

litrus.



dr. Sri Wahyuni, M.Sc.
Editor: dr. Mulyati Sri Rahayu, M.Si.

Buku Ajar

PRAKTIKUM BIOKIMIA KEDOKTERAN

dr. Sri Wahyuni, M.Sc.

Editor: dr. Mulyati Sri Rahayu, M.Si.

Buku Ajar

PRAKTIKUM BIOKIMIA KEDOKTERAN

 litrus.
Penerbit

BUKU AJARP RAKTIKUM BIODIRI KEDOKTERAN

Ditulis oleh:

dr. Sri Wahyuni, M.Sc.

Editor:

dr. Mulyati Sri Rahayu, M.Si.

Diterbitkan, dicetak, dan didistribusikan oleh

PT. Literasi Nusantara Abadi Grup

Perumahan Puncak Juyo Agung Residence Kav. B11 Merjosari

Kecamatan Lowokwaru Kota Malang 65144

Telp : +6285887254603, +6285841411519

Email: literasinusantaraofficial@gmail.com

Web: www.penerbitlitnus.co.id

Anggota IKAPI No. 340/JTI/2022



Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang. Dilarang mengutip atau memperbanyak baik sebagian ataupun keseluruhan isi buku dengan cara apa pun tanpa izin tertulis dari penerbit.

Cetakan I, September 2024

Perancang sampul: An Nuha Zarkasy

Penata letak: Muhammad Ridho Naufal

ISBN : 978-623-519-230-7

xii + 78 hlm. ; 15,5x23 cm.

©September 2024



Prakata

Segala Puji dan Syukur kami panjatkan selalu kepada Tuhan Yang Maha Esa atas Rahmat, Taufiq, dan Hidayah yang sudah diberikan sehingga kami bisa menyelesaikan buku ajar yang berjudul “Buku Ajar Praktikum Biokimia Kedokteran”.

Tujuan dari penulisan buku ajar ini adalah untuk membantu para mahasiswa di dalam memahami prinsip dasar dalam melakukan praktikum biokimia. Buku ajar praktikum terutama biokimia masih sedikit sehingga mahasiswa banyak mengambil rujukan dari artikel online atau blog sejenis menyusun laporan praktikum atau untuk belajar untuk menghadapi ujian praktikum.

Buku ajar ini diperuntukkan bagi mahasiswa kedokteran Prodi Kedokteran Fakultas Kedokteran UNIMAL untuk menunjang pembelajaran dalam mata kuliah Blok terkait. Namun, penulis juga menargetkan mahasiswa kesehatan dan analis kesehatan yang membutuhkan referensi tentang praktikum biokimia. Buku ajar ini berisikan pengantar tentang praktikum biokimia kedokteran. Dimulai prinsip dasar laboratorium, pemeriksaan karbohidrat, protein dan urin dijelaskan dengan komprehensif dalam buku ajar ini.

Untuk memudahkan pemahaman mengenai isi buku ajar yang ditulis, bahasa yang digunakan lebih mudah dimengerti dan diperjelas dengan prinsip, prosedur kerja dan gambar dari literatur yang sudah tersedia.

Uraian tentang substansi buku ajar ini diperoleh dari berbagai literatur dan textbook praktikum biokimia.

Walaupun demikian, penulis menyadari mungkin masih banyak terdapat kekurangan sehingga saran dan koreksi masih sangat dibutuhkan untuk meningkatkan kualitas buku ajar ini dalam mentransfer pengetahuan praktikal kepada mahasiswa. Semoga buku ajar ini bermanfaat bagi para mahasiswa yang kuliah di Fakultas Kedokteran UNIMAL ataupun bidang kesehatan lainnya.

Akhir kata, penulis tidak lupa memberikan apresiasi kepada Penerbit Literasi Nusantara yang membuka kesempatan mengikuti hibah Buku Ajar sehingga dapat diterbitkan dengan kualitas yang sangat baik.

Penulis,

dr. Sri Wahyuni, M.Sc.



Kata Pengantar

**DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MALIKUSSALEH**

Alhamdulillah, puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala anugerah-Nya sehingga Buku Ajar Praktikum Biokimia Kedokteran ini dapat diselesaikan dan diterbitkan. Atas nama institusi Fakultas Kedokteran Universitas Malikussaleh (UNIMAL), kami selaku Dekan memberikan apresiasi dan menyambut baik atas terbitnya Buku Ajar ini.

Dalam proses perkuliahan dan praktikum, Buku Ajar ini tentu akan berperan penting untuk menunjang proses belajar mengajar. Buku Ajar ini akan memberi panduan untuk menciptakan proses praktikum Biokimia yang lebih baik dan sebagai pedoman belajar mahasiswa. Hal ini karena Buku Ajar ini disusun secara sistematis dan memuat teori yang membantu mahasiswa memahami proses kerja di laboratorium. Dalam hal penguatan kurikulum, Buku Ajar ini juga penting agar tujuan pembelajaran tiap mata kuliah Blok terkait Biokimia dapat dicapai dengan baik dan dapat menjadi pedoman belajar bagi mahasiswa Fakultas Kedokteran/Kesehatan lainnya.

Akhir kata, selaku pimpinan kami mengucapkan selamat dan terima kasih kepada dosen penyusun serta pihak yang berkontribusi dalam penyusunan Buku Ajar Praktikum

Biokimia Kedokteran ini. Harapan kami, Buku Ajar ini dapat dipergunakan secara maksimal sehingga tujuan perkuliahan praktikum dapat tercapai dengan lebih baik. Semoga Buku Ajar ini bermanfaat secara luas bagi akademisi, dosen, mahasiswa, dan bagi pengembangan dosen dan institusi Fakultas Kedokteran UNIMAL.

Lhokseumawe, September 2024
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas
Malikussaleh

dr. Muhammad Sayuti, Sp.B., Subsp, BD (K)

Daftar Isi

Prakata	iii
Kata Pengantar Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Malikussaleh.....	v
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	xi
I. Instrument Laboratorium Dasar—1	
Kompetensi:.....	1
Alat ukur volume.....	1
Pipet.....	2
Labu.....	4
Timbangan/Neraca.....	6
Pengaduk Magnetik/Magnetic stirrer.....	7
Sentrifus.....	8
Inkubator	9
Water Bath.....	9
pH meter.....	10
Termometer.....	11
Gelas Laboratorium.....	11

II. Peraturan dan Tindakan Pencegahan Keselamatan Di Laboratorium—15

Kompetensi.....	15
Peraturan Umum Bekerja di laboratorium.....	15
Praktik & Prosedur Laboratorium yang Aman.....	16

III. PEMERIKSAAN KARBOHIDRAT—19

TUJUAN UMUM.....	19
DASAR TEORI.....	19
PERCOBAAN SIFAT FISIKA (RASA MANIS)	20
TES MOLISCH (REAKSI ALFA-NAFTOL).....	21
TEST BENEDICT.....	23
Reagen:	24
Prosedur Kerja:	25
Observasi:	25
Catatan penting:.....	26
Kesimpulan:.....	26
Aplikasi:	26
TES FEHLING	27
TES BARFOED	28
RAPID FURFURAL TEST.....	30
TES SELIWANOFF	32
UJI IODIUM	34
LATIHAN SOAL	36

IV. PEMERIKSAAN PROTEIN—37

TUJUAN PRAKTIKUM	37
PENDAHULUAN	37
REAKSI PRESIPITASI PROTEIN.....	38
PENGENDAPAN OLEH REAGEN ANIONIK (ALKALOID)	40
PENGENDAPAN OLEH PELARUT ORGANIK.....	40
PENGENDAPAN OLEH PANAS	41
REAKSI WARNA DARI PROTEIN DAN ASAM AMINO	41

V. BLOKIMIA URIN—45

TUJUAN PRAKTIKUM	45
PENDAHULUAN	45
SIFAT URIN NORMAL	46
ZAT NORMAL DALAM URIN	47
ZAT ABNORMAL DALAM URIN	49
PENGUMPULAN SAMPEL URIN	51
Jenis sampel urin	51
Teknik pengumpulan urin.....	51
Pengawet urin.....	52
PEMERIKSAAN FISIK URIN.....	53
Volume urin	53
Warna urin.....	53
Bau urin	53
Kejernihan urin.....	53
Derajat keasaman (pH) Urin.....	54
PRAKTIKUM BLOKIMIA URIN NORMAL.....	55
PEMERIKSAAN SIFAT URIN	55
Pemeriksaan Berat Jenis Urin (BJ Urin).....	57

VI. PEMERIKSAAN BLOKIMIA URIN—63

Uji Reduksi Benedict (Semi kuantitatif)	63
Presipitasi Protein Urin Dengan Pemanasan.....	64
Pemeriksaan badan keton.....	66
Pemeriksaan darah dalam urin (Uji benzidine)	67
Pemeriksaan Garam Empedu (<i>Hay's test</i>)	67
Pemeriksaan Pigmen empedu (<i>Modified Fouchet's Test</i>)	68
Pemeriksaan Urobilinogen (<i>Ehrlich's Test</i>)	69

VII. PEMERIKSAAN KOLESTEROL SERUM—71

PENDAHULUAN	71
PEMERIKSAAN KADAR KOLESTEROL.....	73

VIII. PENENTUAN KADAR GLUKOSA DARAH
DENGAN METODE GOD-PAP—75

Daftar Pustaka.....77



Daftar Gambar

Gambar I.2 Labu Ukur.....	5
Gambar I.3 Labu Erlenmeyer	5
Gambar I.4 Neraca Mekanis.....	6
Gambar I.5 Timbangan Analitik	7
Gambar I.6 Magnetic stirrer	8
Gambar I.7 Mesin Sentrifus	8
Gambar I.8 Inkubator.....	9
Gambar I.10 pH meter	10
Gambar I.11 Termometer.....	11
Gambar I.12 Gelas Kimia Griffin	12
Gambar I.13 Silinder Bertingkat.....	12
Gambar I.14 Buret.....	13
Gambar III.1 Reaksi kimia uji Molisch	21
Gambar III.2 Reaksi kimia uji Benedict	24
Gambar III.3 Hasil uji Barfoed	29
Gambar III.4 Hasil Uji Rapid Furfural	31
Gambar III.5 Hasil Uji Seliwanoff.....	33

Gambar III.6 Hasil Uji Iodium	35
Gambar IV.1 Hasil reaksi Biuret	43
Gambar V.1 Indikator pH.....	57
Gambar V.2 Pemeriksaan BJ Urin Menggunakan Urinometer	60



INSTRUMENT LABORATORIUM DASAR

Kompetensi:

1. Mampu menjelaskan alat dan perlengkapan yang digunakan di lab biokimia
2. Mengetahui prinsip dasar dan aplikasi dari instrumen lab biokimia
3. Mengetahui instrumen yang sering dipakai di lab biokimia
4. Mengetahui Tindakan pencegahan dan keselamatan di laboratorium

Berbagai instrumen dan peralatan yang digunakan dalam praktikum biokimia kedokteran adalah sebagai berikut:

Alat ukur volume

Sebagian besar prosedur kimia klinis memerlukan pengukuran volume yang akurat. Peralatan volumetrik harus digunakan dengan larutan yang diseimbangkan pada suhu kamar. Untuk pekerjaan yang akurat dengan

pipet dan buret, pipet dan buret harus dibilas dan dikeringkan dengan baik dengan sebagian cairan yang akan diukur. Pengisian pipet dengan cairan beracun, korosif, atau mudah menguap harus dilakukan dengan menggunakan dot karet.

Pipet

Pada umumnya, ada dua jenis pipet utama yang digunakan. Pipet volumetrik atau pipet transfer didesain untuk mengalirkan cairan dalam volume yang tetap. Pipet ini dikalibrasi untuk menghasilkan volume yang ditentukan. Ukuran yang paling umum digunakan adalah 1, 2, 5, 10, 25 ml.

Semua pipet ini dikalibrasi untuk menghantarkan (TD: *to deliver*) volume tertentu. Pipet untuk menampung (TC: *to contained*) digunakan untuk volume yang lebih kecil dari 0,5 ml. Perbedaan antara pipet jenis TC dan TD adalah bahwa pipet jenis pertama harus dibilas setelah selesai digunakan untuk membersihkan semua cairan yang terkandung di dalam pipet ke dalam pengencer.

Jenis pipet kedua adalah pipet bertingkat atau pipet ukur. Pipet ini terdiri dari dua jenis-satu dikalibrasi di antara dua tanda pada batang (Mohr) dan yang lainnya memiliki tanda kelulusan hingga ke ujung (Serologis). Pipet ini tidak cocok untuk pengukuran volume yang akurat kurang dari 2 ml. Pada dasarnya digunakan untuk pengukuran reagen.

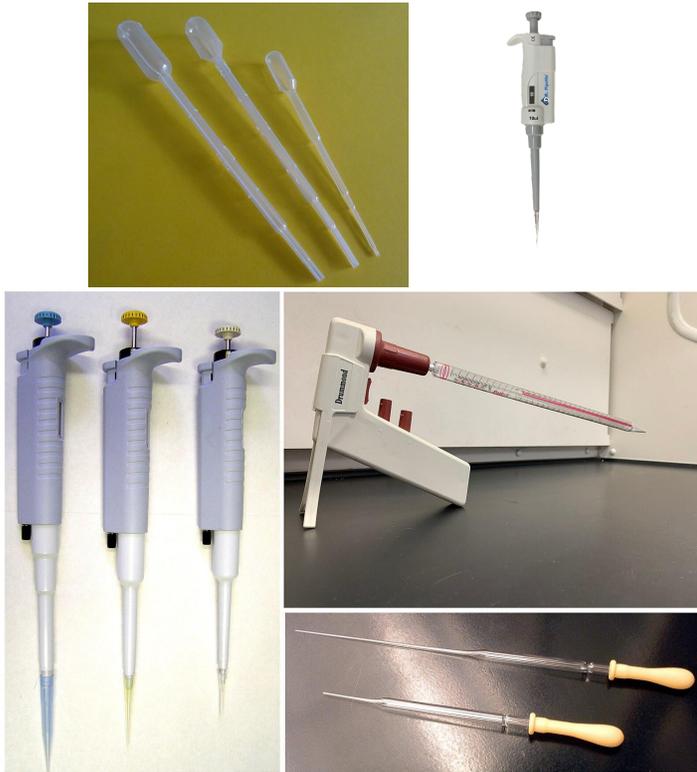
Ada beberapa kelas utama pipet: Pipet pengukur (bertingkat: *Measuring (graduated) and transfer types*.

- » Pipet pengukur (bertingkat): Pipet ini dapat digunakan untuk berbagai jenis cairan yang memiliki tanda di atasnya. Pipet ini terdiri dari dua jenis:
 - Jenis Mohr: Pipet Mohr tidak memiliki angka sampai ujung dan bersifat self-draining type;
 - Jenis serologis: Pipet serologis memiliki angka hingga ujung *blowout type*.
- » Pipet transfer: Pipet ini dirancang untuk mengalirkan volume tertentu saja. Jenis-jenisnya adalah sebagai berikut:
 - Volumetrik: Jenis pipet ini memiliki bulb ni ti dan ti adalah jenis yang dapat menguras sendiri.
 - Ostwald-Folin: Pipet jenis ini memiliki bohlam dan tipe tiup.

