam amino yang disambung satu sama lain dengan ikatan peptide. Struktur protein yang tersusun

dari asam-asam amino ini dapat didemonstrasikan melalui hidrolisis protein dengan cara kimia atau enzimatik.

Proses hidrolisis adalah proses pemecahan suatu molekul menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan molekul air. Hidrolisis protein adalah proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein, yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- dan berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida, rusaknya struktur globular protein (Nielsen, 1997).

Menurut Sediaoetama (2000) ada tiga cara yang dapat ditempuh untuk menghidrolisis protein, yaitu hidrolisis menggunakan asam, basa dan enzim.

1. Hidrolisis Asam

Hidrolisis dengan mempergunakan asam kuat anorganik, seperti HCl atau H_2SO_4 pekat (4-8 normal) dan dipanaskan pada suhu mendidih, dapat dilakukan dengan tekanan di atas satu atmosfer, selama beberapa jam. Menurut Girindra (1993), akibat samping yang terjadi dengan hidrolisis asam ialah rusaknya beberapa asam amino (triptofan, sebagian serin dan threonin).

2. Hidrolisis Basa

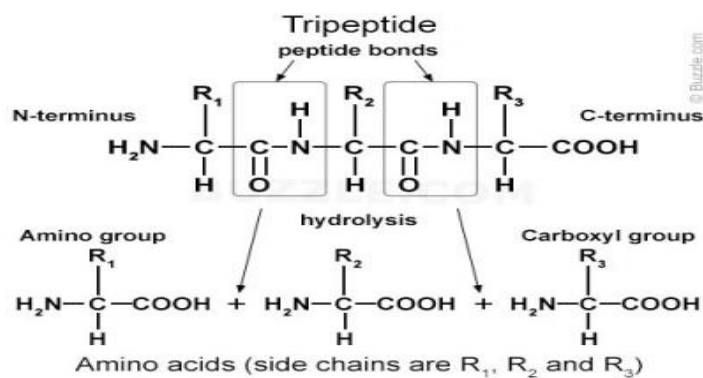
Hidrolisis protein menggunakan basa merupakan proses pemecahan polipeptida dengan menggunakan basa / alkali kuat, seperti NaOH dan KOH pada suhu tinggi, selama beberapa jam, dengan tekanan di atas satu atmosfer. Menurut Girindra (1993), serin dan threonin rusak dengan basa.

3. Hidrolisis Enzimatik

Hidrolisis enzimatik dilakukan dengan mempergunakan enzim. Dapat digunakan satu jenis enzim saja, atau beberapa jenis enzim yang berbeda. Penambahan enzim perlu dilakukan pengaturan pada kondisi pH dan suhu optimum (Anonymous, 2001).

Hidrolisis protein menjadi satuan-satuan dasar dapat dipercepat oleh 6 N HCl selama 18-24 jam pada suhu 110°C dalam tabung yang tertutup. Di bawah

kondisi ini unit-unit asam amino akan dilepaskan dari struktur protein yang dapat diisolasi sebagai garam-garam hidroklorida. Semua asam amino dalam keadaan stabil kecuali triptofan yang rusak dalam suasana asam kuat. Triptofan ini dapat ditemukan kembali jika selama hidrolisis dengan asam ditambahkan reduktor atau protein dihidrolisis dengan 2 N NaOH. Akan tetapi penggunaan NaOH ini dapat merusak sistein, serin, treonin dan arginine. Disamping itu penggunaan NaOH dapat menyebabkan rasemasi semua asam amino.



Gambar 9. Hidrolisis Tripeptida

Asam-asam amino dalam protein disambung satu dengan lain dengan ikatan peptide yang merupakan ikatan kovalen amida yang terbentuk oleh gugus α -karboksil dan α - amino. Sesuai dengan jumlah asam amino yang menyusun ikatan peptide maka kita kenal dipeptide, oligopeptida dan polipeptida.

Asam amino dalam rantai peptida memberikan reaksi biuret yang sangat berguna untuk penentuan protein baik kualitatif maupun kuantitatif. Dalam kondisi alkali kuat biuret dengan CuSO_4 memberikan warna violet. Reaksi biuret dapat diberikan oleh peptida-peptida yang mempunyai paling sedikit dua ikatan peptida. Dipeptida dan asam-asam amino (kecuali histidine, serin dan prolin) tidak memberikan hasil positif untuk reaksi biuret.

5. Pelaksanaan Praktikum

a. Alat dan Bahan

Bahan: Kasein hasil isolasi, larutan 6 N HCl, larutan 6 N NaOH, larutan 2,5 N NaOH larutan 0,01 M CuSO_4

Alat: Satu set alat refluks, plat tetes, pipet tetes

b. Prosedur Kerja

- 1) Masukkan 2,5 gram kasein dan 10 ml larutan 6 N HCl dalam Erlenmeyer 50 ml yang tertutup dan kocoklah perlahan lahan sampai kasein larut.
- 2) Refluk larutan tersebut dalam lemari asam pada suhu 100°C selama 18-24 jam, lalu dinginkan.
- 3) Ambillah satu tetes dan ujilah dengan pereaksi biuret. Bila masih positif hidrolisis diteruskan lagi sampai reaksi biuret negatif.
- 4) Hidrolisis ini kemudian dinetralkan dengan larutan 6 N NaOH yang di tambahkan sedikit demi sedikit sampai netral.

6. Evaluasi

- a. Hasil Percobaan

b. Pembahasan

c. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

7. Soal Latihan

1. Satuan dasar struktur protein adalah asam amino yang disambung satu sama lain dengan ikatan...
 - a. peptida
 - b. glikosida
 - c. fosfodiester
 - d. hydrogen
 - e. ion
2. Proses pemecahan suatu molekul menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan molekul air disebut....
 - a. polimerasi
 - b. hidrolisis
 - c. dekarboksilasi
 - d. hidrasi
 - e. glikolisis
3. Proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana disebut....
 - a. polimerasi protein
 - b. hidrolisis protein
 - c. dekarboksilasi protein
 - d. hidrasi protein
 - e. glikolisis protein
4. Hidrolisis dengan mempergunakan pelarut seperti HCl atau H₂SO₄ pekat (4-8 normal) dan dipanaskan pada suhu mendidih, dapat dilakukan dengan tekanan di atas satu atmosfer, selama beberapa jam. Sehingga reaksi samping yang terjadi dengan hidrolisis tersebut ialah rusaknya beberapa asam amino (triptofan, sebagian serin dan threonin) disebut hidrolisis secara....
 - a. hidrolisis asam
 - b. hidrolisis basa
 - c. hidrolisis enzimatik
 - d. hidrasi asam

- e. hidrasi basa
5. Dalam kondisi alkali kuat biuret dengan CuSO_4 memberikan warna
- a. kuning
 - b. biru
 - c. merah
 - d. coklat
 - e. violet

8. Daftar Pustaka

Clark JM and RL Switzer. (1964). Experimental Biochemistry. WH Fremen & Co, San Fransisco.