



**PROGRAM STUDI KIMIA
UNIVERSITAS MA CHUNG**

Villa Puncak Tidar N-01, Malang 65151, Jawa Timur

**Modul
Praktikum Biokimia
SKI 3103**

NAMA :
NIM :
Jadwal Praktikum: <ul style="list-style-type: none">• Ruang Laboratorium MRCP.• Semester 5 dengan jumlah 2/3 (sks/js).• Harus datang 5 menit di laboratorium sebelum jam mulai – kalau tidak maka tidak diperkenankan masuk.• Prasarat: lulus Kimia Organik 3 dan Praktikum Analisis Instrumentasi 2.
Siang 14:40 – 16:20
<ul style="list-style-type: none">• Absensi dan Diskusi• Sesi Eksperimen• Sesi Penutup

Tim Penyusun Modul dan Pengampu Mata Kuliah:

1. Tatas H.P. Brotosudarmo, S.Si., Dipl.Chem., Ph.D.
2. Heriyanto, S.Si., M.Si., M.Sc.
3. Monika Nur Utami Prihastyanti, M.Si., M.Nat.Sc.

LEMBAR PENGESAHAN

No. Dokumen : 003
Revisi : -
Mata Kuliah Praktikum : Praktikum Biokimia
Kode Mata Kuliah Praktikum : SKI3103
SKS : 2
Program Studi : Kimia
Semester : 5 (lima)

Tim Penyusun:

Tatas H.P. Brotosudarmo, Dipl.Chem., Ph.D
Heriyanto, S.Si., M.Si., M.Sc
Monika Nur Utami Prihastyanti, M.Si., M.Nat.Sc.

Malang, 1 Agustus 2016



Menyetujui,
Ketua Program Studi Kimia

Dr. Yuniati, ST, MT
20140008



Mengesahkan,
Dean Fakultas Sains dan Teknologi

Rudy Setiawan, S.Si., MT
20080042

Daftar isi

Lembar Pengesahan.....	i
Daftar isi	ii
Kata Pengantar	iii
BAB 1 Eksplorasi Senyawa Biokimia	1
Pemahaman umum dalam isolasi protein	1
Sentrifugasi	2
Dialisis	5
Kromatografi untuk protein	6
<i>Kromatografi filtrasi gel</i>	6
<i>Kromatografi pertukaran ion</i>	7
Gel elektroforesis.....	9
Eksperimen Isolasi dan Pemurnian Protein Antena Penangkap Cahaya	11
Abstrak	11
Preparasi Kromatofor Membran.....	11
Pemurnian Protein Kompleks LH1 dari <i>Rs. rubrum</i> S1.....	11
Pemurnian Protein Komplek LH2 dari <i>Rps. Palustris</i>	12
Deteksi Kemurnian dengan Spektrofotometer UV-Vis	12
Uji Denaturasi Protein.....	12
Aktifitas Enzim Klorofilase dari Sayuran Berdaun	13
Abstrak	13
Preparasi Serbuk Aseton.....	13
Pengujian Aktifitas Klorofilasi	13
Uji Kualitatif Karbohidrat, Protein dan Lemak	14
Karbohidrat	14
Protein.....	14
Lemak.....	15
Pustaka	17

Kata Pengantar

Praktikum biokimia dirancang untuk membekali mahasiswa keterampilan khusus penerapan terkait dengan metode ekstraksi, purifikasi, identifikasi dan karakterisasi protein trans-membran dan enzim. Dalam penerapan metode tersebut, mahasiswa mengoperasikan teknik ultrasonikasi, sentrifugasi temperatur dingin dan ultrasentrifugasi, kromatografi pertukaran ion, kromatografi gel, penggunaan kromatografi AKTA, gradien sukrosa, SDS-PAGE/Nu-PAGE, dan spektroskopi uv-vis untuk pengukuran protein.

Capaian pembelajaran mata kuliah (CPMK) matakuliah praktikum biokimia adalah agar mahasiswa dapat mengimplementasikan (Kognitif 3) metode ekstraksi, purifikasi, identifikasi dan karakterisasi protein dengan menunjukkan (Psikomotorik 3) hasil isolat protein yang murni dan data karakteristik yang tepat, dan melaporkan (Afektif 3) hasil analisa secara tertulis yang didukung dengan kajian referensi yang kuat.

Sedangkan sub-CPMK terdiri dari:

1. Mahasiswa dapat memecahkan sel dan mengisolasi membran lipida dwilapis (lipid bilayer) dari sel bakteri fotosintetik (*Rsp. palustris* dan *Rs. rubrum S1*) dengan metode ultrasonikasi (P1, P2, KU3, PD2).
2. Mahasiswa dapat menggunakan membran lipida dwilapis dengan metode gradien sukrosa, kromatografi pertukaran ion dan kromatografi gel (P1, P2, KU3, PD2).
3. Mahasiswa dapat menganalisa kemurnian isolat protein dengan metode kromatografi AKTA, SDS-PAGE/Nu-PAGE dan spektroskopi uv-vis (P1, P2, KU1, KU2, KU3, KK1, PD2, PD3).
4. Mahasiswa dapat mengkarakterisasi proses denaturasi termal pada protein (P1, P2, KU1, KU2, KU3, KK1, PD2, PD3).
5. Mahasiswa dapat mengekstraksi enzim klorofilase (P1, P2, KU3, PD2).
6. Mahasiswa dapat menganalisa aktifitas enzim klorofilase (P1, P2, KU1, KU2, KU3, KK1, PD2, PD3).
7. KK1, PD2, PD3).

Malang, 2 Agustus 2018

BAB 1 Eksplorasi Senyawa Biokimia

Dalam modul matakuliah Praktikum Biokimia ini, kita akan fokus membahas pengenalan metode-metode praktis untuk eksplorasi protein, yaitu ekstraksi, purifikasi, identifikasi dan karakterisasinya. Sebagaimana yang telah mahasiswa ketahui dari matakuliah Biokimia (SKI 3102) bahwa peran protein sangat penting hampir disemua proses biologis, antara lain sebagai:

1. Katalis, misalnya enzim;
2. Transportasi molekul, misalnya hemoglobin dalam transport oksigen;
3. Penyimpanan, misalnya myoglobin dalam penyimpanan oksigen pada otot atau protein-protein di benih dalam penyimpanan nutrisi;
4. Koordinasi gerakan, misalnya otot dan flagela;
5. Penunjang struktur mekanis, misalnya kolagen;
6. Sistem proteksi, misalnya antibodi dalam sistem imun;
7. Regulasi dan komunikasi, misalnya hormon, receptor, aktivasi dan represi gen, dsb.;
8. Toksin, misalnya protein toksin pada ular dan insek.

Tujuan dalam studi biokimia antara lain dalam determinasi bagaimana sekuensi asam amino tersebut spesifik menunjuk konformasi protein, mempelajari bagaimana protein mengikat senyawa tertentu, mempelajari bagaimana protein memediasi katalisis, mentransduksi energi, dan informasi. Namun sebelum melakukan determinasi fungsi tersebut, sangat penting untuk memperoleh protein murni yang fungsional. Oleh sebab itu, protein perlu di isolasi, murnikan dan kemudian dilakukan determinasi.

Selain protein, modul matakuliah biokimia ini juga akan membekali mahasiswa dalam melakukan uji kualitatif sederhana dari karbohidrat dan lemak, sehingga membantu dalam menghantar ke bahan ajar pada matakuliah-matakuliah konsentrasi pangan fungsional.