- Pasteur: Tidak ada tanda kalibrasi, tidak digunakan untuk uji kuantitatif.

Saat ini, autopipet umumnya digunakan untuk mentransfer volume kurang dari 1 mL. Alat ini mudah digunakan dan akurasinya tinggi. Pipet yang dirancang untuk memindahkan volume cairan kurang dari 1 mL adalah pipet mikro dan yang memindahkan volume cairan yang lebih besar disebut mikropipet otomatis (Gbr. I.1).





Gambar I.1. Berbagai jenis pipet

Labu

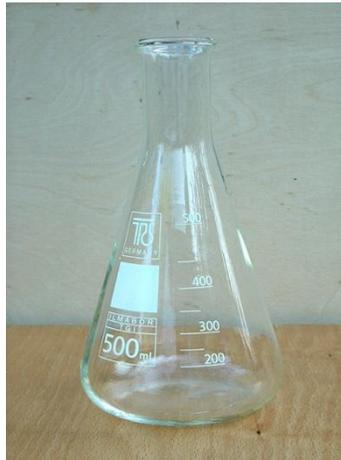
Labu ini terutama digunakan untuk menyiapkan larutan konsentrat. Labu ini biasanya ditemukan dalam ukuran berikut ini: 5, 25, 50, 100, 250 ml, dll. Peralatan volumetrik harus digunakan dengan larutan yang diseimbangkan pada suhu kamar.

- » Labu ukur (*Volumetric flask*): Labu ini memiliki bagian dasar yang rata, serta leher yang diberi tanda garis yang telah dikalibrasi. Labu ukur ini tidak digunakan untuk menyiapkan volume reagen tertentu (Gbr. I.2).



Gambar I.2 Labu Ukur

Labu Erlenmeyer (*Erlenmeyer flask*): Labu ini memiliki dasar yang lebar dengan leher yang sempit dan dirancang untuk menampung volume cairan yang berbeda. Untuk tujuan ini, terdapat tanda berbagai volume pada bagian bawahnya (Gbr. I.3).



Gambar I.3 Labu Erlenmeyer

Timbangan/Neraca

Sangat penting untuk menyiapkan reagen dan larutan standar dengan pengukuran yang akurat untuk berbagai bahan kimia. Berbagai jenis timbangan digunakan dalam laboratorium biokimia yaitu:

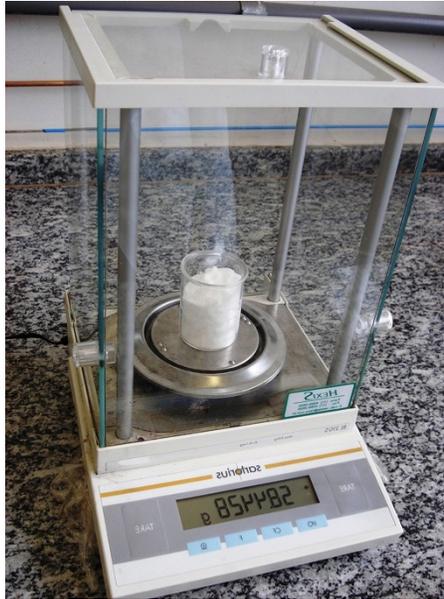
- » Neraca mekanik/fisik: peralatan yang digunakan untuk mengukur bahan kimia yang diperlukan untuk membuat reagen kualitatif dan bahan kimia yang lebih besar perlu diukur. Alat ini merupakan timbangan panci ganda di mana di satu sisi yang beratnya sudah diketahui dan di sisi lain bahan kimia yang akan diukur. Berat yang dapat diukur dalam instrumen ini bervariasi dari 1 mg hingga 1000 g. Neraca fisik dapat berupa neraca dua panci terbuka atau neraca dua panci tertutup (Gbr. I.4).



Gambar I.4 Neraca Mekanis

- » Timbangan analitik/elektronik
Timbangan ini lebih akurat dan lebih disukai karena keakuratan dan kemudahan pengoperasiannya. Neraca ini merupakan timbangan panci tunggal yang beroperasi berdasarkan prinsip gaya elektromagnetik yang

mengimbangi massa sampel yang ditimbang. Timbangan ini mengukur jumlah yang lebih kecil dibandingkan dengan timbangan fisik. Berat yang dapat diukur berkisar antara 1 mg atau 100 g (Gbr. I.5).



Gambar I.5 Timbangan Analitik

Pengaduk Magnetik/Magnetic stirrer

Alat ini digunakan untuk pencampuran zat terlarut secara menyeluruh dalam larutan untuk membuat campuran yang homogen. Sebuah kapsul besi ditempatkan di dalam bejana yang berisi larutan dan kemudian bejana ini diletakkan di atas lempengan pelat pengaduk magnetik yang dibuat untuk memberikan medan magnet yang berputar. Gerakan kapsul besi pada saat menyalakan instrumen akan mencampur larutan secara menyeluruh sehingga menghasilkan campuran yang homogen (Gbr. I.6).



Gambar I.6 Magnetic stirrer

Sentrifus

Instrumen ini biasanya digunakan di laboratorium biokimia untuk memisahkan serum atau plasma dari darah lengkap dan juga memisahkan endapan dalam urin (Gbr. I.7). Cara kerja sentrifus berdasarkan pada prinsip gaya sentrifugal yang digunakan untuk memisahkan benda padat dari suspensi cair.



Gambar I.7 Mesin Sentrifus

Sentrifus bekerja melalui prinsip sedimentasi di bawah pengaruh gaya gravitasi dan gaya sentrifugal dan dengan demikian memisahkan zat-zat berdasarkan kepadatannya. Berbagai jenis teknik pemisahan dikenal sebagai teknik isopiknik, teknik pelet, teknik gradien densitas, teknik pemisahan

fase, dan teknik ultrafiltrasi. Pelet adalah aplikasi yang paling umum dari sebagian besar sentrifugal. Di dasar tabung sentrifus, partikel-partikel terkonsentrasi sebagai pelet dan dipisahkan dari larutan yang tersisa dan dikenal sebagai supernatan. Bahan kimia diubah selama fase pemisahan dari matriks atau larutan berair menjadi pelarut.

Inkubator

Alat ini merupakan instrumen yang mampu mempertahankan suhu, kelembaban, oksigen, dan CO yang diinginkan, serta atmosfer di dalamnya (Gbr. I.8). Dalam biokimia, inkubator penting untuk menginkubasi campuran reaksi pada suhu tertentu untuk durasi tertentu yang tergantung pada metode yang digunakan untuk penilaian. Suhu dapat mencapai 60-65 °C dan tidak pernah lebih dari 100 °C.



Gambar I.8 Inkubator

Water Bath

Peralatan ini memiliki air yang diisi di dalamnya dan suhunya dapat dikontrol dengan tombol penyesuaian (Gbr. I.9). Alat ini digunakan untuk berbagai eksperimen di mana suhu tertentu digunakan untuk memanaskan campuran reaksi. Alat ini biasanya digunakan dalam praktikum kedokteran

yang membutuhkan pemanasan larutan. Dengan alat ini, sampel dapat dipanaskan pada suhu konstan dalam jangka waktu yang lama.



Gambar I.9 Water Bath

pH meter

pH meter adalah metode yang andal dan nyaman untuk mengukur pH larutan. pH meter mengukur perbedaan potensial listrik antara elektroda pH dan elektroda referensi, sehingga pengukur pH kadang-kadang disebut sebagai “pengukur pH potensiometri”.



Gambar I.10 pH meter

Termometer

Banyak reaksi analitik memerlukan suhu optimal untuk berlangsungnya reaksi. Reaksi enzimatik secara khusus membutuhkan kontrol suhu yang tepat. Banyak reaksi lain dalam sistem biokimia yang terjadi pada rentang suhu yang luas. Selain itu, banyak instrumen seperti lemari es laboratorium, inkubator, dan oven udara panas perlu memiliki tampilan suhu untuk memantau fungsinya yang akurat.

Tiga jenis utama termometer adalah:

- » Termometer cairan dalam gelas
Termometer cairan dalam gelas memiliki cairan berwarna atau air raksa yang dimasukkan ke dalam gelas atau batang plastik transparan dengan bohlam di salah satu ujungnya. Batang tersebut bertingkat-tingkat untuk mencatat suhu (Gbr. I.11).
- » Termometer elektronik (termistor)
Di era otomatisasi, termometer elektronik (termistor) telah digunakan di banyak perangkat yang memberikan pembacaan yang akurat dan cepat.
- » Termometer digital



Gambar I.11 Termometer

Gelas Laboratorium

Sejumlah peralatan gelas digunakan di laboratorium biokimia. Peralatan gelas yang digunakan untuk memindahkan cairan dapat berupa tipe penampung (TC: *to contained*) atau tipe pengalir (TD: *to delivery*) berdasarkan seberapa akurat volume cairan yang dipindahkan.

- » Gelas kimia Griffin: memiliki bagian bawah yang rata dan wal lurus dengan bukaan lebar. Tabung ini memiliki tanda pada sisi sampingnya dan dapat digunakan untuk menyimpan berbagai volume larutan (Gbr. I.12).



Gambar I.12 Gelas Kimia Griffin

- » Silinder Bertingkat: Alat ini adalah silinder yang memiliki batang panjang dan dasar bulat atau segi delapan. Sisi sampingnya memiliki tanda dengan berbagai volume dan ini digunakan untuk mengukur volume reagen. Ini tersedia dalam berbagai kapasitas dari 10 hingga 2000 mL (Gbr. I.13).



Gambar I.13 Silinder Bertingkat

- » Buret: Bentuknya panjang, strukturnya seperti pipet besar yang bertingkat dengan stopcock di ujung bawah. Volumennya berkisar antara 25 hingga 100 mL. Pipet ini digunakan untuk mengeluarkan volume cairan yang diinginkan setetes demi setetes (Gbr. I.14).



Gambar I.14 Buret



PERATURAN DAN TINDAKAN PENCEGAHAN KESELAMATAN DI LABORATORIUM

Kompetensi

1. Mengetahui peraturan umum di laboratorium
2. Mengetahui tindakan pencegahan dan keselamatan di laboratorium

Peraturan Umum Bekerja di laboratorium

Penanganan peralatan dan reagen yang ceroboh adalah penyebab umum kecelakaan laboratorium, yang mengakibatkan luka bakar atau kebakaran. Untuk menghindarinya, beberapa aturan dasar harus diikuti:

1. Reagen beracun, asam pekat, dan alkali tidak boleh disalurkan melalui mulut.
2. Dispenser atau pompa pipet harus digunakan.
3. Pelarut organik tidak boleh direbus langsung di atas api.

4. Reagen harus diganti di tempat yang tepat setelah digunakan dan tidak boleh tercampur, untuk menghindari kontaminasi.
5. Setiap cedera pribadi atau tertelan reagen harus segera dilaporkan.
6. Untuk luka bakar, bagian yang terkena harus dimasukkan ke dalam air dingin dan kemudian oleskan *petroleum jelly*, minyak zaitun atau salep luka bakar dan tutup dengan kain kasa kering.
7. Mahasiswa harus mengenakan baju laboratorium untuk kelas praktikum. Mereka harus menjaga kedisiplinan dan mengikuti instruksi dengan hati-hati.
8. Kebersihan sangat penting dalam semua pekerjaan biokimia. Tidak boleh membawa makanan dan minuman ke dalam laboratorium.
9. Peralatan gelas dan reagen harus ditangani dengan benar. Setiap kerusakan pada peralatan gelas harus dilaporkan.
10. Mahasiswa harus membawa buku catatan pengamatan untuk mencatat data. Mereka diharuskan untuk menyimpan buku catatan catatan laboratorium di mana percobaan harus dicatat dan ditandatangani oleh dosen yang bersangkutan.

Praktik & Prosedur Laboratorium yang Aman

Menurut Division of Occupational Health and Safety (2024), berikut kiat untuk praktik laboratorium yang aman:

Kiat #1:

1. Tanyakan pada diri Anda sendiri, “Apa yang sedang saya kerjakan? Apa saja bahayanya?”
2. Bahaya yang umum terjadi di laboratorium meliputi: hewan, biologi, kimia, fisika, dan radiologi. Jika terjadi kecelakaan atau situasi darurat yang melibatkan bahaya-bahaya ini:
 - a. Cari bantuan segera. Jika Anda terkena percikan salah satu bahan tersebut, gunakan air mengalir dari tempat pencuci mata atau pancuran darurat setidaknya selama 15 menit atau hingga bantuan darurat tiba dan memberi Anda petunjuk yang berbeda.

- b. Laporkan kepada dosen/dosen Anda setiap kecelakaan, cedera, atau bahan yang berpotensi berbahaya yang tidak terkendali–tidak peduli seberapa sepele kecelakaan dan cedera tersebut.

Kiat #2: Be prepared

1. Hadiri semua pelatihan keselamatan laboratorium yang diwajibkan sebelum memulai tugas penelitian Anda.
2. Baca semua prosedur dan informasi keselamatan terkait sebelum memulai eksperimen.
3. Lakukan hanya eksperimen yang diizinkan oleh dosen Anda.
4. Ikuti semua instruksi tertulis dan lisan. Mintalah bantuan jika Anda membutuhkan panduan atau bantuan.
5. Bekerja di bawah pengawasan langsung setiap saat. Jangan pernah bekerja sendirian di laboratorium.
6. Ketahui lokasi dan prosedur pengoperasian semua peralatan keselamatan. Ini termasuk tempat pencuci mata dan pancuran keselamatan.
7. Ketahui lokasi alarm kebakaran terdekat dan setidaknya dua jalan keluar dari gedung. Jangan pernah menggunakan lift dalam keadaan darurat.
8. Waspada dan lakukan dengan hati-hati setiap saat di laboratorium. Segera beritahu dosen jika ada kondisi yang tidak aman.
9. Ketahui prosedur tanggap darurat yang tepat untuk kecelakaan atau cedera di laboratorium.

Kiat #3: Cegah potensi paparan.

1. Bertindaklah secara bertanggung jawab dan profesional setiap saat. Tidak boleh bercanda.
2. Kenakan pakaian untuk bekerja di laboratorium. Kenakan pakaian dan sepatu yang menutupi kulit yang terbuka dan melindungi Anda dari kemungkinan cipratan. Ikat rambut panjang, perhiasan, atau apa pun yang mungkin tersangkut di peralatan tidak boleh digunakan.

3. Jangan pernah makan makanan, minum minuman, mengunyah permen karet, menggunakan kosmetik (termasuk *lip balm*), atau memegang lensa kontak di laboratorium.
4. Gunakan lemari asam kimia atau lemari *biosafety*, seperti yang diarahkan oleh dosen Anda.
5. Patuhi tata graha yang baik–jaga agar lorong tetap bersih.
6. Laporkan peralatan listrik yang rusak kepada dosen. Jangan gunakan peralatan listrik yang rusak.
7. Jangan tinggalkan eksperimen aktif tanpa pengawasan. Jangan pernah meninggalkan apa pun yang sedang dipanaskan atau terlihat bereaksi tanpa pengawasan.