Pemahaman umum dalam isolasi protein

Banyak buku-buku ajar dan artikel yang baik telah memberi ulasan tentang tema isolasi protein. Metode generik terkait isolasi dan pemurnian protein memang telah dikembangkan dan mungkin berlaku untuk semua organisme, namun demikian perlu dicatat bahwa sangat penting untuk mengembangkan strategi khusus untuk isolasi dan purifikasi protein target tertentu. Hal ini tidak seperti penelitian dengan DNA dimana terdapat protokol standar atau “resep” yang telah tersedia. Sedangkan isolasi dan pemurnian protein sering digambarkan sebagai suatu “seni” dari pada sains.

Rancangan prosedur yang tepat untuk mengisolasi protein harus disesuaikan dengan tujuan penelitian. Isolasi dan pemurnian suatu protein tunggal dari suatu sel yang mengandung campuran ribuan protein sangat dimungkinkan dengan dasar hipotesis bahwa setiap jenis protein memiliki karakteristik fisik dan kimia yang berbeda satu dengan yang lain. Karakteristik tersebut tercermin dari komposisi asam amino, sekuensi asam amino, struktur subunit, ukuran, bentuk, total muatan, titik isoelektrik, solubilitas, stabilitas terhadap suhu, hidrofobisitas, karakteristik ikatan dengan ligan atau metal, dan modifikasi pasca-translasi. Karakteristik-karakteristik tersebut dapat kita eksploitasi pada saat mendesain strategi dalam pemurnian.

Secara umum proses ekstraksi dan pemurnian protein dibagi menjadi beberapa tahap berikut:

1. Pemecahan dinding sel
2. Separasi dari komponen non-protein
3. Pemurnian protein target dari protein-protein lain
4. Tahap pemurnian protein target sehingga didapat kemurnian yang lebih tinggi

Dinding sel perlu dipecahkan sehingga protein yang terdapat di dalam organel dapat diisolasi. Pemecahan dinding sel dapat menggunakan metode mekanik dan metode kimiawi. Metode mekanik antara lain seperti *french press* menggunakan tekanan tinggi, sonikasi menggunakan gelombang ultrasonik, *bead beater* menggunakan biji gelas yang kecil. Metode kimiawi antara lain menggunakan larutan penyangga pemecah sel (*lysis buffer*). Dalam proses pemecahan dinding sel biasanya ditambahkan DNase dan garam $MgCl_2$ dalam jumlah yang sedikit untuk memutus DNA dan RNA yang dapat melilit protein sehingga menyulitkan dalam proses separasi dan pemurnian selanjutnya.

Tergantung pada jenis protein target, seperti pada protein membran dan trans-membran memerlukan tahap tambahan sehingga protein dapat larut dalam larutan penyangga. Tahap ini disebut solubilisasi yaitu dengan penambahan detergen. Detergen digunakan untuk mengisolasi protein membran dari matriks aslinya yaitu membran lipida.

Separasi tahap pertama bertujuan memisahkan komponen protein dan non-protein. Metode sentrifugasi biasanya digunakan pada tahap ini. Bahkan untuk memisahkan protein dari komponen lainnya dapat digunakan sentrifugasi dengan metode gradien sukrosa, sehingga didapatkan pita-pita protein yang lebih murni. Setelah separasi tahap pertama, maka dilakukan pemurnian yang biasanya menggunakan metode kromatografi seperti pertukaran ion, afinitas dan filtrasi gel. Terkadang beberapa metode kromatografi dikombinasi sehingga didapatkan kemurnian yang lebih tinggi. Secara teknis metode kromatografi yang digunakan misalnya dengan kolom terbuka, kromatografi cair tekanan rendah seperti AKTA, atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Setiap tahap separasi dan pemurnian sangat dianjurkan agar hasil tahapan diambil sedikit untuk diuji, misalnya dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis dan gel poliakrilamid (SDS-PAGE) sehingga kemurnian protein dapat diamati dengan baik.

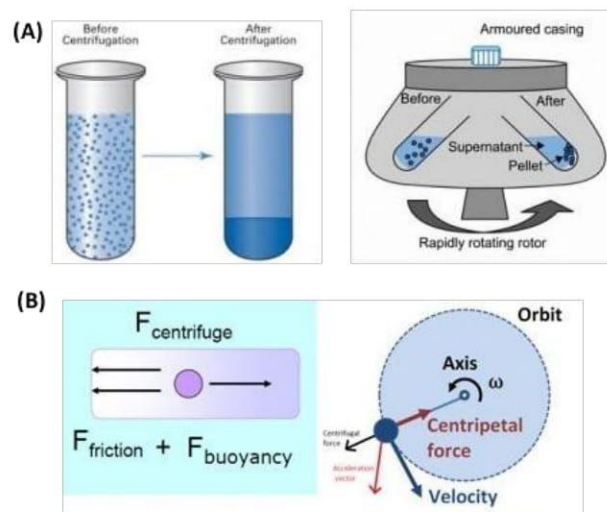
Sentrifugasi

Sentrifugasi adalah teknik yang digunakan untuk pemisahan partikel dari suatu larutan sesuai dengan ukuran, bentuk, densitas, viskositas medium dan kecepatan rotornya. Partikel-partikel tersuspensi dalam medium cair dan ditempatkan dalam tabung sentrifus. Tabung kemudian ditempatkan dalam rotor dan berputar pada kecepatan yang ditentukan. Pemisahan melalui sedimentasi dapat dilakukan secara alami dengan gravitasi bumi, namun, itu akan memakan waktu lama. Sentrifugasi membuat proses alami lebih cepat. Rotasi rotor tentang sumbu pusat menghasilkan gaya sentrifugal pada partikel-partikel dalam suspensi.

Faktor-faktor yang mempengaruhi pemisahan dengan metode sentrifugasi:

1. Densitas sampel dan larutan
2. Temperatur atau viskositas
3. Jarak perpindahan partikel
4. Kecepatan rotasi

Sentrifus adalah alat yang memisahkan partikel dari larutan melalui penggunaan rotor. Dalam biologi, partikel biasanya adalah sel, organel subselular, atau molekul besar, yang semuanya disebut di sini sebagai partikel. Ada dua jenis prosedur sentrifus; satu adalah persiapan, yang tujuannya adalah untuk mengisolasi partikel-partikel tertentu, dan yang lainnya bersifat analitis, yang melibatkan pengukuran sifat-sifat fisik partikel-partikel yang mengendap. Saat rotor berputar dalam sentrifuse, gaya sentrifugal diterapkan pada setiap partikel dalam sampel; partikel kemudian akan mengendap pada tingkat yang sebanding dengan gaya sentrifugal yang diterapkan padanya. Viskositas larutan sampel dan sifat fisik partikel juga mempengaruhi laju sedimentasi setiap partikel. Pada gaya sentrifugal tetap dan viskositas cairan, laju sedimentasi partikel sebanding dengan ukurannya (berat molekul) dan perbedaan antara densitas partikel dan kerapatan larutan.