Kiat #4: Lindungi diri Anda, orang lain, dan lingkungan.

1. Terapkan kebersihan pribadi yang baik. Cuci tangan Anda setelah melepas sarung tangan, sebelum meninggalkan laboratorium, dan setelah menangani bahan yang berpotensi berbahaya.
2. Saat bekerja di laboratorium, kenakan alat pelindung diri–pelindung mata, sarung tangan, jas laboratorium–seperti yang diarahkan oleh dosen Anda.
3. Pisahkan dan buang semua limbah laboratorium dengan benar.



PEMERIKSAAN KARBOHIDRAT

TUJUAN UMUM

1. Menunjukkan adanya karbohidrat dalam suatu bahan uji
2. Menunjukkan adanya sifat-sifat fisika dan kimia karbohidrat
3. Mengidentifikasi karbohidrat dalam suatu bahan uji

DASAR TEORI

Karbohidrat adalah turunan aldehyd atau keton dari alkohol polihidrat. Karbohidrat berasal dari kata karbon (C) dan hidrat (H₂O). Rumus umumnya dikenal sebagai C_x(H₂O)_n. Hewan sangat bergantung pada sumber tumbuhan untuk memperoleh karbohidrat meskipun mereka dapat mensintesis karbohidrat dari sumber non karbohidrat seperti gliserol dan asam amino dalam tubuh (glukoneogenesis).

Sifat karbohidrat:

- » Dapat teroksidasi
- » Dapat tereduksi

- » Dapat berkondensasi dan berpolimerisasi
- » Dapat membentuk glikosida

Klasifikasi karbohidrat akan berguna untuk mendeteksi berbagai jenis karbohidrat dengan tes kimia yang berbeda.

Monosakarida: senyawa dasar dari seri ini memiliki rantai karbon tunggal dengan gugus aldehyd atau keton bebas dan sejumlah gugus hidroksil. Glukosa suatu aldohexosa dan fruktosa suatu ketohexosa adalah monosakarida yang paling umum. Fruktosa juga disebut sebagai “levulosa” karena bersifat *levorotatory*. Tidak dapat dihidrolisis menjadi karbohidrat yang lebih sederhana. Monosakarida diklasifikasikan menjadi triosa, tetrosa, pentosa, heksosa, heptosa berdasarkan jumlah atom karbon yang ada di dalamnya. Monosakarida dibagi lagi menjadi aldosa dan ketosa berdasarkan gugus fungsi yang menyusunnya.

Karakter fisik monosakarida: Tampilan jernih, tidak berwarna, tidak berbau dan reaksi kertas lakmus tidak ada perubahan warna (netral).

Disakarida: Menghasilkan dua unit monosakarida pada hidrolisis.

- Sukrosa (glukosa + fruktosa)
- Laktosa (glukosa + galaktosa)
- Maltose (glukosa + glukosa)

Oligosakarida: Menghasilkan kurang dari sepuluh monosakarida.

- Maltotriosa (3 unit glukosa)
- Rafinosa (glukosa + fruktosa + galaktosa)

Polisakarida: mengandung lebih dari 10 unit monosakarida

PERCOBAAN SIFAT FISIKA (RASA MANIS)

Tujuan Praktikum: untuk menentukan kemanisan relatif dari beberapa senyawa karbohidrat

1. Alat dan Bahan:

Larutan standar karbohidrat yang terdiri dari: Larutan glukosa 1%, Larutan sukrosa 1%, Larutan galaktosa 1%, Larutan fruktosa 1%, Larutan amilum 1%

Aspartam, natrium siklamat dan sakarin

2. Metode Kerja:

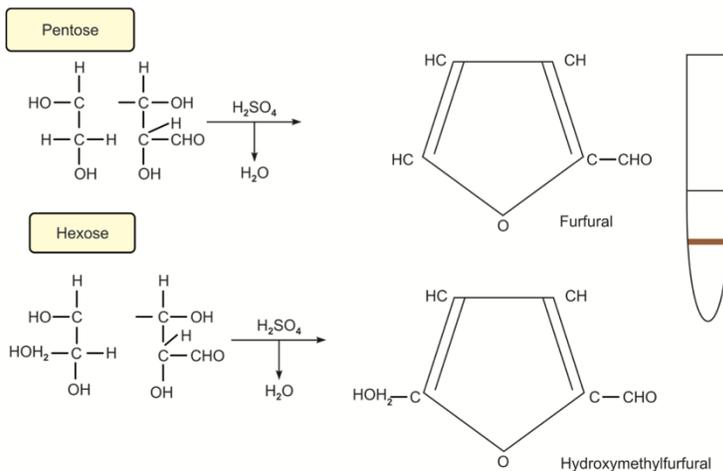
- Sediakan larutan standar karbohidrat secukupnya
- Tentukan kemanisan relatif dari masing-masing karbohidrat dengan cara mencicipinya
- Berkumurlah dengan air bersih setiap kali menguji zat tersebut
- Bedakan rasa manis sakarin dengan karbohidrat yang paling manis

TES MOLISCH (REAKSI ALFA-NAFTOL)

Tujuan Praktikum: untuk menentukan kemanisan relatif dari beberapa senyawa karbohidrat

Prinsip: Reaksi ini merupakan tes umum untuk semua karbohidrat.

Karbohidrat ketika direaksikan dengan H_2SO_4 pekat mengalami dehidrasi untuk menghasilkan turunan furfural. Senyawa ini mengembun dengan α -naftol membentuk produk berwarna ungu kemerahan. Oligosakarida dan polisakarida dihidrolisis terlebih dahulu menjadi monosakarida penyusunnya yang kemudian didehidrasi. Pentosa menghasilkan furfural dan heksosa menghasilkan 5-hidroksimetilfurfural.



Gambar III.1 Reaksi kimia uji Molisch

1. Reagen:

Reagen Molisch (3.75 g alpha-naftol dalam 25 ml etanol 99%) dan asam sulfat pekat

2. Bahan uji:

- Larutan standar karbohidrat
- Larutan glukosa 1%, Larutan sukrosa 1%, Larutan galaktosa 1%, Larutan fruktosa 1%, Larutan amilum 1%
- Aspartam, siklamat, dan sakarin

3. Prosedur Kerja:

- a. Siapkan tabung reaksi dan beri label pada tiap tabung
- b. Masukkan 1 ml sampel uji ke dalam tabung reaksi
- c. Tambahkan 2 tetes reagen Molisch dan dikocok
- d. Miringkan tabung reaksi yang berisi larutan standar karbohidrat, kemudian alirkan 1 ml H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung
- e. Setelah pencampuran dan homogenisasi, amati warna pada bidang batas antara asam dan larutan air hanya (asam yang lebih berat turun di bawah larutan gula)
- f. Perhatikan terbentuknya cincin warna ungu yang terjadi pada bidang batas

4. Observasi:

Terbentuk senyawa kompleks ungu sehingga larutan akan terlihat menjadi tiga bagian yaitu bagian paling bawah berwarna bening dimana larutan tersebut adalah asam, bagian tengah berwarna ungu yang disebut sebagai cincin ungu, dan paling atas adalah sampel yang diduga mengandung karbohidrat.



5. Kesimpulan:

Sampel positif mengandung monosakarida

6. Aplikasi:

Tes umum untuk mendeteksi kandungan karbohidrat

7. Catatan:

- » Uji Molisch dinamai sesuai penemunya yaitu Hans Molisch, seorang ahli botani dari Australia
- » Tes Molisch diberikan oleh setidaknya lima karbon.
- » a-naftol dalam alkohol harus disiapkan segar/baru.
- » Interaksi air-asam menghasilkan panas dan dapat menyebabkan hangusnya karbohidrat, yang mengakibatkan terbentuknya cincin hitam. Oleh karena itu, asam harus dituang dengan sangat perlahan dan hati-hati untuk meminimalkan interaksi ini.
- » Munculnya warna hijau saat melakukan pengujian (tes negatif), yang bertahan bahkan setelah pengujian selesai menunjukkan penggunaan reagen Molisch yang berlebihan dari yang dibutuhkan atau karena adanya kotoran dalam reagen
- » Tes ini juga positif oleh aldehyd dan oleh asam format, laktat, oksalat, sitrat dan asam organik tertentu lainnya
- » Hasil negatif merupakan bukti bahwa sampel bukan atau tidak mengandung karbohidrat

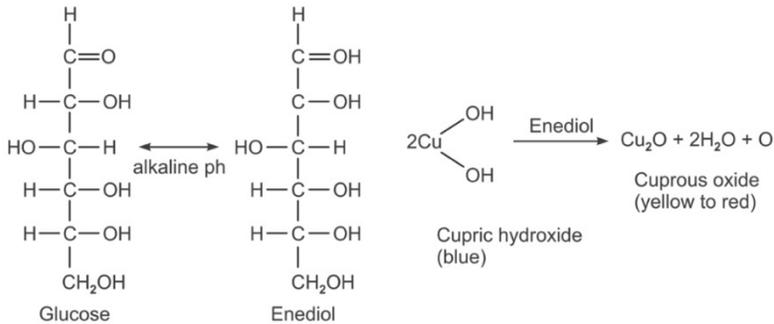
TEST BENEDICT

Tes Benedict bersifat semi kuantitatif dan merupakan tes yang sensitif untuk semua jenis gula pereduksi atau semua monosakarida dan disakarida kecuali sukrosa dan trehalosa. Reaksi yang terjadi adalah reduksi-oksidasi.

1. Prinsip:

Karbohidrat dengan gugus aldehyd atau keton bebas memiliki kemampuan untuk mereduksi berbagai ion logam. Gula pereduksi dalam kondisi basa tautomerisasi dan membentuk enediol yang merupakan agen pereduksi yang kuat. Dalam pengujian ini ion tembaga direduksi menjadi ion tembaga oksida merah oleh enediol yang terbentuk dari gula dalam media basa reagen Benedict. Kupri hidroksida yang terbentuk

selama reaksi disimpan dalam larutan oleh chelator logam seperti sitrat (atau tartrat dalam larutan Fehling).



Gambar III.2 Reaksi kimia uji Benedict

Reagen:

Reagen Benedict mengandung:

- » Tembaga sulfat CuSO_4 : terdisosiasi sebagai penyedia ion tembaga yang cukup (Cu^{2+})
- » Natrium sitrat: berperan sebagai *stabilizing agent*. Mencegah pengendapan ion tembaga sebagai tembaga hidroksida dengan membentuk kompleks tembaga-natrium sitrat yang terikat longgar yang pada disosiasi memberikan pasokan ion tembaga secara terus menerus sehingga mencegah terbentuknya CuO berwarna hitam.
- » Natrium karbonat (Na_2CO_3): membuat pH menjadi basa atau alkali yang mengubah gugus karbonil bebas dari gula menjadi bentuk enol yang reaktif. Enol yang reaktif mereduksi Cu^{2+} dari senyawa kompleks dengan sitrat menjadi Cu^+ . Cu^+ bersama OH membentuk CuOH (berwarna kuning), yang dengan pemanasan akan berubah menjadi endapan Cu_2O yang berwarna merah. Warna yang terbentuk bervariasi mulai dari hijau, kuning, orange, merah sampai endapan merah bata, tergantung jumlah Cu_2O yang terbentuk.

2. Cara membuat larutan Benedict:

Larutan A: Na. sitrat 86,5 g; Na_2CO_3 50 g; Aquadest 400 ml

Larutkan Na. sitrat dan Na_2CO_3 dalam air (dibantu dengan pemanasan), hasilnya disaring dengan kertas saring dan diencerkan dengan aquades hingga volume menjadi 425 ml.

Larutan B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8,65 g; Aquadest 50 ml

Larutkan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam aquadest hingga larut dengan sempurna. Tuangkan larutan B ke dalam larutan A sambil diaduk pelan-pelan, tambahkan aquades hingga volume menjadi 500 ml.

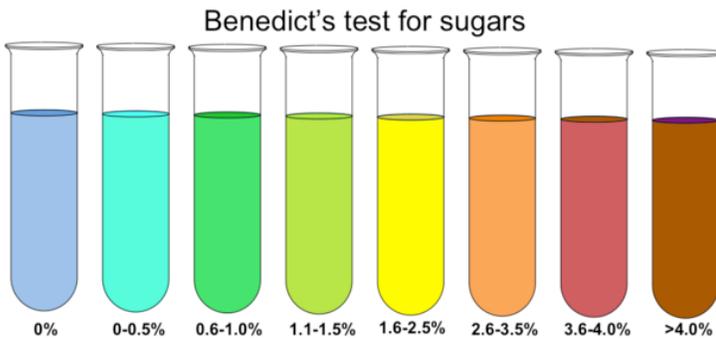
Bahan uji: Larutan standar karbohidrat dan larutan sampel

Prosedur Kerja:

- Siapkan tabung reaksi dan beri label pada tiap tabung
- Masukkan 2,5 ml reagen Benedict ke dalam tabung reaksi, panaskan dalam water bath (penangas air) selama 1 menit. Pastikan tidak ada perubahan warna dan endapan
- Tambahkan 5 tetes sampel ke dalam tabung reaksi. Aduk agar tercampur sempurna
- Panaskan dalam *water bath* (penangas air) selama 3-5 menit atau di atas api langsung selama 2 menit.
- Biarkan larutan dingin. Perhatikan perubahan warna dan munculnya endapan.

Observasi:

Perhatikan endapan yang warnanya bervariasi menurut konsentrasi larutan gula—hijau, kuning, jingga, atau merah.



Catatan penting:

Munculnya warna coklat tua pada saat tes menunjukkan hangusnya gula karena panas yang dihasilkan selama penambahan asam (interaksi air asam menghasilkan panas). Perubahan ini akan menjadi lebih jelas ketika konsentrasi larutan gula tinggi. Untuk menghindari hangus (*charring*), encerkan larutan sampel gula dengan air seperti dan ulangi uji Molisch.

Kesimpulan:

Monosakarida pereduksi, glukosa, fruktosa, galaktosa dan manosa memberikan reaksi positif dengan pereaksi Benedict. Warna endapan memberikan gambaran konsentrasi gula dalam larutan.

Warna presipitat	Kadar glukosa dalam urine (gm%)
Hijau (+)	0,1 – 0,5%
Kuning (++)	0,5 – 1,0%
Jingga (+++)	1,0 – 2,0%
Merah (++++)	>2 %

Aplikasi:

Selain untuk mendeteksi gula pereduksi, tes ini sering digunakan mendeteksi glukosa dalam urin pasien diabetes, meskipun tidak spesifik untuk glukosa.

Catatan:

- » Sensitivitas hingga 0,1-0,15 g% larutan gula (uji Benedict tidak akan positif dengan larutan yang mengandung kurang dari 0,1-0,15 gm% gula).
- » Sensitivitas tes adalah 0,1-1,5 g% terhadap hasil positif palsu yang diperoleh dari zat pereduksi lain seperti laktosa, galaktosa, fruktosa, xilosa, dll. Tes khusus dilakukan untuk mengesampingkan kemungkinan adanya gula ini.
- » Zat normal seperti asam urat, kreatinin, dan asam askorbat dalam jumlah yang lebih tinggi juga memberikan hasil positif palsu.

TES FEHLING

Tes ini adalah tes reduksi lain untuk mendeteksi gula pereduksi. Pereaksi Fehling berbeda dari pereaksi Benedict karena pereaksi Fehling mengandung natrium kalium tartrat (garam Rochelle) menggantikan natrium sitrat.

Prinsip:

Karbohidrat dengan gugus aldehid atau keton bebas mereduksi tembaga sulfat menjadi tembaga oksida membentuk endapan berwarna kuning atau merah kecoklatan. Natrium kalium tartrat mencegah pengendapan tembaga hidroksida dengan membentuk kompleks dengan ion tembaga. Kompleks-kompleks ini berdisosiasi untuk menyediakan pasokan ion tembaga secara terus-menerus untuk oksidasi.

Gugus aldehid dan keton bebas dalam molekul karbohidrat dapat mereduksi Cu^{2+} yang terdapat dalam pereaksi Fehling menjadi Cu^+ berupa endapan merah Cu_2O

Pereaksi Fehling ditambahkan karbohidrat pereduksi, kemudian dipanaskan, akan terjadi perubahan warna dari biru \rightarrow hijau \rightarrow kuning \rightarrow kemerah-merahan dan akhirnya terbentuk endapan merah bata kupro oksida bila jumlah karbohidrat pereduksi banyak. Pada reaksi ini, Karbohidrat pereduksi akan diubah menjadi asam onat yang membentuk garam karena adanya basa, sedangkan pereaksi fehling akan mengalami reduksi sehingga Cu^{2+} diubah menjadi Cu^+ .

Reagen:

Larutan Fehling harus disiapkan segar saat akan digunakan. Hal ini dilakukan dengan mencampur volume yang sama dari dua larutan yang dibuat sebelumnya, larutan Fehling A berwarna biru tua, yaitu 70 gr tembaga sulfat pentahidrat per liter larutan dan larutan Fehling B yang tidak berwarna, yaitu sekitar 350 gram garam Rochelle (kalium natrium tartrat tetrahidrat) dan 100 gr natrium hidroksida per liter larutan.

Bahan uji: Larutan standar karbohidrat dan larutan sampel

Prosedur Kerja:

- a. Siapkan tabung reaksi dan beri label pada tiap tabung
- b. Campurkan 1 ml reagen Fehling A dan 1 ml reagen Fehling B ke dalam tabung reaksi
- c. Tambahkan 5 tetes sampel ke dalam tabung reaksi. Aduk agar tercampur sempurna.
- d. Panaskan dalam *water bath* (penangas air) selama 1 menit
- e. Biarkan larutan dingin. Perhatikan perubahan warna dan munculnya endapan.

Observasi:

Terbentuk endapan berwarna merah atau kuning.

Kesimpulan:

Reaksi positif menunjukkan sampel mengandung karbohidrat.

Aplikasi:

Karena asam urat dan kreatinin juga memberikan tes positif; Uji Fehling tidak umum digunakan saat ini.

Catatan:

- » Sensitivitas hingga 0,1-0,15 g% larutan gula (uji Benedict tidak akan positif dengan larutan yang mengandung kurang dari 0,1-0,15 gm% gula).
- » Larutan Fehling sebagian besar bersifat korosif. Oleh karena itu, selalu baik untuk memakai alat pelindung seperti kacamata dan sarung tangan.

TES BARFOED

Prinsip:

Tes ini berbeda dari 2 tes reduksi lainnya karena tes ini dilakukan dalam media asam ringan yang hanya akan bereaksi dengan karbohidrat pereduksi kuat—monosakarida. Pada kondisi asam ringan, gula membentuk enediol, yang dapat mereduksi ion Cu^{2+} menjadi ion Cu^+ yang jika dipanaskan membentuk Cu_2O . Sifat pereduksi bergantung pada gugus karbonil (gugus aldehid atau keton).

Reagen:

Tembaga asetat dan Asam asetat glasial

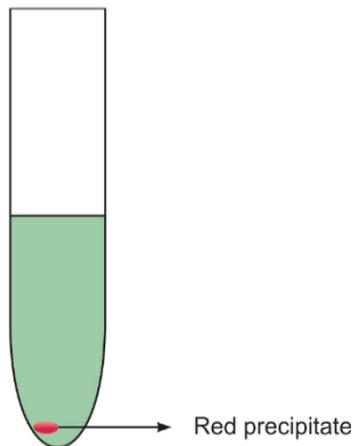
Bahan uji: Larutan standar karbohidrat dan larutan sampel

Prosedur Kerja:

- Siapkan tabung reaksi dan beri label pada tiap tabung
- Masukkan 2,5 ml pereaksi/reagen Barfoed ke dalam tabung reaksi
- Tambahkan 0,5 ml sampel karbohidrat ke dalam tabung reaksi. Campur dengan sempurna.
- Panaskan dalam *water bath* (penangas air mendidih) selama 2 menit saja; biarkan larutan dingin (tabung boleh didinginkan di bawah air kran)
- Catat waktu dan perhatikan perubahan warna dan munculnya endapan

Observasi:

Terbentuk endapan merah yang menempel di bagian paling bawah tabung reaksi



Gambar III.3 Hasil uji Barfoed

Kesimpulan:

Tes ini hanya positif untuk monosakarida saja, misalnya glukosa, fruktosa, galaktosa, manosa.

Aplikasi:

Uji Barfoed membedakan antara monosakarida pereduksi dan disakarida.

Catatan:

- » Apabila terdapat disakarida konsentrasi tinggi (> 5 g%) juga akan memberikan hasil positif
- » Tidak seperti uji Benedict, uji Barfoed tidak cocok untuk menguji gula dalam urin atau larutan apa pun yang mengandung klorida
- » Terbentuk endapan merah di dasar tabung. Untuk melihat endapan, angkat tabung setinggi mata, jika tidak endapan yang terbentuk menempel di sebagian besar bagian bawah tabung dapat luput dari perhatian.
Perbedaan antara uji Barfoed dan uji Benedict
- » Uji Barfoed berbeda dari uji Benedict dalam pH medium.
- » Uji Benedict dilakukan dalam kondisi basa dan uji Barfoed dalam kondisi asam.
- » Dalam medium asam, monosakarida lebih mudah ter-enolisasi daripada disakarida dan enediol ini mereduksi ion tembaga yang dilepaskan oleh tembaga asetat dari reagen Barfoed untuk menghasilkan endapan merah.

RAPID FURFURAL TEST

Prinsip:

Reaksi dehidrasi seperti pada uji Molisch. Ketoheksosa dengan cepat diubah menjadi hidroksimetil-furfural oleh HCl dan membentuk kompleks berwarna ungu dengan naftol alfa alkohol 1%. Reaksi dehidrasi yang berutang pada gugus hidroksil gula. HCl pekat lebih lemah dari asam sulfat pekat, ketosa lebih mudah mengalami dehidrasi (misalnya fruktosa) daripada aldosa untuk membentuk hidroksimetil furfural, yang kemudian mengembun dengan -naftol untuk membentuk kompleks berwarna ungu.

Reagen:

Pereaksi/reagen Molisch dan HCl pekat

Bahan uji: Larutan standar karbohidrat dan larutan sampel

Prosedur Kerja:

- a. Siapkan tabung reaksi dan beri label pada tiap tabung
- b. Masukkan 2 ml sampel ke dalam tabung reaksi
- c. Tambahkan 2 tetes pereaksi/reagen Molisch.
- d. Tambahkan 3 ml HCl pekat
- e. Panaskan dalam water bath (penangas air mendidih) selama 30 detik saja; biarkan larutan dingin
- f. Catat waktu dan perhatikan perubahan warna dan munculnya endapan

Observasi:

Reaksi positif adanya gula keton dengan adanya perubahan warna ungu.



Gambar III.4 Hasil Uji Rapid Furfural

Kesimpulan:

- a. Tidak ada perubahan warna pada sampel larutan glukosa; pemanasan yang lebih lama akan mereduksi gula
- b. Terbentuknya warna ungu dalam waktu 30 detik perebusan menunjukkan adanya gula keton, misalnya fruktosa

Aplikasi:

Untuk uji ketosa dan membedakannya dari aldosa. Uji ini juga mampu membedakan glukosa dan fruktosa.

Catatan:

- » Terkadang, warna muncul dengan membiarkan tabung tetap di dalam rak tabung reaksi selama beberapa menit.
- » Jika terbentuk warna merah dan bukan ungu karena aksi asam, encerkan sampel gula dengan air dan lakukan pengujian dengan larutan gula encer

TES SELIWANOFF

Prinsip:

Reaksi dehidrasi karena gugus hidroksil gula. Pereaksi Seliwanoff adalah resorsinol dalam asam klorida encer. Keton (misalnya fruktosa) lebih mudah mengalami dehidrasi oleh HCl daripada aldosa untuk membentuk hidroksimetil furfural yang kemudian mengembun dengan resorsinol reagen Seliwanoff untuk membentuk kompleks berwarna merah. HCl pekat mendehidrasi ketoheksosa untuk membentuk turunan furfural yang berkondensasi dengan resorsinol untuk memberikan larutan warna merah ceri.

Reagen: Tembaga asetat dan Asam asetat glasial.

Bahan uji: Larutan standar karbohidrat dan larutan sampel.

Prosedur Kerja:

- Siapkan tabung reaksi dan beri label pada tiap tabung
- Masukkan 3 ml pereaksi/reagen Seliwanoff ke dalam tabung reaksi
- Tambahkan 2 tetes atau 0,5 ml larutan fruktosa/karbohidrat
- Panaskan dengan water bath selama 30 detik saja
- Dinginkan

Observasi:

Terbentuk perubahan warna merah dalam waktu 30 detik.



Gambar III.5 Hasil Uji Seliwanoff

Kesimpulan:

- tidak ada perubahan warna pada sampel larutan glukosa
- Warna pink atau merah menunjukkan adanya keton heksosa/fruktosa

Aplikasi:

Uji Barfoed membedakan antara monosakarida pereduksi dan disakarida.

Catatan:

- » Pemanasan lama mengubah aldosa menjadi ketosa yang menghasilkan warna merah ceri (positif palsu)
- » Sensitivitas hingga 0,1 gram% fruktosa tanpa adanya glukosa. Dengan adanya glukosa, tes menjadi kurang sensitif terhadap fruktosa.
- » Glukosa dalam jumlah besar memberikan warna yang sama. Jika pemanasan berlangsung lama, reaksi positif dapat terjadi dengan glukosa karena transformasi Lobry de Bruyn-van Ekenstein dari glukosa menjadi fruktosa dengan adanya asam.

UJI IODIUM

Prinsip:

Uji iodium merupakan uji khas untuk mendeteksi adanya kandungan amilum atau pati (polisakarida). Larutan amilum apabila diberi larutan iodium akan berwarna biru akibat molekul amilosa yang membentuk senyawa amilopektin. Senyawa amilopektin dengan iodium akan memberikan warna ungu atau merah lembayung.

Reagen:

- » Pereaksi Iodium (larutan KI-KIO₃)
- » Komposisi: 5,0 g KI; 0,375 g KIO₃; 2 ml NaOH ditambahkan dalam 1 L aquades
- » Larutan HCl 0,05 N

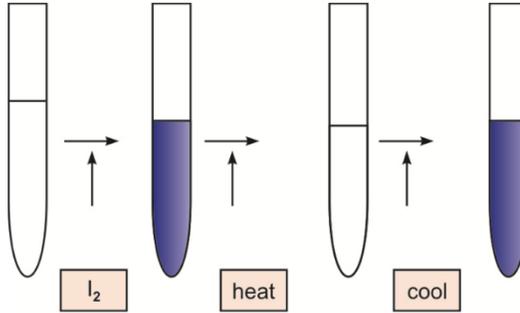
Bahan uji: Larutan standar karbohidrat dan larutan sampel

Prosedur Kerja:

- a. Siapkan tabung reaksi dan beri label pada tiap tabung
- b. Masukkan 3 ml sampel ke dalam tabung reaksi
- c. Tambahkan 3 ml larutan HCl 0,05N pada tiap tabung
- d. Tambahkan pereaksi Iodium sebanyak 1 ml
- e. Panaskan dalam *water bath*. Amati warna yang terjadi pada masing-masing tabung. Kemudian perhatikan kembali saat larutan sudah dingin.

Observasi:

Warna biru pekat akan muncul dan menghilang saat proses pemanasan, kemudian Kembali berwarna biru pekat saat larutan sudah dingin.



Gambar III.6 Hasil Uji Iodium

Kesimpulan:

Hasil positif menunjukkan adanya kandungan amilum atau pati.

Aplikasi: Uji khas untuk amilum atau pati

Catatan:

- » Pati membentuk kompleks adsorpsi dengan iodium untuk memberikan warna biru. Warna biru menghilang pada pemanasan karena rusaknya kompleks adsorpsi pati iodium dan muncul pada pendinginan karena pembentukan kembali kompleks adsorpsi.
- » Terkadang warna tidak muncul kembali pada pendinginan karena sejumlah kecil i38 iodium yang ditambahkan dapat menguap selama pemanasan.

LATIHAN SOAL

1. Sebutkan keterangan untuk tes berikut ini:
 - a. Tes umum untuk mendeteksi karbohidrat
 - b. Uji reduksi untuk monosakarida
 - c. Gula yang memberikan respons positif untuk Rapid uji furfural dan uji Seliwanoff
 - d. Tes berdasarkan sifat reduksi gula
 - e. Tes yang digunakan untuk mendeteksi gula dalam urin
2. Tuliskan prinsip uji berikut ini:
 - a. Molisch test
 - b. Benedict's test
 - c. Barfoed's test
 - d. Osazone test
 - e. Iodine test
 - f. Rapid furfural test
 - g. Seliwanoff's test
3. Jelaskan mengapa uji Benedict disebut sebagai tes kuantitatif.
4. Berbeda dengan tes Benedict, tes Barfoed tidak cocok untuk menguji glukosa dalam urin. Mengapa?
5. Tuliskan perbedaan antara uji Benedict dan Barfoed.



PEMERIKSAAN PROTEIN

TUJUAN PRAKTIKUM

1. Menunjukkan adanya protein dalam suatu bahan uji
2. Menunjukkan adanya sifat-sifat fisika dan kimia protein
3. Mengidentifikasi protein dalam suatu bahan uji

PENDAHULUAN

Protein adalah makromolekul kompleks yang terdiri dari asam amino yang diproduksi oleh semua sel hidup. Protein memiliki ukuran, bentuk, dan muatan. Protein terdiri dari 20 asam amino dalam jumlah dan urutan yang bervariasi. Asam amino mengandung gugus karboksilat ($-\text{COOH}$) dan gugus amino ($-\text{NH}_2$) serta rantai samping ($-\text{R}$ Group) Bila dua asam amino atau lebih bergabung maka akan terbentuk dipeptida, tripeptida, dan seterusnya menjadi polipeptida. Dipeptida, tripeptida dalam struktur liniernya selalu mempunyai dua terminal, yaitu: terminal karboksil dan terminal amino. Struktur tersebut dikenal sebagai struktur primer protein.