Gambar 1. Ilustrasi tabung sentrifus dan rotor (A) dan skema kerja gaya sentrifugal dalam proses pemutaran rotor. (Gambar diambil dari Fischer Scientific)

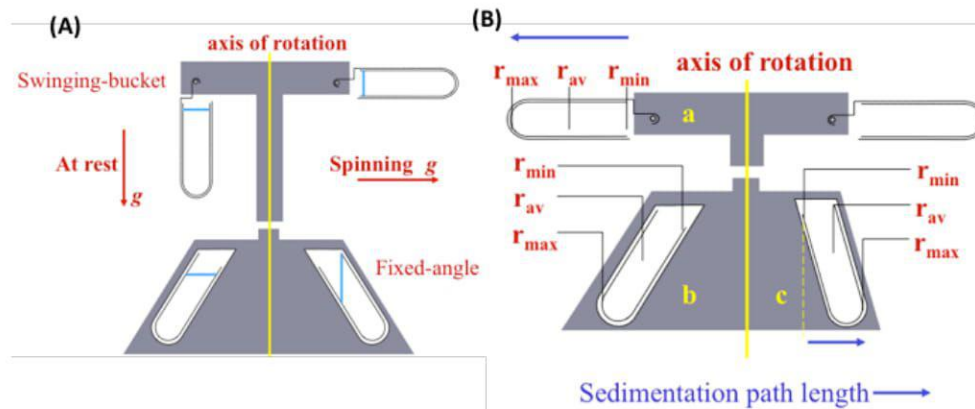
Bila dilihat pada ilustrasi gambar 1A, maka dalam suatu larutan, partikel yang kerapatannya lebih tinggi dari pada pelarut tenggelam tersedimentasi menjadi pelet, dan partikel yang lebih ringan daripada yang mengapung ke atas. Semakin besar perbedaan dalam kerapatan, semakin cepat mereka bergerak. Jika tidak ada perbedaan dalam kerapatan, partikel tetap stabil. Untuk memanfaatkan perbedaan kecil dalam kepadatan untuk memisahkan berbagai partikel dalam suatu larutan, gravitasi dapat diganti dengan "gaya sentrifugal" yang jauh lebih kuat yang disediakan oleh sentrifuge.

Ada dua gaya yang bekerja pada proses sentrifugasi (Gambar 1B):

1. Gaya Buoyant, yaitu gaya yang partikel-partikel harus memindahkan media cair ke tempat mereka mengendap. Gaya ini juga disebut gaya apung.
2. Gaya Friksi, yaitu gaya yang dihasilkan oleh partikel ketika mereka bermigrasi melalui solusi.

Partikel bergerak menjauh dari sumbu rotasi dalam bidang sentrifugal hanya ketika gaya sentrifugal melebihi gaya buoyant dan gaya friksi yang melawan dan mengakibatkan sedimentasi partikel pada tingkat yang konstan.

Gaya Setrifugal Relatif (*relative centrifuge force, RCF*) diekspresikan dalam $\times g$ (kelipatan gaya gravitasi bumi) yaitu sebesar $RCF = 1.118 \times R \times (\text{rpm}/1000)^2$, dimana R adalah radius dalam sentimeter (cm) dan rpm adalah kecepatan rotasi per menit.



Gambar 2. Tipe rotor dan faktor yang mempengaruhi perhitungan RCF

Ada dua tipe rotor (Gambar 2) yang umum digunakan dalam banyak laboratorium yaitu ember berayun (*swinging-bucket*) dan sudut tetap (*fixed-angle*). Pada tipe ember berayun, tabung ditempatkan dalam cangkir rotor untuk mengasumsikan bidang horizontal ketika rotor sedang bergerak dan posisi vertikal ketika sedang beristirahat. Selama sentrifugasi, partikel berjalan secara seragam dan secara konstan sepanjang tabung sementara tabung berada pada sudut kanan ke poros sentrifus; sehingga sedimen didistribusikan secara merata ke bagian bawah tabung dan tetap ada ketika rotor berhenti, dengan cairan di atasnya. Cairan ini dapat dilepaskan dan cairan dan sedimen dapat dipisahkan untuk analisis. Rotor yang berputar menawarkan ketahanan yang cukup terhadap rotasi dan menghasilkan panas karena gesekan udara. Sedangkan pada rotor dengan tipe sudut tetap tidak ada pergerakan yang terjadi pada cangkir rotor.

Dalam modul ini kita akan menggunakan rotor dengan tipe sudut tetap, baik dengan kecepatan tinggi maupun kecepatan ultra. Pada tipe sudut tetap terdapat dua faktor yang penting:

1. Gaya-g (*g-force*) dalam RCF
2. Volume tabung



Gambar 3. Sentrifus ultra dan rotor tipe sudut tetap (MLA-50) yang digunakan dalam praktikum biokimia, Prodi Kimia, Universitas Ma Chung.

Secara umum pada tipe sudut tetap, ukuran rotor berbanding terbalik dengan kemampuan kecepatan maksimumnya (yaitu, semakin besar rotor, semakin rendah kecepatan maksimum). Spesifikasi penting ketika memilih rotor sudut tetap adalah faktor k , yang menunjukkan

efisiensi pelet rotor pada kecepatan tertinggi, dengan memperhitungkan radius maksimum dan minimum (panjang jalur) rongga rotor. Faktor k rendah menunjukkan efisiensi dalam pengendapan pelet yang lebih tinggi; Oleh karena itu, faktor k dapat menjadi metrik yang berguna untuk membandingkan kecepatan di mana partikel akan menyebar di berbagai rotor.

Table 2 Relative Centrifugal Fields for the MLA-50 Rotor^a

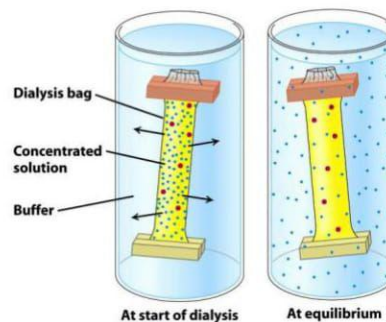
Rotor Speed (rpm)	Relative Centrifugal Field ($\times g$)			k Factor ^b
	At rmax (83.2 mm)	At rav (58.4 mm)	At rmin (33.6 mm)	
50,000	233,000	164,000	94,100	92
45,000	189,000	132,000	76,200	113
40,000	149,000	105,000	60,200	144
35,000	114,000	80,100	46,100	188
30,000	83,900	58,900	33,900	255
25,000	58,200	40,900	23,500	368
20,000	37,300	26,200	15,000	574
15,000	21,000	14,700	8,470	1021
10,000	9,320	6,540	3,760	2297
5,000	2,330	1,640	940	9187

- a. Entries in this table are calculated from the formula $RCF = 1.12r(RPM/1000)^2$ and then rounded to three significant digits.
 b. Calculated for all Beckman Coulter preparative rotors as a measure of the rotor's relative efficiency in pelleting sample in water at 20°C.

Gambar 4. Tabel koreksi nilai kecepatan rotor (rpm), RCF ($\times g$) dan k -factor berdasarkan rotor tipe sudut total MLA-50 (Beckman Coulter).

Dialisis

Dialisis adalah teknik laboratorium umum yang digunakan untuk menghilangkan kontaminan dalam larutan dengan difusi selektif dan pasif melalui membran semi-permeabel seperti pipa dialisis. Dalam penelitian ilmu kehidupan, dialisis paling sering digunakan untuk menghilangkan molekul kecil yang tidak diinginkan seperti garam, zat pereduksi (misalnya dithiothreitol atau DTT dan 2-mercaptoethanol atau BME), pengawet (misalnya natrium azida dan thimerosol), atau reagen label (misalnya sulfo-SMCC dan biotin) dalam suatu larutan. Teknik ini juga cukup berguna untuk pertukaran larutan penyangga dan mempelajari pengikatan obat (*drug binding*).



Gambar 5. Ilustrasi proses dialisis dimana partikel yang tidak diinginkan terdifusi keluar melalui membran dialisis sehingga protein target di dalam membran dialisis dapat terbebas dari kontaminasi.

Dialisis bekerja dengan difusi. Secara definisi, difusi adalah gerakan acak, gerakan termal dari molekul dalam suatu larutan dari area konsentrasi yang lebih tinggi ke area konsentrasi yang lebih rendah sampai kesetimbangan tercapai. Difusi Diferensial pola dicapai dengan memisahkan sampel dan larutan penyangga (dialasat) dengan membran semi-permeabel untuk memisahkan molekul dalam sampel dan larutan penyangga (dialasat). Karena molekul yang lebih besar tidak dapat melewati pori-pori membran, molekul tersebut akan tetap berada

di ruang sampel sementara molekul kecil akan mudah berdifusi melintasi membran. Pada waktunya, konsentrasi keseluruhan molekul dalam sampel dan dialisat akan berubah dan kesetimbangan akan tercapai. Dengan mendialisis sampel protein Anda, Anda dapat menghapus molekul-molekul kecil yang secara efektif melewati membran. Anda juga dapat mengurangi konsentrasi kontaminan dengan setiap perubahan larutan penyangga dan mencegah mereka mengganggu langkah selanjutnya dalam prosedur eksperimental.

Secara teknis dialisis adalah proses yang relatif mudah. Yang Anda butuhkan hanyalah sampel protein dan buffer dialisat, membran dialisis dalam format yang sesuai dan pemotongan berat molekul (MWCO), dan wadah untuk menahan buffer. Membran dialisis biasanya terbuat dari film selulosa atau ester selulosa yang diregenerasi dan memiliki MWCO mulai dari ~ 1.000 hingga ~ 50.000 kDa.

Waktu yang diperlukan untuk menyelesaikan prosedur tergantung pada faktor-faktor yang sama yang menentukan tingkat difusi molekul. Dengan demikian, dapat dipengaruhi oleh hal-hal berikut:

1. Suhu, karena meningkatkan suhu mempercepat laju difusi, prosedur akan berjalan lebih cepat pada suhu kamar daripada pada 4 °C. Namun, Anda perlu mengambil stabilitas termal dari molekul yang menjadi pertimbangan saat menentukan suhu optimal.
2. Konsentrasi dan berat molekul dari molekul. Semakin tinggi konsentrasi, semakin cepat laju difusi. Namun, karena berat molekul meningkat, laju gerakan melambat.
3. Luas permukaan dan ketebalan membran. Laju difusi berbanding dengan luas permukaan membran dan berbanding terbalik dengan ketebalannya.

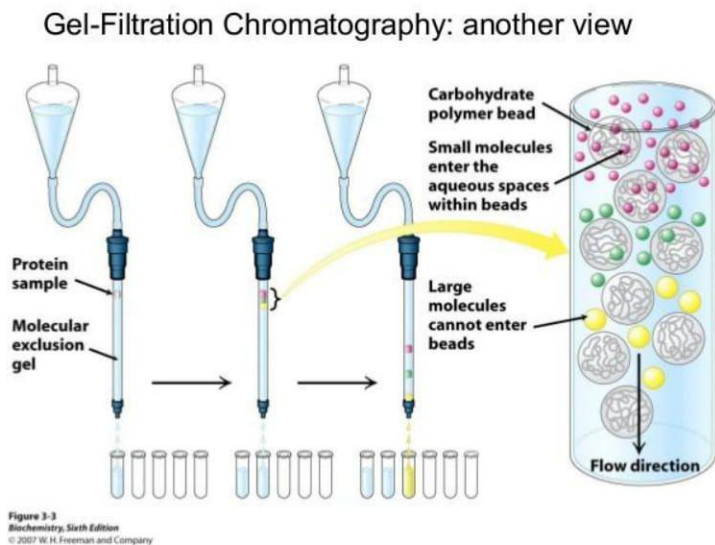
Jika Anda melakukan dialisis dengan benar, Anda dapat menghilangkan semua partikel yang tidak diinginkan dan mendapatkan hasil yang akurat dari percobaan Anda.

Kromatografi untuk protein

Kromatografi filtrasi gel

Kromatografi gel filtration, juga dikenal sebagai kromatografi eksklusi ukuran, digunakan untuk memisahkan molekul dengan ukuran yang berbeda. Selain memisahkan berbagai protein dengan ukuran yang bervariasi, seseorang dapat memisahkan bentuk oligomerik dari protein tertentu. Selanjutnya, teknik ini dapat digunakan untuk menukar buffer sampel dengan yang berbeda. Jenis kolom khusus ini biasanya disebut sebagai kolom desalting.

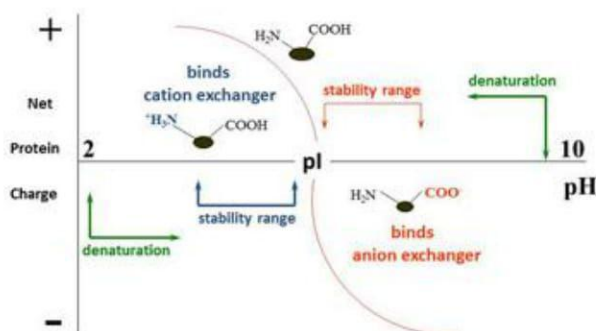
Gel filtrasi kolom terdiri dari matriks manik-manik yang berisi saringan ukuran tertentu. Butiran kolom filtrasi gel terdiri dari polyacrylamide yang bersilangan silang, agarose, dekstran, atau kombinasi dari semua ini. Molekul besar seperti protein dan polimer mungkin atau mungkin tidak memasukkan manik-manik, tergantung pada ukurannya, dan akan mengelusi sebelum senyawa kecil seperti ion dan garam penyangga, yang dapat memasuki saringan dalam matriks fase diam. Perhatikan bahwa kata 'ukuran' dalam diskusi ini berkorelasi dengan jari-jari Stokes dari molekul, yang memperhitungkan interaksi antara molekul dan air. Dalam kolom desalting, saringan sangat kecil, hanya garam kecil dan garam penyangga yang dapat masuk ke dalamnya, dan protein akan terelusi dalam buffer yang digunakan untuk kolom.



Gambar 6. Ilustrasi kromatografi filtrasi gel (diambil dari buku *Biochemistry, fifth edition*, ©W.H. Freeman and Company).

Kromatografi pertukaran ion

Kromatografi pertukaran ion umumnya digunakan untuk memisahkan molekul biologis bermuatan seperti protein, peptida, asam amino, atau nukleotida. Asam amino yang membentuk protein adalah senyawa zwitterionic yang mengandung kelompok kimia baik yang bermuatan positif maupun negatif. Tergantung pada pH lingkungannya, protein dapat membawa muatan positif bersih, muatan negatif bersih, atau tanpa biaya. PH di mana molekul tidak memiliki muatan bersih disebut titik isoelektriknya, atau pI.