Yang dimaksud dengan polipeptida yang dibentuk oleh kurang dari 100 asam amino. Bila lebih dari 100 asam amino disebut protein. Urutan asam amino menentukan karakteristik protein, yang diatur oleh kode genetik. Semua protein mengandung C, H, O dan N (sekitar 16%); beberapa mengandung S. Keberadaan N membedakan protein dari karbohidrat dan lipid. Protein menjalankan berbagai fungsi dalam bentuk enzim, hormon, antibodi, faktor pembekuan, elemen kontraktile, dan pemeliharaan tekanan osmotik.

Reaksi asam amino dan protein untuk pemeriksaan laboratorik terdiri dari reaksi pengendapan protein dan reaksi warna protein.

REAKSI PRESIPITASI PROTEIN

Presipitasi protein dilakukan untuk 2 (dua) tujuan yang berbeda yaitu:

1. Untuk identifikasi dan estimasi protein itu sendiri, misalnya protein diekskresikan dalam urin dalam berbagai bentuk disfungsi ginjal. Menurut tingkat kerusakan ginjal, protein yang berbeda diekskresikan dalam urin. Pada tahap awal, albumin dengan berat molekul rendah diekskresikan. Seiring perkembangan penyakit, globulin dengan berat molekul tinggi mulai diekskresikan.
2. Protein diendapkan terlebih dahulu untuk analisis senyawa lain dalam sampel.

1. PRESIPITASI DENGAN LOGAM BERAT

Prinsip: Molekul protein ada sebagai anion (bermuatan negatif) dalam medium alkali. Molekul protein yang bermuatan negatif akan bergabung dengan ion logam yang bermuatan positif seperti Ag^+ , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Sb^{+3} , dan Zn^{+2} dan diendapkan.

Keuntungan dari jenis pengendapan ini adalah bahwa mereka dapat mengendap dalam larutan encer juga. Ion-ion ini diklasifikasikan ke dalam tiga kelompok sebagai berikut:

- a. Berikatan kuat dengan asam karboksilat dan senyawa nitrogen Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}
- b. Berikatan dengan asam karboksilat Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} dan Pb^{2+}
- c. Berikatan kuat dengan gugus sulfhidril Ag^+ , Hg^+ dan Pb^{2+}

2. Pengendapan dengan 10% timbal asetat

Prinsip: Titik isoelektrik protein adalah pH di mana muatan bersih pada protein adalah nol. Jika pH medium dibuat basa, protein akan memperoleh muatan negatif bersih. muatan dan jika pH medium dibuat asam, protein memperoleh muatan positif bersih. Dalam tes ini, setelah menambahkan alkali, protein memperoleh muatan negatif dan membentuk ikatan ionik dengan ion logam bermuatan positif yang menyebabkan pengendapan protein.

Prosedur:

Ambil 3 ml larutan protein; tambahkan 2 tetes NaOH 5%. Aduk rata dan tambahkan 2 ml Larutan timbal asetat 10%.

Pengamatan: Terbentuk endapan putih.

Kesimpulan: Protein diendapkan oleh ion timbal bermuatan positif.

3. Pengendapan dengan larutan CuSO₄ 10%

Prinsip:

Sama seperti pengendapan oleh timbal asetat.

Prosedur:

Ke dalam 3 ml larutan protein tambahkan 2 tetes NaOH 5%. Aduk rata dan tambahkan 10 tetes CuSO₄.

Pengamatan:

Endapan biru muda terbentuk Kesimpulan: Protein diendapkan oleh ion tembaga bermuatan positif.

4. Pengendapan dengan larutan ZnSO₄ 10%

Prinsip: Sama seperti pengendapan oleh timbal asetat

Prosedur: Ambil 3 ml larutan protein, tambahkan 2 tetes NaOH 5%. Aduk rata dan tambahkan 2 mL larutan ZnSO₄ 10%.

Pengamatan: Terbentuk endapan putih yang intens.

Kesimpulan: Protein diendapkan oleh ion Zn yang bermuatan positif.

PENGENDAPAN OLEH REAGEN ANIONIK (ALKALOID)

Prinsip: Protein bersifat amfoter, yaitu berperilaku sebagai asam dalam media basa dan sebagai basa dalam media asam. Dengan adanya reagen alkaloid, mereka bertindak sebagai basa, dan bereaksi dengan asam untuk membentuk garam yang tidak larut dan digumpalkan, misalnya protein sulfosalisilat.

1. Pengendapan dengan asam metafosfat

Prosedur:

Ambil 3 ml larutan protein dalam tabung reaksi dan tambahkan beberapa tetes asam metafosfat asam.

Kesimpulan:

Asam metafosfat dalam larutan membentuk anion asam. Protein menjadi bermuatan positif. Oleh karena itu, ion protein yang bermuatan positif dan anion asam yang bermuatan negatif yang berasal dari asam metafosfat bergabung membentuk kompleks yang tidak dapat larut yang menyebabkan pengendapan.

PENGENDAPAN OLEH PELARUT ORGANIK

1. Pengendapan dengan etanol

Prinsip:

Penambahan pelarut organik, seperti aseton atau alkohol menurunkan konstanta dielektrik pelarut dan memindahkan beberapa molekul air yang terkait dengan protein dan menurunkan konsentrasi air dalam larutan. Efek ini cenderung menurunkan kelarutan protein

Prosedur:

Tambahkan 2 ml etanol ke dalam 1 ml larutan protein yang diambil dalam tabung reaksi dan aduk rata.

Pengamatan:

Endapan keruh terbentuk
Kesimpulan: Protein diendapkan karena penghilangan air dari hidrasi.

PENGENDAPAN OLEH PANAS

Prinsip:

Pemanasan menyebabkan denaturasi. Gangguan pada struktur sekunder, tersier, kuartener yang dipertahankan oleh gaya non-kovalen (ikatan hidrogen, interaksi ionik, gaya van der Waals, interaksi hidrofobik) menyebabkan denaturasi. Agregasi protein yang terdenaturasi disebut sebagai koagulum. Denaturasi mungkin dapat dibalik dalam beberapa kasus (tidak selalu), tetapi koagulasi selalu tidak dapat dibalik. Penambahan asam asetat menurunkan pH medium menuju pH isoelektrik (pI) albumin

Prosedur:

Ambil tabung reaksi dan isi larutan protein (albumin) hingga dua pertiga bagian. Panaskan sepertiga bagian atas kolom larutan protein. Perhatikan apakah ada endapan yang terbentuk muncul. Terlepas dari ada atau tidaknya perkembangan endapan, tambahkan asam asetat 2% setetes demi setetes. Perhatikan, apakah endapan yang terbentuk sebelumnya (jika ada) menjadi semakin pekat atau muncul setelah penambahan asam asetat.

Pengamatan: Koagulum putih yang terbentuk pada pemanasan awal semakin pekat saat ditambahkan asam asetat.

Kesimpulan: Albumin terdenaturasi oleh pemanasan dan diendapkan oleh asam asetat.

REAKSI WARNA DARI PROTEIN DAN ASAM AMINO

Protein bereaksi dengan berbagai reagen untuk membentuk produk berwarna karena ikatan peptida dan asam amino penyusunnya, reaksi ini berguna untuk studi kuantitatif dan kualitatif protein. Dengan studi kuantitatif, konsentrasi protein dapat diperkirakan. Studi kualitatif membantu untuk mengetahui keberadaan protein atau asam amino tertentu yang ada dalam protein. Pemeriksaan ini berguna terutama dalam situasi berikut ini:

1. Untuk diagnosis aminoaciduria: Asam amino individu mengalami katabolisme yang unik jalur katabolik yang unik dan kekurangan enzim apa pun dari jalur ini menyebabkan akumulasi senyawa proksimal

dari langkah yang rusak yang menyebabkan gangguan yang disebut aminoaciduria. Misalnya fenilketonuria karena defisiensi fenilalanin hidroksilase menyebabkan peningkatan kadar fenilalanin dalam darah dan urin.

2. Untuk penilaian nutrisi: Dari dua puluh asam amino standar, hanya delapan asam amino yang esensial dan dua belas asam amino lainnya tidak esensial pada orang dewasa. Protein yang mengandung semua asam amino esensial dianggap sebagai protein berkualitas baik, misalnya; albumin telur. Oleh karena itu, untuk membuat penilaian gizi (secara kasar) protein juga mempelajari reaksi asam amino sangat membantu.
3. Untuk mendeteksi keberadaan protein atau asam amino dalam cairan biologis atau cairan yang tidak diketahui komposisinya. Tergantung pada sifat asam amino yang terkandung dalam protein, respon dan intensitas reaksi warna bervariasi.

4. Test Biuret

Prinsip:

Ion cupri dalam media alkali membentuk kompleks berwarna ungu dengan nitrogen ikatan peptida dari peptida dan Protein. Ini adalah tes untuk hubungan peptida. Karena semua protein mengandung ikatan peptida, maka protein akan merespons tes ini. Warna ungu disebabkan oleh pembentukan kompleks tembaga ordansi antara tembaga hidroksida dan ikatan peptida. Tes ini juga dapat diberikan oleh zat yang mengandung gugus $(-CSNH_2)$, $(-C(NH)NH_2)$, dan $(-CH_2NH_2)$.

Biuret, yang diperoleh dengan memanaskan urea pada suhu 180 °C, juga memberikan tes positif karena mengandung ikatan CONH. Persyaratan minimum untuk tes positif adalah adanya dua ikatan peptida. Biuret (nonprotein, terbentuk dari urea pada pemanasan; biuret yang terbentuk memberikan warna ungu dengan larutan tembaga sulfat dalam media basa).

Prosedur: Ke dalam 2-3 ml larutan protein tambahkan larutan natrium hidroksida 10% dengan volume yang sama, aduk rata. Kemudian tambahkan larutan tembaga sulfat 0,5% setetes demi setetes, aduk di antara tetes hingga diperoleh warna ungu keunguan.

Pengamatan: Warna ungu keunguan berkembang.



Gambar IV.1 Hasil reaksi Biuret

Kesimpulan: Reaksi biuret diberikan oleh zat yang mengandung dua gugus karbamil ($-\text{CONH}_2$) yang bergabung secara langsung atau melalui satu atom nitrogen atau karbon. Reaksi positif menunjukkan bahwa larutan protein yang diberikan mengandung setidaknya dua ikatan peptida.

5. Uji Ninhidrin

Prinsip:

Ninhidrin bereaksi dengan gugus α -amino dari protein dan asam amino bebas untuk menghasilkan kompleks berwarna biru atau ungu. Ini adalah salah satu tes yang paling sensitif untuk asam amino yang dijawab oleh semua protein, pepton, peptida, asam amino, dan amonia.

Prosedur:

Ke dalam 1 ml larutan protein (pH harus antara 5 dan 7) dalam tabung reaksi, tambahkan 2-3 tetes larutan ninhidrin (triketohidrin hidrat) 0,1% yang baru disiapkan. Panaskan larutan hingga mendidih selama 2 menit dan biarkan dingin.

Pengamatan: Warna biru dengan α -amino acid dan warna kuning dengan imino acid–proline.

Kesimpulan: Warna biru disebabkan oleh pembentukan kompleks-Ruhemann's purple yang terbentuk antara nitrogen terminal-N dan ninhidrin. Asam α -amino bereaksi dengan ninhidrin membentuk aldehida, hidrindantin, amonia, dan karbon dioksida. Kemudian satu molekul hidrindantin, ninhidrin dan kompleks amonia membentuk warna ungu Ruhemann. Protein memberikan warna biru samar. Dalam kasus protein, nitrogen terminal amino ikut serta dalam aksi.

Aplikasi: Pewarnaan asam amino dalam kromatografi kertas.



BIOKIMIA URIN

TUJUAN PRAKTIKUM

1. Mengetahui sifat normal urin
2. Mengetahui zat abnormal dalam urin

PENDAHULUAN

Urin adalah filtrat ultra plasma yang terbentuk ketika perfusi darah ke kedua ginjal. Glomerulus menyaring plasma dan volume filtrat glomerulus berjumlah 180 L dalam 24 jam untuk orang dewasa. Tubulus ginjal memodifikasi filtrat glomerulus dengan reabsorpsi dan sekresi air dan zat terlarut untuk menghasilkan volume urin akhir 1-2 L per hari. Laju filtrasi glomerulus sekitar 120 ml per menit. Dengan demikian, ginjal mempertahankan zat-zat penting dan mengeluarkan produk limbah dari tubuh. Dengan proses ini, ginjal juga membantu menjaga keseimbangan asam basa. Analisis laboratorium klinis urin dapat memberikan informasi tentang disfungsi ginjal (misalnya Sindrom nefrotik, nefritis glomerulus)

dan tentang penyakit sistemik tertentu (misalnya fenilketonuria, diabetes melitus) pada seseorang.

Urin atau air seni merupakan cairan jernih berwarna agak kuning, berbau khas dan bereaksi agak asam yang dihasilkan oleh ginjal melalui proses filtrasi, reabsorpsi, dan ekskresi. Urin mengandung banyak zat hasil metabolisme yang dikeluarkan dari tubuh. Pada beberapa penyakit, kadar suatu zat yang biasa terdapat dalam urin mungkin dikeluarkan dalam jumlah yang sangat besar atau sangat sedikit sehingga penetapan kuantitatif komposisi urin sangat penting di dalam klinik.

SIFAT URIN NORMAL

Volume

Pada orang dewasa, 600-2500 mL urin dibentuk setiap hari. Volume urin sangat tergantung pada asupan cairan, suhu lingkungan, makanan, keadaan fisik dan mental.

Berat Jenis

Berat jenis urin normal berkisar 1,003 – 1,030, tergantung pada solut (kandungan zat padat) didalamnya. Berat jenis dipengaruhi oleh volume dan komposisi urin. Dua angka terakhir dari berat jenis urin (angka desimal kedua dan ketiga) dikalikan dengan 2,6 (Koefisien Long) menyatakan jumlah zat padat total urin dalam gram/Liter. Jumlah zat padat total dalam urin 24 jam dengan volume 1200 mL adalah sekitar 50 gram.

pH

Urin bersifat asam dengan pH kira-kira 6,0 (4,7 – 8,0). Jika asupan protein tinggi, maka urin menjadi asam. Keasaman urin juga meningkat pada keadaan asidosis dan demam. Urin dapat bersifat alkalis akibat perubahan urea menjadi amonia dengan pelepasan CO₂. Pada keadaan alkalosis, urin juga bersifat alkalis.