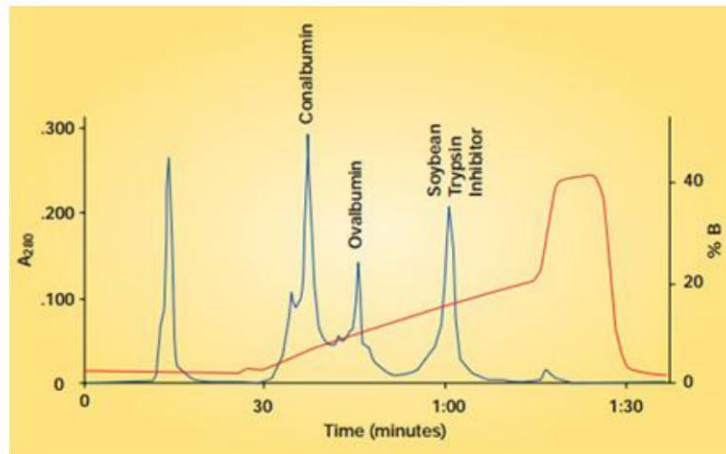
Gambar 7. Muatan protein vs pH. Stabilitas protein dan pengikatan media pertukaran ion bervariasi dengan total muatan protein, yang tergantung pada pH.

Nilai pI dapat dihitung berdasarkan urutan utama dari molekul. Pilihan pH buffer kemudian menentukan muatan bersih dari protein yang diinginkan. Dalam buffer dengan pH lebih besar dari pI protein yang diinginkan, protein akan membawa muatan negatif bersih; Oleh karena itu, resin penukar anion bermuatan positif dipilih untuk menangkap protein ini. Dalam buffer dengan pH lebih rendah dari pI protein yang diinginkan, protein akan membawa muatan bersih positif; sehingga resin penukar kation yang bermuatan negatif dipilih.

Ketika kolom kromatografi pertukaran ion dimuat dengan sampel pada pH tertentu, semua protein yang terisi dengan tepat akan berikatan dengan resin. Sebagai contoh, jika resin penukar anion dipilih, semua protein yang bermuatan negatif pada pH penyangga pemuatan akan berikatan dengan resin kolom bermuatan positif.

Bagaimana teknisnya kromatografi penukaran ion bekerja?

Setelah memasukkan sampel protein tidak murni ke kolom kromatografi penukar ion, kolom dicuci untuk menghilangkan protein yang tidak diinginkan dan pengotor lainnya, dan kemudian protein yang menarik dielusi menggunakan baik gradien garam atau perubahan pH.



Gambar 8. Elusi gradien garam. Elusi protein (jejak biru) dengan gradien garam yang meningkat (jejak merah). Konsentrasi protein terelusi dideteksi dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm.

Ion garam bermuatan bersaing dengan protein terikat untuk kelompok fungsional resin bermuatan. Protein dengan beberapa kelompok bermuatan akan mengelusi pada konsentrasi garam rendah, sedangkan protein dengan banyak kelompok bermuatan akan memiliki waktu retensi yang lebih besar dan elute pada konsentrasi garam yang tinggi.

Meskipun kurang umum, gradien pH juga dapat digunakan untuk elusi. Di sini, gradien pH dipilih yang mendekati protein pI minat. Protein akan mengelusi ketika gradien pH mencapai pI mereka, karena mereka tidak akan lagi membawa muatan bersih yang memungkinkan mereka untuk berinteraksi dengan kolom resin.

Untuk mengelusi protein dari resin penukar anion, gradien pH menurun dipilih, sementara gradien pH yang meningkat dipilih untuk elusi dari penukar kation.

Resin kromatografi pertukaran ion terdiri dari gugus fungsi bermuatan positif atau negatif yang secara kovalen terikat pada matriks padat. Matriks umum adalah selulosa, agarosa, polimetakrilat, polistiren, dan poliakrilamida. Tiga matriks terakhir memungkinkan laju aliran yang lebih tinggi.

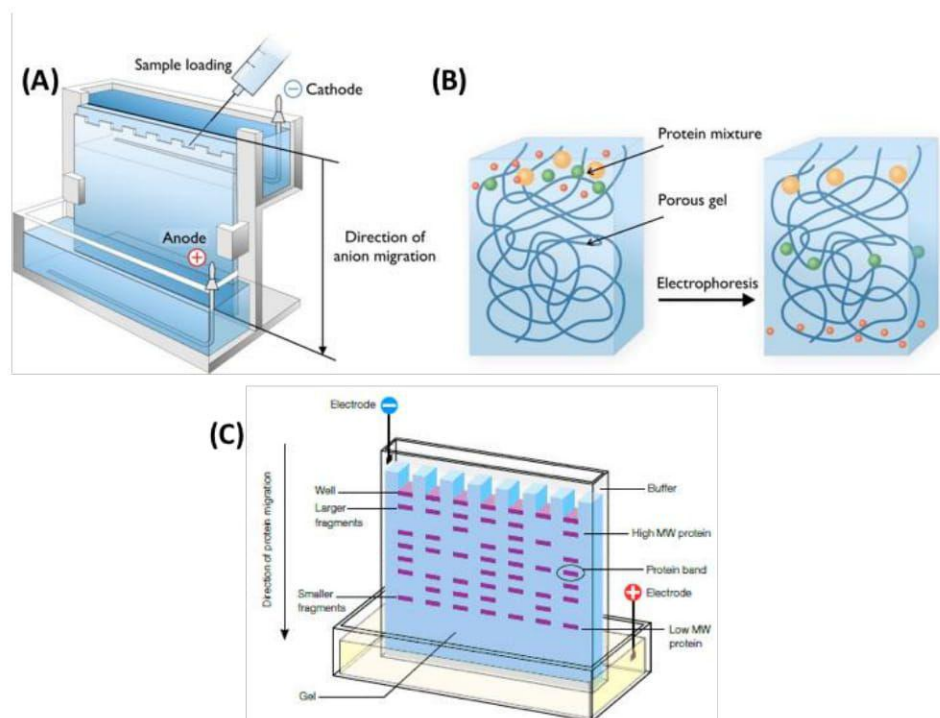
Beberapa jenis pilihan resin perlu mempertimbangkan antara lain:

1. Penukar anion atau penukar kation
2. Penukar ion lemah vs kuat
3. Bentuk ionik dari resin
4. Ukuran partikel resin
5. Laju alir yang diizinkan
6. Kapasitas pengikatan dinamis

Gel elektroforesis

Setiap tahap dalam proses separasi dan pemurnian protein sebaiknya diambil sedikit cuplikan untuk diuji bagai protein target tersebut dapat dipisahkan dan dimurnikan dari matriknya yang lain. Untuk inilah diperlukan gel elektroforesis.

Elektroforesis gel adalah metode laboratorium yang digunakan untuk memisahkan campuran DNA, RNA, atau protein berdasarkan ukuran molekul. Dalam elektroforesis gel, molekul yang dipisahkan didorong oleh medan listrik melalui gel yang mengandung pori-pori kecil. Molekul berjalan melalui pori-pori di gel dengan kecepatan yang berbanding terbalik dengan panjangnya. Ini berarti bahwa molekul DNA kecil akan menempuh jarak yang lebih jauh melalui gel daripada molekul DNA yang lebih besar.



Gambar 9. Ilustrasi gel elektroforesis poliakrilamida. (A) Sampel protein dimasukkan dalam sumur-sumur yang dibuat, (B) ilustrasi bagaimana protein terpisah berdasarkan arus listrik yang dijalankan, dan (C) pemisahan protein yang terjadi setelah beberapa waktu.