Warna

Urin normal berwarna kuning pucat sampai kuning. Warna urin berbeda-beda sesuai volume dan konsentrasi urin. Zat warna yang terdapat dalam urin adalah urokrom, urobilin, dan hematoporfirin.

Pada keadaan demam, urin dapat berwarna kuning tua atau kecoklatan. Pada penyakit hati, pigmen empedu dapat mewarnai urin menjadi hijau, coklat atau kuning. Darah atau hemoglobin dalam urin berwarna kelabu sampai merah. Obat tertentu juga dapat mewarnai urin. Urin normal biasanya transparan. Pada urin alkalis dapat terjadi kekeruhan akibat endapan kalsium fosfat. Urin yang sangat asam akan mengendapkan asam urat yang berwarna kemerahan.

Bau

Urin segar berbau khas, namun dapat berubah akibat pengaruh zat yang diekskresikan dan makanan. Pada keadaan ketosis akan tercium bau aseton yang dikeluarkan oleh urin.

ZAT NORMAL DALAM URIN

Urea

Urea merupakan hasil akhir utama katabolisme protein pada manusia. Ekskresinya berhubungan langsung dengan asupan protein. Dalam keadaan normal akan diekskresikan sekitar 25 gr urea per hari (80 – 90%) dari seluruh senyawa nitrogen yang dikeluarkan lewat urin. Ekskresi urea meningkat pada beberapa keadaan yang disertai peningkatan katabolisme protein seperti demam, diabetes atau peningkatan aktivitas adrenokortikal yang berlebihan. Sekresi urea urin menurun pada penyakit hepar berat dan asidosis.

Amonia

Jumlah amonia dalam urin normal sangat sedikit, dibentuk dan dikeluarkan langsung dari sel tubulus ginjal. Kadar amonia dalam urin menurun pada keadaan asidosis, namun meningkat pada keadaan ketosis dan diabetes mellitus.

Kreatinin

Kreatinin adalah hasil akhir pemecahan keratin. Koefisien kreatinin adalah jumlah milligram kreatinin yang dikeluarkan dalam 24 jam per kilogram berat badan. Pada pria dewasa normal, koefisien kreatinin sekitar 20 – 26 mg/kg bb/hari, sedangkan pada wanita sekitar 14 – 22 mg/kg bb/hari.

Kreatin

Kreatin terdapat dalam urin bayi dan sangat sedikit dalam urin orang dewasa normal. Ekskresi kreatin pada pria sekitar 6% dari total keseluruhan kreatin, sedangkan ekskresi pada wanita lebih bervariasi (2,0 – 2,5 kali daripada pria). Pada keadaan hamil, ekskresi kreatin meningkat. Ekskresi kreatin juga meningkat pada keadaan patologis tertentu seperti kelaparan, kegagalan metabolisme karbohidrat, hipertiroidisme, miopati dan infeksi. Ekskresi kreatin menurun pada kondisi hipotiroidisme.

Asam urat

Asam urat adalah hasil oksidasi purin dalam tubuh, berasal dari nukleo protein sel tubuh. Dalam air kelarutannya sangat kecil, tapi larut dalam garam alkali.

Asam amino

Dalam 24 jam orang dewasa mengeluarkan 15-200 ml gram nitrogen asam amino lewat urin. Pada bayi dikeluarkan 3 mg asam amino/kg berat badan dan ekskresinya turun berangsur-angsur sampai umur 6 bulan.

Allantoin

Allantoin adalah hasil oksidasi asam urat. Pada manusia tidak ditemui allantoin dalam urin.

Klorida

Klorida dikeluarkan bersama Na dalam NaCl. Hampir seluruhnya berasal dari NaCl makanan.

Sulfat

Sulfat dalam urin berasal dari metabolisme protein yang mengandung S, yaitu sistein dan metionin. Ada tiga bentuk sulfat yaitu: Sulfat organik, Sulfat eterial dan Sulfat netral.

Fosfat & Oksalat

Fosfat dalam urin merupakan garam-garam Mg dan Ca. Fosfat akan mengendap pada urin yang alkalis. Oksalat terdapat sangat sedikit dalam urin.

Mineral

Ion Na, K, Cl dan Mg merupakan 4 kation cairan ekstraseluler yang ditemukan dalam urin. Kandungan Na berbeda-beda menurut kebutuhan fisiologis. Kalium urin meningkat jika asupan mineral ini meningkat yaitu pada katabolisme jaringan yang tinggi dan pada alkalosis. Ekskresi Na dan K juga dikendalikan oleh aktivitas korteks adrenal. Kadar Na dan Mg dalam urin relatif rendah, namun dapat berubah pada kondisi tertentu seperti kelainan metabolisme tulang.

Vitamin, hormon dan enzim

Vitamin, hormon dan enzim sangat sedikit ditemukan dalam urin. Adanya senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan untuk membantu mendiagnosa penyakit tertentu dan kehamilan. Amilase dan sakaridase dapat meningkat pada pankreatitis. Hormon *choriogonadotropin* (HCG) terdapat pada urin wanita hamil.

ZAT ABNORMAL DALAM URIN

Protein

Pada keadaan normal, dalam urin sehari tidak lebih dari 200 mg protein yang diekskresi. Bila ekskresinya naik disebut proteinuria. Ini terjadi karena gangguan fungsi ginjal misalnya akibat glomerulonefritis.

Glukosa

Dalam keadaan normal tidak lebih dari 1 gram glukosa diekskresi per hari. Bila diperiksa dengan reaksi benedict hasilnya negatif. Bila kadarnya lebih tinggi disebut glukosuria, misalnya pada penyakit diabetes melitus.

Gula yang lain

- » Fruktosa: adanya fruktosa dalam urin disebut fruktosuria. Fruktosuria biasanya terdapat pada penyakit genetik tertentu.
- » Laktosa: adanya laktosa dalam urin disebut laktosuria.
- » Pentosa: adanya pentosa dalam urin disebut pentosuria

Benda-benda keton

Benda keton adalah asam aceto acetat, beta hidroksi butirat dan aseton. Pada keadaan normal dalam urin terdapat 3-15 gram setiap hari. Pada kelaparan eksresinya meningkat, begitu juga pada gangguan metabolisme karbohidrat, misalnya pada diabetes melitus tidak terkontrol.

Bilirubin dan garam-garam kolat

Adanya bilirubin dan garam-garam kolat dalam urin akibat sumbatan saluran empedu hingga empedu masuk dalam saluran darah dan diekskresi melalui urin.

Darah

Terdapatnya darah dalam urin disebabkan oleh *penyakit-penyakit* tertentu. Keadaan ini disebut hematuria, misalnya pada radang ginjal, atau saluran kencing dibawahnya. Bila eritrosit pecah, hemoglobin akan keluar. Adanya hemoglobin dalam urin disebut hemoglobinuria. Adanya hemoglobin dalam urin dapat dibuktikan dengan tes benzydine.

Indikan

Indikan adalah indosil sulfat, terdapat dalam urin sebagai garam kalium. Obstipasi atau meningkatnya pembusukan (putrefeksi) triptofan dalam protein dapat diubah menjadi indol kemudian diabsorpsi dan dibentuklah indikan yang diekskresi bersama urin.

Porfirin

Porfirin diekskresi oleh orang dewasa kira-kira 60-200 mikrogram per hari. Bila ekskresi naik disebut porfiria.

PENGUMPULAN SAMPEL URIN

Pengumpulan dan pengawetan urin yang benar penting untuk hasil laboratorium yang tepat waktu dan valid.

Jenis sampel urin

Terdapat 3 jenis sampel urin yang umum dimintakan untuk diperiksa di laboratorium, yaitu:

1. Urin pagi hari (*Mid-stream first morning specimen*)
Spesimen pilihan untuk urinalisis dan mikroskopis karena mengandung jumlah analit yang terkonsentrasi di kandung kemih selama pengumpulan semalaman. Pasien diminta untuk membuang bagian awal urin pertama yang dikeluarkan di pagi hari dan kemudian mengumpulkan 15-20 ml urin dalam gelas atau wadah plastik bersih. Sampel urin harus segera dianalisis atau disimpan di lemari es jika analisis ditunda satu atau dua hari. Urin pagi hari dan sewaktu biasanya untuk uji skrining rutin.
2. Urin sewaktu (*random specimen*)
Sampel yang paling umum diperoleh (meskipun bukan sampel pilihan) untuk analisis biokimia dan mikroskopis. Sampel ini dapat dikumpulkan kapan saja di tempat atau tidak ditentukan waktunya, oleh karena itu, selalu tersedia dan mudah diperoleh. Sample ini biasanya digunakan untuk pemeriksaan rutin, glukosa, badan keton, pigmen empedu dan darah, dll.
3. Urin tampung 24 jam
Pengumpulan urin 24 jam diperlukan untuk menghitung kreatinin urin, nitrogen urea, kalsium, protein, glukosa, natrium dan kalium dan hormon tertentu seperti katekolamin, 17-hidroksisteroid, dll. Urin tampung 24 jam biasanya untuk uji klirens.

Teknik pengumpulan urin

Ada beberapa cara untuk mengumpulkan urin, termasuk midstream, kate-terisasi, dan aspirasi suprapubik.

1. Sampel urin porsi tengah biasanya dilakukan untuk urinalisis rutin dan kultur bakteri.

2. Kateterisasi berarti memasukkan kateter melalui uretra kandung kemih merupakan metode standar untuk pengujian kultur bakteri.
3. Pengumpulan urin dengan aspirasi suprapubik adalah pengumpulan urin langsung dari kandung kemih dengan menusuk dinding perut dan kandung kemih yang penuh dengan jarum suntik. Urin yang diperoleh bersifat steril dan biasanya digunakan untuk uji kultur bakteri, terutama bakteri anaerob.
4. Untuk urin tampung 24 jam mulai pengumpulan pada pukul 6 pagi. Biarkan pasien mengosongkan kandung kemih dan membuang sampel pertama. Dari sampel kedua dan seterusnya, kumpulkan ke dalam wadah (memiliki pengawet). Semua sampel urin diawetkan hingga keesokan paginya sampel jam 6 pagi, yang seharusnya menjadi sampel terakhir yang dikumpulkan.

Pengawet urin

Pengawet urin digunakan apabila urine tidak segera diperiksa (batas waktu dalam waktu 2 jam setelah pengumpulan urine). Spesimen yang tidak diawetkan selama lebih dari 2 jam atau disimpan di kulkas untuk waktu yang lama tidak cocok untuk analisis karena potensi pertumbuhan bakteri yang berlebihan dan jumlah koloni bakteri bisa invalid atau kesalahan dalam urinalisis kimia.

Beberapa pengawet urin yang biasa digunakan:

1. Pengawet yang umum digunakan untuk pengumpulan urin 24 jam adalah 50 ml HCl 2 N atau 10 ml per konsentrasi HCl per pengumpulan 24 jam;
2. Kristal timol – 5 ml 100 gram/L larutan isopropanol. Timol mampu mempertahankan kadar glukosa dan sedimen tetapi mengganggu pemeriksaan presipitasi asam untuk protein.
3. Beberapa tetes formalin dalam 30 ml urin. Formalin mampu mempertahankan sedimen dengan baik tetapi mengganggu pemeriksaan kimia seperti glukosa, darah, leukosit esterase.
4. 50% asam asetat dan 6 N HNO₃
5. Asam boraks, toluene, Na₂CO₃. Toluene tidak mengganggu pemeriksaan rutin tetapi mengapung pada permukaan sampel

Wadah atau botol penampung urin

Wadah atau botol penampung urin harus bersih, kering, bebas bocor, terbuat dari bahan transparan, dan memiliki tutup ulir. Pilih wadah bermulut lebar dengan diameter sekitar 4 sampai 5 cm. Untuk wadah penyimpanan urin 24 jam dapat digunakan wadah plastik buram/tidak transparan dengan kapasitas \pm 3000 ml.

PEMERIKSAAN FISIK URIN

Volume urin

Volume urin normal pada orang dewasa adalah sekitar 1000 hingga 2500 ml/hari. Jumlah ini tergantung pada jumlah asupan cairan dan jumlah yang hilang melalui kulit, paru-paru dan usus, demam, cuaca atau konsumsi obat-obatan. Volume urin dipengaruhi oleh asupan cairan, zat terlarut yang diekskresikan (natrium, urea, dll.), kehilangan cairan melalui keringat dan pernapasan, serta status kardiovaskuler dan ginjal.

Warna urin

Warna urin sangat ditentukan oleh tingkat konsentrasinya. Urin normal bisa tidak berwarna sampai berwarna kuning muda karena adanya urokrom.

Bau urin

Biasanya bau urin agak aromatik atau disebut sebagai urinoid. Pada dekomposisi urea setelah dibiarkan/disimpan beberapa jam, bau amoniak yang sangat tidak menyenangkan akan muncul. Makanan minuman (misalnya jengkol dan petai) dan obat-obatan (mentol) dapat memberikan bau tertentu pada urin.

Kejernihan urin

1. Urin normal akan tampak jernih.
2. Biasanya urin yang baru dikeluarkan berwarna bening dan transparan, tetapi bisa menjadi keruh jika terpapar dalam waktu lama karena penguraian urea oleh bakteri yang mengubahnya menjadi amonium karbonat.

3. Ekskresi fosfat dalam urin basa juga membuat urin keruh.
4. Adanya sel darah putih, sel darah merah, atau sel epitel membuat urin keruh.
5. Gumpalan lemak membuat urin tampak seperti susu.

Derajat keasaman (pH) Urin

Nilai pH normal urin adalah 4,5-7,5. Biasanya urin yang baru dikeluarkan bersifat asam. pH urin dapat diperiksa dengan kertas lakmus atau *dipstick*. Nilai pH ekstrim menunjukkan kesalahan dalam pengumpulan urin.

Urin asam:

- » Diet tinggi protein
- » Kelaparan
- » Dehidrasi dan diare
- » Ketoasidosis diabetik
- » Asidosis metabolik/respiratorik

Urin basa:

- » Diet kaya sayuran dan buah-buahan
- » Diet rendah karbohidrat
- » Muntah
- » Asidosis tubular renal
- » Asidosis metabolik/respiratorik
- » Ammonia akibat penguraian bakteri
- » Gagal ginjal kronis

PRAKTIKUM BIOKIMIA URIN NORMAL

Tujuan Praktikum:

1. Untuk mengetahui volume, warna, bau dan keasaman atau reaksi, dan berat jenis urin
2. Untuk melakukan tes untuk menunjukkan hasil metabolisme normal dalam urin
3. Untuk melakukan tes untuk menunjukkan zat-zat abnormal atau patologis dalam urin

PEMERIKSAAN SIFAT URIN

Perhatikan dan catat semua hal di bawah ini:

Volume urin 24 jam (dalam ml)

Urin hari pertama dibuang pada waktu yang telah ditentukan (sekitar pukul 6 pagi). Semua urin sesudah waktu itu sampai waktu yang sama pada hari berikutnya dikumpulkan. Seluruh urin harus disimpan dalam keadaan dingin dengan toluene sebagai bahan pengawet. Pada hari yang telah ditentukan, urin tersebut dibawa ke laboratorium Biokimia untuk diperiksa. Volume urin normal 600 – 2500 ml. Oliguria adalah penurunan output urin, sedangkan kondisi output urin meningkat disebut poliuria.