Elektroforesis gel protein dengan matriks poliakrilamida, yang biasa disebut elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) tidak diragukan lagi adalah salah satu teknik yang paling banyak digunakan untuk mengkarakterisasi campuran protein kompleks. Ini adalah metode yang mudah, cepat dan murah karena mereka hanya memerlukan urutan jumlah mikrogram protein.

Protein memiliki muatan listrik jika mereka berada dalam media yang memiliki pH yang berbeda dari titik isoelektrik mereka dan karena itu memiliki kemampuan untuk bergerak ketika mengalami medan listrik. Kecepatan migrasi sebanding dengan rasio antara muatan protein dan massanya. Muatan yang lebih tinggi per unit massa semakin cepat migrasi.

Protein tidak memiliki struktur yang dapat diprediksi sebagai asam nukleat, dan dengan demikian tingkat migrasi mereka tidak sama satu sama lain. Mereka bahkan tidak dapat bermigrasi ketika menerapkan gaya gerak listrik (ketika mereka berada di titik isoelektrik mereka). Dalam kasus ini, protein didenaturasi dengan menambahkan detergen seperti

natrium dodesil sulfat (SDS) untuk memisahkan mereka secara eksklusif sesuai dengan berat molekul. Teknik ini pertama kali diperkenalkan oleh Shapiro et al. (1967). SDS adalah agen pereduksi yang memecah ikatan disulfida, memisahkan protein menjadi sub-unitnya dan juga memberikan muatan negatif bersih yang memungkinkan mereka untuk bermigrasi melalui gel dalam hubungan langsung dengan ukurannya. Selain itu, denaturasi membuat mereka kehilangan struktur tersier mereka dan karena itu kecepatan migrasi sebanding dengan ukuran dan bukan struktur tersier.

Beberapa highlights dari elektroforesis gel poliakrilamida adalah:

1. Gel menekan konveksi termal yang disebabkan oleh penerapan medan listrik, dan juga dapat bertindak sebagai media pengayakan, memperlambat jalur molekul; gel juga hanya dapat berfungsi untuk menjaga pemisahan yang telah selesai, sehingga noda elektroforesis pasak dapat diterapkan.
2. Gel poliakrilamida dibentuk oleh polimerisasi akrilamida oleh aksi agen pengikat silang, bis-akrilamida, di hadapan inisiator dan katalis. Ion persulfat ($S_2O_8^{2-}$), yang ditambahkan sebagai ammonium persulfat (APS) adalah inisiator pematatan gel dan sumber radikal bebas, sementara TEMED (N, N, N', N'- tetramethylethylenediamine) mengkatalisis reaksi polimerisasi dengan menstabilkan ini. Radikal bebas. Dalam beberapa situasi, misalnya, isoelektrik yang memfokuskan keberadaan persulfat dapat mengganggu elektroforesis, sehingga ribofavin dan TEMED digunakan sebagai gantinya.
3. Larutan akrilamida dilepaskan sebagai oksigen adalah inhibitor polimerisasi. Selain itu, polimerisasi melepaskan panas yang dapat menyebabkan pembentukan gelembung di dalam gel.
4. Tingkat polimerisasi ditentukan oleh konsentrasi persulfat (katalis) dan TEMED (inisiator).
5. Rasio antara akrilamida / bisakrilamida serta konsentrasi total kedua komponen, mempengaruhi ukuran pori dan kekakuan matriks gel akhir. Ini, pada gilirannya, mempengaruhi berbagai ukuran protein yang dapat diatasi. Ukuran pori-pori yang dibuat dalam gel berbanding terbalik dengan jumlah akrilamida yang digunakan. Misalnya, gel poliakrilamida 7% memiliki pori yang lebih besar dari gel poliakrilamida 12%. Gel dengan persentase rendah akrilamida biasanya digunakan untuk menyelesaikan protein besar, dan gel persentase tinggi digunakan untuk menyelesaikan protein kecil. "Gradient gel" secara khusus disiapkan untuk memiliki persen-akrilamida rendah di bagian atas dan persen-akrilamida tinggi di bagian bawah, memungkinkan berbagai ukuran protein yang lebih luas untuk dipisahkan.

Eksperimen Isolasi dan Pemurnian Protein Antena Penangkap Cahaya

Abstrak

Dalam praktikum ini akan dilakukan isolasi dan pemurnian dari protein antena penangkap cahaya yaitu LH1 dan LH2 dari *Rhodospseudomonas (Rps.) palustris* dan *Rhodospirillum (Rs.) rubrum*, yang adalah bakteri fotosintesis ungu. Kedua tipe antena penangkap cahaya tersebut merupakan protein membran, sehingga mahasiswa perlu memperhatikan tahap dimana protein perlu disolubilisasi. Mahasiswa akan mengisolasi protein dari memecahkan dinding sel, menyiapkan kromatofor membran, memurnikan protein kompleks antena penangkap cahaya, mengidentifikasi kemurnian dengan spektrofotometer UV-Vis, dan melakukan uji denaturasi.

Preparasi Kromatofor Membran

Kromatofor dari bakteri *Rps. palustris* dan *Rs. rubrum* disiapkan berdasarkan metode yang sama seperti di bawah. Sel bakteri (kurang lebih 100 g) disuspensikan dalam larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 8.0), kemudian dengan penambahan DNase dalam jumlah yang cukup, sel dihancurkan menggunakan sonikator. Larutan homogenasi disentrifuse ($18000 \times g$, 30 min, $4^{\circ}C$) untuk memisahkan dinding sel. Jika diperlukan pellet dari kromatofor disuspensikan kembali dalam larutan buffer yang sama, kemudian dihomogenisasi dan disentrifugasi. Kromatofor dipisahkan dari sitokrom dan senyawa pengkontaminasi lainnya yang memiliki masa rendah menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan tinggi ($70000 \times g$; 90 min; $4^{\circ}C$), kemudian dimurnikan dengan pencucian sebanyak 3 kali menggunakan larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 7.8), diikuti dengan ultrasentrifugasi. Kromatofor disimpan dalam almari pendingin ($-25^{\circ}C$) sampai digunakan.

Pemurnian Protein Kompleks LH1 dari *Rs. rubrum* S1

Kompleks antenna penangkap cahaya dari kromatofor *Rs. rubrum* S1 disiapkan mengikuti metode Picorel dkk (1983) yang dimodifikasi menurut Fiedor dkk. (2004). Kromatofor murni disuspensikan dalam larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 7,8) mengandung 0,1% LDAO dan sodium askorbat dan memiliki nilai absorbansi sekitar 40 pada 880 nm pada pita Q_y . Setelah 10 menit pengadukan, nilai absorbansi dicek dan diatur ulang ke nilai 38 dan konsentrasi LDAO ditingkatkan menjadi 0,45%. Larutan suspensi kemudian diaduk selama 1 jam pada $4^{\circ}C$. Setelah itu, konsentrasi detergen diturunkan menjadi 0,1% dengan pengenceran dengan larutan buffer TRIS-HCl dan suspensi disentrifugasi ($8000 \times g$, 15 min, $4^{\circ}C$) untuk memisahkan bahan yang tidak larut. Supernatan yang berwarna merah diambil dan disentrifugasi dengan kecepatan yang tinggi ($105000 \times g$, 90 min, $4^{\circ}C$). Ekstraksi dari pellet kromatofor dilakukan dengan 0,45% LDAO dan diulang 3 kali. Supernatan dari ultrasentrifuse digabung dan didialisis selama semalam dengan larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 7,8) mengandung sodium askorbat dan disentrifuse ($25000 \times g$, 30 min, $4^{\circ}C$). Pellet yang mengandung antenna LH1 kasar kemudian dibagi kedalam beberapa porsi dan disimpan pada $-25^{\circ}C$ sampai digunakan selanjutnya.