Warna, bau dan kejernihan urin

Warna normal urin bervariasi dari bening sampai kuning terang. Warna urin ditentukan oleh urokrom dan urobilin. Intensitas warna urin bervariasi, urin encer berwarna kuning pucat sedangkan urin pekat berwarna kuning gelap. Perubahan warna urin dapat ditemukan pada beberapa kondisi medis seperti: icterus (warna kuning kecoklatan); merah (adanya darah) atau hitam (alkaptonuria dan melanuria).

Bau urin normal khas ammonia, namun jika mengandung badan keton berbau seperti buah. Bau buah–Ketoasidosis karena aseton; Bau busuk–Infeksi bakteri; Bau seperti tikus (*mousy*)–Fenilketonuria.

Warna	Metabolit	Kondisi klinis
Merah	Sel darah merah Hemoglobin	Hematuria Hemoglobinuria
Merah kecoklatan	Myoglobin porfirin	Myoglobinuria Porfirinuria Kontaminasi darah haid
Kuning	Urokrom	Normal
Kuning jingga	Urobilin	Dehidrasi Ikterus
Kuning kehijauan	Bilirubin Biliverdin	Ikterus
Coklat kehitaman	Asam hemogentisik Methemoglobin profirin	Alkaptonuria
Putih susu	<i>Chyle</i> (lemak)	Kiluria

Nilai pH urin

Dengan menguji reaksinya terhadap lakmus, kertas nitrazin atau kertas indikator universal. pH normal 6 (4,7 – 8) untuk urin 24 jam tergantung asupan diet dan aktivitas metabolik. Urin cenderung asam karena adanya sulfat, fosfat, klorida dan asam organik volatile lainnya. Diet vegetarian membuat pH urin menjadi basa. Urin yang disimpan lama juga basa karena terbentuknya ammonia akibat dekomposisi urea.



Gambar V.1 Indikator pH

Alat dan bahan:

1. Kertas lakmus
2. Rak tabung reaksi
3. Tabung reaksi
4. Urin segar

Prosedur Pemeriksaan pH Urin

1. Masukkan urin sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi
2. Celupkan kertas lakmus ke dalam urin selama 3-5 detik
3. Cocokkan perubahan warna kertas indikator dengan kertas standar warna pH
4. Catat hasil pengamatan anda

Pemeriksaan Berat Jenis Urin (BJ Urin)

Berat jenis urin adalah parameter untuk konsentrasi zat padat dalam urin yang mengindikasikan kemampuan ginjal untuk memekatkan urin.

Pemeriksaan BJ bertujuan untuk:

1. Menilai fungsi ginjal dan menentukan apakah ginjal mampu memekatkan atau mengencerkan urin dengan baik
2. Evaluasi dehidrasi dan overhidrasi
3. Diagnosis dan pemantauan kondisi medis seperti diabetes, penyakit ginjal, kelainan kelenjar adrenal
4. Untuk memantau keseimbangan air dan elektrolit pada pasien kritis
5. Untuk memeriksa penyalahgunaan obat dan kepatuhan minum obat

Terdapat 4 metode untuk pengukuran BJ urin: (1) Refractometer: alat yang biasa digunakan untuk mengukur kadar/ konsentrasi bahan atau zat terlarut dengan bantuan indeks bias atau refraksi; (2) Urinometer; (3) *Dipstick*; (4) *Automated analyzers*.

1. Pemeriksaan BJ Urin Dengan Refraktometer

Pemeriksaan berat jenis urine menggunakan metode refraktometri memiliki kelebihan yaitu dapat menggunakan volume urine yang lebih sedikit. Kekurangan menggunakan metode refraktometri yaitu tidak dapat digunakan apabila cahaya pada ruangan kurang karena akan mempengaruhi hasil. Pemeriksaan dengan refraktometer sering dilakukan di laboratorium yang lebih lengkap.

2. Pemeriksaan BJ Urin Dengan Hidrometer

- » Uji lebih dahulu ketelitian hidrometer yang akan digunakan terhadap air suling. Bila kesalahan tidak terlalu besar, maka dapat dilakukan koreksi. Perlu diperhatikan bahwa semua toluene harus dibuang.
- » Urinometer termasuk hidrometer adalah suatu alat untuk mengukur berat jenis larutan. Alat ini mengapung dalam air murni, semakin bertambah BJ, alat ini semakin mengapung. Pada air murni, ditetapkan skala pada garis 0.
- » Suhu akan mempengaruhi skala alat karena pemuaian. Suhu pemakaian alat harus sama dengan suhu waktu skala tersebut dikalibrasi

oleh pabrik pembuat alat. Oleh sebab itu, jika suhu pemakaian tidak sama dengan suhu tera, maka hasil harus dikoreksi.

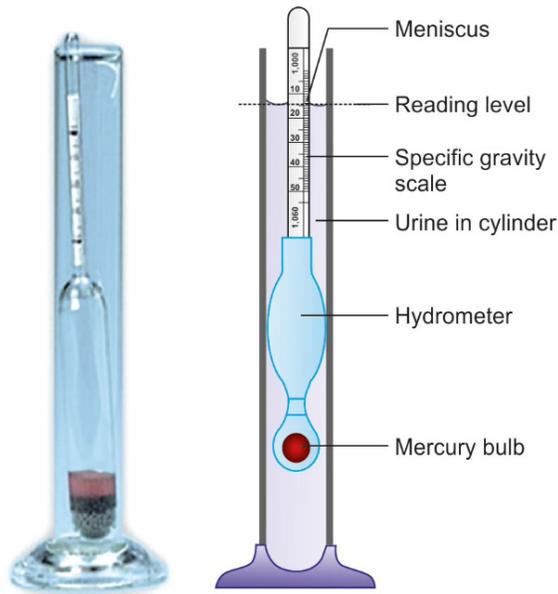
- » Untuk suhu cairan yang terukur dengan termometer lebih tinggi dari suhu tera alat, BJ cairan yang terbaca pada alat harus ditambah. Sebaliknya, jika suhu pemakaian alat dibawah suhu tera alat maka BJ harus dikurangi.
- » Setiap perubahan suhu 3°C, BJ berubah 0,001.

Prosedur Kerja:

- a. Isi sebuah tabung hidrometer dengan urin dan letakkan hidrometer didalamnya.
- b. Hidrometer tidak boleh menyentuh dinding tabung.
- c. Perhatikan meniskus skala berat jenis yang terbaca di urinometer.
- d. Catat suhu urin tersebut, tiap urinometer sudah ditera pada suhu tertentu.
- e. Rumus BJ = BJ terbaca ± Angka Koreksi

Cara pengukuran BJ urin

- a. Tuang urin (suhu kamar) ke dalam gelas urinometer.
- b. Masukkan urinometer ke dalam gelas tersebut.
- c. Sebelum membaca angka pada urinometer tersebut, urinometer harus lepas dari dinding gelas dan untuk melepaskannya putarlah urinometer dengan menggunakan ibu jari dan telunjuk.
- d. Setelah diputar maka urinometer akan terapung di tengah gelas dan bacalah berat jenis setinggi meniskus bawah.



Gambar V.2 Pemeriksaan BJ Urin Menggunakan Urinometer

Contoh Perhitungan BJ Urin:

- » Suhu tera alat adalah 15 °C (berarti skala berlaku pada suhu pemakaian 15 °C)
- » Suhu urin terukur adalah 27 °C, BJ terbaca 1,020
- » Angka koreksi = $(27\text{ °C} - 15\text{ °C})/3 \times 0,001 = 0,004$
- » BJ urin yang diukur pada suhu 15 °C adalah $1,020 + 0,004 = 1,024$

Tabel V.1 Kondisi Penyebab BJ Rendah dan Tinggi

BJ Urin Rendah	BJ Urin Tinggi
Diabetes Insipidus	Dehidrasi berat/kurang minum
Poliuria (Bukan DM),	Diabetes mellitus
Banyak minum (Overhidrasi)	Proteinuria/diet tinggi protein
Konsumsi obat diuretik	Insufisiensi adrenal
Hipotermia	Nefritis kronis
Diet rendah protein	
Penyakit ginjal kronis	

Pada penyakit ginjal berat (gagal ginjal kronis) urin diproduksi dengan berat jenis tetap yang identik dengan filtrat glomerulus, sekitar 1,010. Oleh karena itu, BJ spesifik ditetapkan 1,010 untuk indikasi gagal ginjal kronis (CRF).

3. Penentuan Jumlah Zat Padat Total

Kalikan angka kedua terakhir dari BJ urin dengan 2,66 (Koefisien Long). Hasilnya menyatakan secara kasar jumlah zat padat total dalam 1 Liter urin (gram) sehingga dapat diperhitungkan jumlah zat padat total dalam urin 24 jam. Normal perkiraan zat padat total sekitar 50 gram.



PEMERIKSAAN BIOKIMIA URIN

Uji Reduksi Benedict (Semi kuantitatif)

Prinsip:

Proses reduksi ion cupri (Cu^{2+}) menjadi ion Cupro (Cu) oleh karbohidrat yang memiliki gugus aldehid dan keton bebas dan dengan pemanasan akan terbentuk endapan Cu_2O berwarna merah bata.

Tujuan:

Melihat ada tidaknya karbohidrat atau zat yang bisa mereduksi Benedict dalam urin.

Alat dan Bahan:

- » Urin
- » Tabung reaksi
- » Pipet tetes
- » Pipet ukur
- » Water Bath
- » Larutan Benedict

Metode:

- Campurkan 2,5 mL pereaksi Benedict dengan 4 tetes urin
- Panaskan selama 3-5 menit dalam waterbath atau dididihkan di atas api kecil selama 1 menit
- Biarkan menjadi dingin, perhatikan hasil yang didapatkan (perubahan warna dan endapan)

Tabel 1 Interpretasi hasil uji Benedict

Warna	Penilaian	% gula pereduksi
Biru/hijau keruh	(-)	-
Hijau/kuning hijau	+	<0,5
Kuning	++	0,5-1
Jingga (oranye)	+++	1-2
Merah	++++	>2

Sensitivitas tes Benedict sekitar 0.1-0.15 gm% larutan gula sugar. Monosakarida pereduksi, glukosa, fruktosa, galaktosa dan manosa akan bereaksi positif terhadap uji Benedict. Harus diingat bahwa uji Benedict juga positif terhadap asap askorbat, asam homogentisic, dan zat pereduksi lain dalam urin. Sehingga uji Benedict positif tidak selalu menunjukkan bahwa seseorang itu mengalami diabetes.

Presipitasi Protein Urin Dengan Pemanasan

Prinsip:

Protein/albumin jika dipanaskan akan mengalami presipitasi (pengendapan) oleh asam asetat. Asam asetat encer akan melarutkan presipitat selain protein.

Gangguan pada struktur sekunder, tersier, kuartener dari protein yang dipertahankan oleh gaya non-kovalen (ikatan hidrogen, interaksi ionik, interaksi van der waals, interaksi hidrofobik) menyebabkan denaturasi.

Agregasi protein yang terdenaturasi disebut koagulum. Denaturasi mungkin dapat reversibel dalam beberapa kasus (tidak selalu), tetapi koagulasi bersifat irreversibel. Penambahan asam asetat menurunkan

pH medium menuju pH isoelektrik (pI) dari albumin (IEP dari protein: Albumin manusia 4,7; albumin telur 4,9; globulin manusia 6,4; kasein 4,6). Pada pI, protein paling tidak larut. Sehingga protein terdenaturasi akan diendapkan setelah penambahan asam asetat.

Tujuan: Melihat ada tidaknya endapan dalam urin akibat pemanasan.

Alat dan Bahan

- » Tabung reaksi
- » Pipet tetes
- » Pipet ukur
- » Water Bath
- » Urin
- » Asam asetat encer

Metode

- a. 5 mL urin dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- b. Panaskan dalam waterbath mendidih selama ± 5 menit
- c. Tambahkan asam asetat encer tetes demi tetes (± 5 tetes)
- d. Perhatikan endapan yang terbentuk apakah hilang atau bertambah banyak setelah penambahan asam asetat encer.

Observasi

Endapan putih yang terbentuk semakin banyak dengan penambahan asam asetat.

Interpretasi

Kekeruhan putih jika menghilang pada penambahan asam asetat menunjukkan adanya fosfat atau karbonat. Jika kekeruhan putih yang terbentuk tetap ada atau muncul atau meningkat pada penambahan asam asetat menunjukkan adanya albumin/protein. Penambahan asetat meningkatkan pembentukan kekeruhan karena pengasaman membawa pH medium ke arah 4,7 (IEP albumin).

Ketika protein dipanaskan, sifat fisik, kimia, dan biologisnya berubah karena putusannya ikatan tertentu dan perubahan yang dihasilkan

dalam konformasi molekul-molekulnya. Proses ini dikenal sebagai denaturasi. Namun, ketika protein yang dapat digumpalkan seperti albumin dan globulin dipanaskan pada pH isoelektriknya, serangkaian perubahan terjadi yang melibatkan disosiasi subunit protein (gangguan struktur kuarterner), pelepasan polipeptida rantai (gangguan struktur tersier dan sekunder) dan anyaman bersama dari rantai polipeptida yang tidak digulung (koagulasi). Sementara protein yang terdenaturasi dapat dikembalikan ke struktur dan fungsi aslinya dengan manipulasi tertentu, koagulasi adalah proses yang tidak dapat diubah.

Pemeriksaan badan keton

Prosedur:

- Campurkan 5 ml urin dengan kristal amonium sulfat dan tambahkan 2 tetes larutan natrium nitroprusside 2% yang baru disiapkan atau sedikit bubuk natrium nitroprusside
- Kocok dengan baik.
- Tambahkan 1 ml amonia cair melalui sisi tabung reaksi.

Observasi: cincin ungu kemerahan di persimpangan dua cairan

Prinsip: Aseton dan asam asetoasetat bereaksi dengan natrium nitroprusside (nitroferri cyanide) dengan adanya alkali untuk menghasilkan warna ungu.

Kesimpulan: Benda keton (aseton) termasuk aseton, asam asetoasetat, dan asam β -hidroksi butirat. Untuk mendeteksi yang terakhir, tes yang dimodifikasi harus dilakukan. (oksidasi asam β -hidroksibutirat dengan hidrogen peroksida untuk membentuk asam asetoasetat. Tambahkan beberapa tetes asam asetat ke dalam 2 ml urin yang diencerkan 1:1 dengan air suling. Rebus selama beberapa menit untuk membuang aseton dan asam asetat yang ada dalam urin. Kemudian tambahkan 1 ml hidrogen peroksida hangat secara perlahan dan lakukan tes Rothera. Tes ini akan memberikan respons positif jika terdapat asam β -hidroksibutirat dalam urin). Urin normal mengandung sekitar 20 mg per 24 jam saja. Badan keton diproduksi secara berlebihan di

dalam tubuh pada saat kelaparan dan pada diabetes melitus yang tidak terkontrol dan kelaparan.