Pada tahapan selanjutnya, 1 porsi dari antenna LH1 kasar (nilai absorbansi sekitar 25 pada pita Q_y) disuspensikan dalam 4 mL larutan buffer TRIS-HCl (40 mM; pH 7,8) mengandung sodium askorbat dan 2,35% β -OG. Suspensi ini diaduk selama 1 jam dalam es, kemudian dilarutkan menjadi 1% β -OG dan disentrifugasi ($8000 \times g$, 30 min, $4^{\circ}C$) untuk mengilangkan bahan yang tidak larut. Untuk pemurnian akhir, antenna LH1 kasar dimasukkan kedalam kolom DEAE-selulosa (DE-52, Watman) diekuilibrasikan dalam larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 7,8) mengandung 0,8% β -OG dan 10 mM NaCl. Fraksi LH1 (pita merah pekat)

dielusi dengan 180-200 mM NaCl kemudian didialisis semalam pada 4°C dan disimpan pada -25°C.

Pemurnian Protein Komplek LH2 dari *Rps. Palustris*

Kromatofor yang sudah didapat kemudian disolubilisasikan dalam larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 8,0) dan diaduk sampai homogen. Sampel yang sudah homogen tersebut diambil sebagian untuk diukur spektra serapannya dan nilai OD₈₅₈ diatur ke 50 cm⁻¹. Setelah penambahan 1% lauryldimethyl-N-oxide (LDAO), kromatofor disolubilisasi selama 1 jam pada suhu 5°C dengan kondisi gelap. Bahan yang tidak larut dipisahkan dari membran dengan cara sentrifugasi (10000 × rpm; 10 min; 5°C). Supernatan yang mengandung kompleks LH2 dan LH1-RC diambil dan dimurnikan dengan *sucrose density gradient centrifugation* (SDGC). 4 variasi konsentrasi sukrosa dalam larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 8,0) mengandung 0,1% LDAO dimasukkan dalam tabung *ultracentrifuge* dengan urutan lapisan dari bawah ke atas, yaitu: 5 mL dari 0,8 M larutan sukrosa, 8 mL dari 0,6 M larutan sukrosa, 9 mL dari 0,4 M larutan sukrosa, 3 mL dari 0,2 M larutan sukrosa. Kemudian membrane hasil sentrifuse ditambahkan di atas larutan gradient sukrosa tersebut secara hati-hati. Proses pemisahan pigmen, kompleks LH2 dan kompleks LH1-RC dengan SDGC dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan yang tinggi (150000 × g, 16 jam, 4°C).

Pita yang merupakan kompleks LH2 diambil dan dimurnikan lagi dengan kolom DE-52 selulosa (Whatman). Persiapan kromatografi pertukaran ion dengan mengkuilibrasi kolom DE-52 menggunakan larutan bufer TRIS-HCl (20 mM; pH 8,0) mengandung 0,1% LDAO. Larutan NaCl dengan konsentrasi 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM dan 250 mM dalam larutan bufer TRIS-HCl mengandung 0,1% LDAO digunakan untuk memurnikan kompleks LH2. Tahap selanjutnya adalah penghilangan NaCl dari kompleks LH2 menggunakan kolom PD-10. Kolom PD-10 diekuilibrasi menggunakan larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 8,0) mengandung 0,1% LDAO sebanyak 8 mL dengan 3 kali pengulangan. Kemudian kompleks LH2 hasil kromatografi pertukaran ion dimasukkan kedalam kolom PD-10 dan disentrifuse (4500 × rpm; 10 min; 4°C) untuk mengkoleksi kompleks LH2.

Deteksi Kemurnian dengan Spektrofotometer UV-Vis

Uji kemurnian dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan mengukur spektrum hasil pemurnian protein pada panjang gelombang 180 s.d. 950 nm. Mahasiswa harus memperhatikan rasio antara pita protein (280 nm) dan pita kompleks yang muncul di area NIR.

Uji Denaturasi Protein

Komplek LH1 dalam larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 8,0) mengandung 0,8% β-OG dan kompleks LH2 dalam larutan buffer TRIS-HCl (20 mM; pH 8,0) mengandung 0,1% LDAO diatur nilai absorbansinya menjadi 1 pada B880 (komplek LH1) dan B850 (komplek LH2). Sampel diinkubasi pada suhu 90°C selama 0, 10, 20, 30, 60 min dalam kondisi gelap. Spektra serapan dari setiap kompleks diukur menggunakan spektrofotometer UV-1700 (Shimadzu) pada interval panjang gelombang dari 250-1100 nm.

Aktifitas Enzim Klorofilase dari Sayuran Berdaun

Abstrak

Pada praktikum ini mahasiswa akan mengisolasi enzim klorofilase dari daun sayuran dan kemudian menguji aktivitas dari enzim tersebut. Enzim klorofilase berperan dalam degradasi klorofil *a* dan klorofil *b* menjadi klorofilid.

Preparasi Serbuk Aseton

Untuk mendapatkan serbuk yang tidak mengandung klorofil, metode pembuatan serbuk aseton yang dikembangkan oleh McFeeters dkk (1971) dan Chen dkk. (2012) digunakan sebagai acuan dalam praktikum ini. Serbuk aseton disiapkan dari daun segar berwarna hijau dan berwarna kuning secara terpisah. Daun dibekukan dalam nitrogen cair dan ditumbuk menjadi serbuk menggunakan mortal dan pestle, kemudian diekstraksi dengan aseton dingin (-20°C). Ekstrak yang mengandung pigmen dipisahkan dari pelet dengan sentrifugasi ($3000 \times g$, 5 min, 4°C), kemudian pelet diambil. Prosedur ekstraksi pigmen dengan aseton dingin diulang 3 kali dengan cara yang sama untuk menghilangkan semua klorofil dan karotenoid yang tersisa. Serbuk aseton dikeringkan dengan gas N_2 dan disimpan pada -20°C sampai digunakan.

Pengujian Aktifitas Klorofilasi

Untuk menentukan aktifitas klorofilase pada degradasi ekstrak klorofil *a* dan klorofil *b*, 100 mg serbuk aseton dihomogenisasi dengan 5 mL larutan bufer untuk ekstraksi yang mengandung potasium fosfat (pH 7), 50 mM KCl, dan 0,24% Triton X-100 selama 1 jam pada suhu 30°C . Setelah sentrifugasi pada $15000 \times g$ selama 15 menit, supernatant digunakan untuk pengujian klorofilase. Pengujian aktifitas klorofilase mengikuti modifikasi metode dari McFeeters dkk (1971). Secara singkat, campuran reaksi standar dibuat dari 0,1 mL supernatant; 0,1 mL substrat ($1 \mu\text{mol/mL}$ klorofil *a* atau klorofil *b* dalam aseton); dan 0,8 mL larutan buffer reaksi (100 mM sodium fosfat (pH 7) dan 0,24% Triton X-100). Campuran diinkubasi selama 60 menit pada 30°C dan reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL larutan KOH (10 mM). Setelah itu, 1 mL campuran kemudian dicampurkan dengan 5 mL campuran pelarut heksana dan aseton (3:2, v/v) untuk mengurangi pengaruh dari klorofil. Produk klorofilid *a* atau klorofilid *b* pada fase aseton kemudian ditentukan dengan spektrofotometer UV-1700 (Shimadzu) menggunakan koefisien ekstinsi $74,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pada 667 nm dan $47,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pada 650 nm untuk klorofilid *a* dan klorofilid *b* (Trebitsh dkk., 1993). Satu unit aktifitas degradasi klorofil *a* atau klorofil *b* didefinisikan sebagai jumlah klorofilase yang dibutuhkan untuk mengkatalisa produksi $1 \mu\text{mol}$ klorofilid *a* atau klorofilid *b* per menit.

Uji Kualitatif Karbohidrat, Protein dan Lemak

Karbohidrat

Terdapat 3 uji kualitatif karbohidrat, yaitu uji Molisch, uji Fehling, dan uji Tollens. Berikut merupakan cara kerja untuk setiap uji kualitatif karbohidrat:

1. Uji Molisch

Larutan sampel berupa ekstrak buah (10%, 1 mL), sukrosa (1%, 1 mL), dan akuades (1 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 1 ml larutan α -naftol dalam alkohol 1%, kemudian H_2SO_4 pekat ditambahkan perlahan melalui dinding tabung. Campuran larutan sampel dan pereaksi Molisch ddiamkan beberapa saat, kemudian catat dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

2. Uji Fehling

Larutan sampel berupa ekstrak buah (10%, 1 mL), sukrosa (1%, 1 mL), dan akuades (1 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 1 ml pereaksi Fehling A dan 1 ml pereaksi Fehling B, kemudian dikocok hingga homogen dan dipanaskan di atas penangas api sampai mendidih. Catat dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

3. Uji Tollens

Larutan sampel berupa ekstrak buah (10%, 1 mL), sukrosa (1%, 1 mL), dan akuades (1 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 1 ml pereaksi Tollens, kemudian dipanaskan di atas penangas api sampai mendidih. Catat dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

Protein

Terdapat 7 uji kualitatif protein, yaitu uji denaturasi dengan pemanasan, uji denaturasi dengan penambahan asam-basa, uji reaksi proten dengan asam kuat dan asam lemah, uji Biuret, uji Xanthoprotein, uji Folin Ciocalteu, dan uji Millom. Berikut merupakan cara kerja untuk setiap uji kualitatif protein:

1. Uji denaturasi dengan pemanasan

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), albumin (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi dipanaskan di penangas air yang mendidih sampai ada gumpalan yang terbentuk. Larutan uji didiamkan, kemudian amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

2. Uji denaturasi dengan penambahan asam-basa

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), albumin (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi (setiap sampel kedalam 2 tabung reaksi). Tiga jenis sampel pertama ditambahkan dengan 0,5 mL HCl, sedangkan 3 jenis sampel ke dua ditambahkan dengan 0,5 mL NaOH. Larutan uji didiamkan, kemudian amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

3. Uji reaksi protein dengan asam kuat dan asam lemah

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), albumin (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi (setiap sampel kedalam 2 tabung reaksi). Tiga jenis sampel pertama ditambahkan dengan 0,5 mL HNO₃, sedangkan 3 jenis sampel ke dua ditambahkan dengan 0,5 mL CH₃COOH. Larutan uji didiamkan, kemudian amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

4. Uji Biuret

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), albumin (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 0,5 mL NaOH encer dan 0,5 mL larutan CuSO₄, kemudian larutan uji dikocok dan didiamkan. Amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

5. Uji Xanthoprotein

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), albumin (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 0,5 mL HNO₃ pekat, kemudian larutan uji dikocok dan didiamkan. Amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

6. Uji Folin Ciocalteu

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), albumin (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 0,5 mL pereaksi Follin, kemudian larutan uji dikocok dan didiamkan. Amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

7. Uji Millon

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), albumin (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 0,5 mL pereaksi Millon, kemudian larutan uji dikocok dan didiamkan. Amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

Lemak

Terdapat 3 uji kualitatif lemak, yaitu uji penyabunan, uji Salkowski, dan uji Lieberman-Buchard. Berikut merupakan cara kerja untuk setiap uji kualitatif lemak:

1. Uji penyabunan

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), minyak goreng (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 1 mL larutan NaOH (0,5 N) dan 1 mL etanol, kemudian dipanaskan di atas air yang mendidih selama 15 menit. Larutan uji ditambah dengan 2 mL larutan NaCl jenuh. Amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

2. Uji Salkowski

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), minyak goreng (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 1 mL kloroform dan divortek sampai homogen, kemudian ditambahkan dengan 1 mL asam sulfat pekat. Larutan uji didiamkan, kemudian amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

3. Uji Lieberman-Buchard

Larutan sampel berupa ekstrak buah (1%; 0,5 mL), minyak goreng (0,5 mL), dan akuades (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambah dengan 1 mL kloroform dan divortek sampai homogen, kemudian ditambahkan dengan 1 mL campuran larutan asam asetat anhidrida dan asam sulfat pekat (30:1, v/v). Larutan uji didiamkan, kemudian amati dan dokumentasikan perubahan yang terjadi.

Pustaka

- Chen, M.C.-M., Chao, P.-Y., Huang, M.-Y., Yang, J.-H., Yang, Z.-W., Lin, K.-H., dan Yang, C.-M. 2012. Chlorophyllase activity in green and non-green tissues of variegated plants. *South African Journal of Botany* 81: 44–49.
- Fiedor, L., Akahane, J., dan Koyama, Y. 2004. Carotenoid-induced cooperative formation of bacterial photosynthetic LH1 complex. *Biochemistry* 43, 16487-16496.
- McFeeters, R.F., Chichester, C.O., dan Whitaker, J.R. 1971. Purification and properties of chlorophyllase from *Ailanthus altissima* (Tree-of-Heaven). *Plant Physiology* 47, 609–618.
- Nakagawa, K., Suzuki, S., Fujii, R., Gardiner, A.T., Cogdell, R.J., Nango, M., dan Hashimoto, H. 2008. Probing the Effect of the Binding Site on the Electrostatic Behavior of a Series of Carotenoids Reconstituted into the Light-harvesting 1 Complex from Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* Detected by Stark Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*. 112: 9467–9475.
- Nelis, H.J. and de Leenheer, A.P. 1989. Profiling and Quantitation of Bacterial Carotenoids by Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 3065–3071.
- Picorel, R., Belanger, G., dan Gingras, G. 1983. Antenna holochrome B880 of *Rhodospirillum rubrum* S1. Pigment, phospholipid, and polypeptide composition. *Biochemistry* 22, 2491-2497.
- Prihastyanti, M.N.U., Heriyanto, dan Brotosudarmo, T.H.P. 2016. Photostability of purple bacterial light-harvesting complexes towards exposure of light illumination traced by pigment ratio. *Jurnal Teknologi* 78:145-149.
- Trebitsh, T., Goldschmidt, E.E., dan Riov, J. 1993. Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in Citrus fruit peel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9441-9445.