Pemeriksaan darah dalam urin (Uji benzydine)

Prosedur:

- a. Masukkan 2-3 ml urin dalam tabung reaksi.
- b. Rebus selama 5 menit dan dinginkan.
- c. Campurkan larutan benzydine dengan volume yang sama (2-3 ml) dan hidrogen peroksida ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan spesimen urin yang sudah didinginkan ke dalam campuran reagen.

Pengamatan: Muncul warna biru sementara.

Kesimpulan dan Prinsip: Aktivitas peroksidase heme mengoksidasi hidrogen peroksida untuk melepaskan oksigen yang baru lahir yang bekerja pada benzydine untuk membentuk senyawa berwarna biru.

Interpretasi: Adanya darah dalam urin menunjukkan hematuria (eritrosit utuh dalam urin yang terlihat pada penyakit ginjal) atau hemoglobinuria (Hb dalam urin).

Pemeriksaan Garam Empedu (*Hay's test*)

Prinsip: Garam empedu mengurangi tegangan permukaan sehingga, bubuk belerang tenggelam ke dasar.

Prosedur: masukkan 5 ml air seni dalam tabung reaksi dan taburkan bubuk belerang pada permukaan urin

Pengamatan: Serbuk belerang tenggelam ke dasar.

Kesimpulan: Garam empedu terdapat dalam urin, jika tidak, bubuk belerang akan tetap berada di permukaan kolom urin

Interpretasi: Garam asam taurocholic dan asam glycocholic yang ada dalam empedu dimuntahkan kembali ke dalam darah setiap kali terjadi penyumbatan aliran empedu (ikterus obstruktif) dan akan muncul dalam urin. Tes ini berguna untuk membedakan ikterus obstruktif dari ikterus hemolitik. Ikterus obstruktif terlihat pada atresia bilier,

penyumbatan saluran empedu akibat batu atau tumor dan fase obstruktif ikterus hati.

Pemeriksaan Pigmen empedu (*Modified Fouchet's Test*)

Prosedur:

- a. Masukkan 10 ml urin ke dalam tabung reaksi, tambahkan 1 ml $MgSO_4$ dan didihkan.
- b. Sambil mendidih tambahkan 10% $BaCl_2$ setetes demi setetes sampai endapan maksimum diperoleh.
- c. Saring dan buang filtratnya. Ambil kertas saring dari corong dan keringkan dengan mengepelnya di atas kertas lain.
- d. Setelah kering tambahkan 2 tetes pereaksi Fouchet ke endapan.

Pengamatan: Warna biru/hijau menunjukkan adanya pigmen empedu.

Prinsip: Endapan yang diperoleh adalah endapan $BaSO_4$ yang mana pigmen empedu jika ada akan teradsorpsi padanya. Ketika pereaksi Fouchet ke endapan (Ferric chloride dalam asam Trikloroasetat) ditambahkan, $FeCl_3$ mengoksidasi bilirubin menjadi biliverdin dan Fe^{3+} (ion besi) diubah menjadi Fe^{2+} (ion besi). Hal ini memberikan warna.

Interpretasi: Tes Fouchet positif menunjukkan adanya bilirubin terkonjugasi dalam urin (Hanya bilirubin terkonjugasi yang dapat muncul dalam urin pada orang dengan ginjal normal). Bilirubin terkonjugasi muncul dalam urin pada kasus ikterus obstruktif dan fase obstruktif ikterus hepatoseluler. Jadi, tes ini berguna untuk membedakan ikterus obstruktif dari ikterus hemolitik yang hasilnya negatif atau positif lemah.

Pemeriksaan Urobilinogen (*Ehrlich's Test*)

Prosedur:

Ambil 10 ml urin segar. Tambahkan 1 ml reagen Ehrlich (2% Para dimethylaminobenzaldehyde dalam 20% HCl). Kocok dengan baik dan simpan di rak selama 5 menit untuk pengembangan warna.

Pengamatan: Urine normal hanya memberikan warna merah samar.

Prinsip: Urobilinogen membentuk aditif berwarna dengan Para dimetil amino benzaldehyde

Interpretasi: Intensitas warna merah berhubungan dengan konsentrasi urobilinogen dalam dengan cara berikut:

- » Tidak ada warna merah: Urobilinogen tidak ada.
- » Warna merah muda samar: Urobilinogen ada dalam jumlah normal.
- » Warna merah yang jelas: Urobilinogen hadir dalam jumlah yang meningkat.



PEMERIKSAAN KOLESTEROL SERUM

TUJUAN PRAKTIKUM

Setelah melakukan praktikum tersebut mahasiswa dapat:

1. Memahami metode pemeriksaan kolesterol
2. Dapat menjelaskan tentang biokimia kolesterol
3. Dapat menjelaskan kelainan-kelainan berkaitan dengan kolesterol

PENDAHULUAN

Profil lipid adalah gambaran lipid- lipid didalam darah. Profil lipid biasanya memeriksa kadar kolesterol total, trigliserida, HDL dan LDL di dalam darah. Di dalam plasma, terdapat beberapa jenis lipid yang utama yaitu kolesterol, trigliserida, fosfolipid dan asam lemak bebas. Lipid- lipid tersebut tidak larut dalam plasma. Agar lipid dapat diangkut dalam sirkulasi, maka susunan molekul lipid harus dimodifikasi, yaitu dalam bentuk lipoprotein yang bersifat larut dalam air. Lipoprotein terdiri dari kolesterol ester dan trigliserida yang mengisi inti dan dikelilingi oleh fosfolipid, kolesterol non

ester dan apolipoprotein. Lipoprotein ini bertugas mengangkut lipid dari tempat sintesisnya ke tempat penggunaannya.

Lipoprotein dapat dibagi ke dalam lima kategori utama, tergantung pada komposisinya. Pengelompokan dimulai dari ukuran yang paling besar dengan densitas yang kecil hingga ke ukuran yang terkecil dengan densitas yang besar yaitu kilomikron, *Very Low Density Lipoprotein (VLDL)*, *Intermediate-Density Lipoprotein (IDL)*, *Low-Density Lipoprotein (LDL)*, dan *High Density Lipoprotein (HDL)*.

Partikel yang lebih besar dan lebih ringan terutama memiliki inti kaya trigliserida, sedangkan partikel yang lebih kecil dan lebih padat memiliki inti kolesterol ester. Kadar kolesterol total, kolesterol HDL dan trigliserida diukur menggunakan metode CHOD-PAP, Direct dan GPO-PAP dengan 2 kali frekuensi pengumpulan. Sampel yang digunakan adalah plasma subyek sedangkan reagen yang digunakan merupakan reagen merek Human® berupa *cholesterol complete test kit*.

Sampel: serum, heparin plasma, atau EDTA plasma

Stabilitas sampel: 7 hari pada suhu 20-25°C, 7 hari pada suhu 4-8°C, 3 bulan pada suhu -20°C.

Alat:

- » Sentrifus
- » Spektrofotometer
- » Vorteks
- » Tabung endof 1,5 ml
- » Tabung reaksi 1x12 cm
- » *Yellow* tip dan *blue* tip
- » Rak tabung reaksi
- » Mikropipet
- » Pipet
- » Kuvet
- » Bahan:
- » Serum dari darah segar 5 ml
- » Reagen kolesterol HD

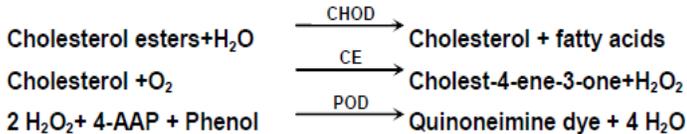
- » Reagen kolesterol dan Reagen standar
- » Reagen kolesterol LDL
- » Reagen trigliserida
- » Aqua bidestilata

PEMERIKSAAN KADAR KOLESTEROL

Metode: “CHOD-PAP”, tes fotometrik enzimatik

Prinsip: penentuan kolesterol setelah hidrolisis enzimatik dan oksidasi. Indikator kalorimetrik yaitu quinoneimine yang dibentuk dari 4-aminoantipirin dan fenol oleh hidrogen peroksida yang dikatalisis enzim peroksidase (*Trinder's reaction*).

- » Reaksinya sebagai berikut:



Reagen:

- » Buffer (pH 6,7) 50mmol/L
- » Fenol 5mmol/L
- » 4-aminoantipirin 0,3mmol/L
- » *Cholesterol esterase* (CHE) $\geq 200\text{U/L}$
- » *Cholesterol oxidase* (CHO) $\geq 50\text{U/L}$
- » Peroksidase (POD) $\geq 3 \text{ kU/L}$
- » Standar 200mg/dl (5,2mmol/L)

Cara Kerja:

- a. Siapkan tiga buah tabung dan isi masing-masing tabung dengan komponen seperti pada tabel di bawah ini:

Komponen	Blanko	Sampel	Standar
Sampel/standar	-	10 μL	10 μL
Aquabides	10 μL	-	-
Reagen	1000 μL	1000 μL	1000 μL

- b. Vortex selama 10 detik
- c. Inkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25°C
- d. Baca absorbansi dalam waktu 60 menit dan bandingkan dengan blanko

Tabel VII.1 Kadar Profil Lipid

Klasifikasi Kadar Kolesterol Total, Kolesterol HDL dan Kolesterol LDL (mg/dL)	
Kolesterol Total	
< 200	Diharapkan
200 – 239	<i>Borderline High</i>
≥ 240	Tinggi
Kolesterol HDL	
< 40	Rendah
≥ 60	Tinggi
Kolesterol LDL	
<100	Optimal
100-129	Mendekati optimal/diatas optimal
130-159	<i>Borderline High</i>
160-189	Tinggi
Trigliserida	
< 200 (puasa)	Diharapkan
200 – 400	<i>Borderline High</i>
> 400	Tinggi



PENENTUAN KADAR GLUKOSA DARAH DENGAN METODE GOD-PAP

TUJUAN PRAKTIKUM

Setelah melakukan praktikum tersebut mahasiswa dapat:

1. Memahami metode analisis kadar glukosa metode GOD-PAP
2. Dapat menjelaskan metabolisme glukosa dalam tubuh
3. Dapat menjelaskan kelainan-kelainan metabolisme glukosa

Prinsip dasar:

Oksidasi glukosa oleh enzim glukose oksidase akan menghasilkan asam glukoronat dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan fenol dengan katalisator peroksidase akan menghasilkan quinoneimin yang intensitas warnanya dapat diukur. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi glukosa dan diukur pada panjang gelombang 480 dan 520 nm.

Komponen dan konsentrasi pereaksi:

- | | |
|------------------------------|-----------|
| 1. Bufer fosfat pH 7 | 2000 mM |
| 2. GOD (glukosa oksidase) | 15000 U/l |
| 3. POD (peroksidase) | 500 U/l |
| 4. 4-AAP (4-aminoantipirin) | 1 mM |
| 5. Fenol | 10 mM |
| 6. Surfaktan | |
| 7. Standar (larutan glukosa) | 100 mg/dL |

Cara kerja:

1. Disiapkan 3 tabung untuk standar, blanko dan sampel yang berisi 20 μ L larutan standar, 20 μ L akuades dan 20 μ L sampel. Masing-masing ditambahkan reagen sebanyak 2000 μ L.
2. Larutan dalam masing-masing tabung dicampur dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit.
3. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometry dengan panjang gelombang (λ) 510 nm (500-520 nm) dalam waktu kurang dari 60 menit.
4. Kadar glukosa dihitung dengan rumus:

$$\text{Glukosa} = \frac{\text{Abs.sampel} - \text{Abs. blanko} \times \text{konsentrasi standar}}{\text{Abs. standar} - \text{Abs. blanko}}$$

Daftar Pustaka

- Benedict test. [Internet]. 2022. Available from: <https://byjus.com/chemistry/benedicts-test/>
- Devlin Thomas. 2006. *Structure of Macromolecules*. Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. Sixth Edition. Wiley-Liss. Canada: 9-11.
- Division of Occupational Health and Safety. 2024. *Safe Laboratory Practices & Procedures*. National Institute of Health. https://ors.od.nih.gov/sr/dohs/safety/laboratory/Pages/student_goodlab.aspx
- Fehling test. [Internet]. 2024. Available from: <https://byjus.com/chemistry/fehling-test/>
- Gandasoebrata, R. 2013. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Geetha, D. (2011). *Practical Biochemistry (1st ed.)*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- Koolman J, Roehm KH. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. Second Edition. Thieme Stuttgart. New York.
- Mohanty, S., & Varma, A. B. 2013. *Practical Clinical Biochemistry (1st ed.)*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- Molisch Test. [Internet]. 2022. Available from: <https://byjus.com/chemistry/molischs-test/>

- Poonam, A. 2020. Practical Biochemistry with Clinical Correlation for MBBS Students. CBS Publishers And Distributor PVT LTD.
- Rodwell. 2012. *Harper;s Illustrated Biochemistry*. Twenty-Ninth Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. United State of America.
- Vasudevan, D., & Das, S. K. 2013. Practical Textbook of Biochemistry for Medical Students (2nd ed.). Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.

Buku Ajar

PRAKTIKUM BIOKIMIA KEDOKTERAN



Tujuan dari penulisan buku ajar ini adalah untuk membantu para mahasiswa di dalam memahami prinsip dasar dalam melakukan praktikum biokimia. Buku ajar praktikum terutama biokimia masih sedikit sehingga mahasiswa banyak mengambil rujukan dari artikel online atau blog sejenis menyusun laporan praktikum atau untuk belajar untuk menghadapi ujian praktikum.

Buku ajar ini diperuntukkan bagi mahasiswa kedokteran Prodi Kedokteran Fakultas Kedokteran UNIMAL untuk menunjang pembelajaran dalam mata kuliah Blok terkait. Namun, penulis juga menargetkan mahasiswa kesehatan dan analis kesehatan yang membutuhkan referensi tentang praktikum biokimia. Buku ajar ini berisikan pengantar tentang praktikum biokimia kedokteran. Dimulai prinsip dasar laboratorium, pemeriksaan karbohidrat, protein dan urin dijelaskan dengan komprehensif dalam buku ajar ini.

Untuk memudahkan pemahaman mengenai isi buku ajar yang ditulis, bahasa yang digunakan lebih mudah dimengerti dan diperjelas dengan prinsip, prosedur kerja dan gambar dari literatur yang sudah tersedia. Uraian tentang substansi buku ajar ini diperoleh dari berbagai literatur dan textbook praktikum biokimia.

Walaupun demikian, penulis menyadari mungkin masih banyak terdapat kekurangan sehingga saran dan koreksi masih sangat dibutuhkan untuk meningkatkan kualitas buku ajar ini dalam mentransfer pengetahuan praktikal kepada mahasiswa. Semoga buku ajar ini bermanfaat bagi para mahasiswa yang kuliah di Fakultas Kedokteran UNIMAL ataupun bidang kesehatan lainnya.

