



**TEKNIK LABORATORIUM  
BIOKIMIA DAN  
BIOLOGI MOLEKULER**

**Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, MS.**

# **TEKNIK LABORATORIUM BIOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULER**

**Disusun oleh:**

Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, M.S.

Dr. dr. Siufui Hendrawan, M.Biomed

dr. David Limanan, M.Biomed

Dr. dr. Ni. Made Swantari, M. Biomed, Sp.BP-RE

Eny Yulianti, S.E



**UNTAR  
PRESS**

# TEKNIK LABORATORIUM BIOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULER

ISBN:

Hak Cipta 2026 pada Penulis

Hak penerbitan pada UNTAR PRESS. Bagi mereka yang ingin memperbanyak sebagian isi buku ini dalam bentuk atau cara apapun harus mendapatkan izin tertulis dari penulis dan penerbit UNTAR PRESS.

## **Penulis:**

Prof. Dr. dr. Frans Ferdinal, M.S.

Dr. dr. Siufui Hendrawan, M.Biomed

dr. David Limanan, M.Biomed

Dr. dr. Ni. Made Swantari, M. Biomed, Sp.BP-RE

Eny Yulianti, S.E

## **Editor:**

Benita Christina Santoso

## **Lay out**

Chiara Rizka Yukianti

## **Desain sampul:**

Matthew Ricky Wijaya



**Penerbit UNTAR PRESS**

Anggota Ikatan Penerbit Indonesia (IKAPI) No. 605/Anggota Luar Biasa/DKI/2021

LPPM, Gedung M Lt. 5 Kampus 1 Universitas Tarumanagara

Letjen S. Parman St No.1, RT.6/RW.16, Tomang, Grogol Petamburan, Jakarta Barat, 11440

Telp. (021) 5671747 ext. 215

e-Mail: publikasi@untar.ac.id

Hak Cipta dilindungi Undang-undang

All Right Reserved

Cetakan I, \_\_\_\_\_ 2026

## PENDAHULUAN

---

Praktikum Biokimia & Biologi Molekuler merupakan bagian dari proses pembelajaran Biokimia & Biologi Molekuler yang bertujuan untuk menjembatani pemahaman teori dengan keterampilan praktik di laboratorium. Melalui kegiatan praktikum, mahasiswa tidak hanya mempelajari konsep-konsep dasar Biokimia & Biologi Molekuler, tetapi juga mengembangkan kemampuan teknis, ketelitian kerja, serta sikap ilmiah yang sangat diperlukan dalam bidang sains kesehatan dan ilmu hayati.

Biokimia & Biologi Molekuler sebagai cabang ilmu yang mempelajari struktur, fungsi, dan proses kimiawi pada makhluk hidup memiliki peran penting dalam memahami mekanisme molekuler yang mendasari berbagai proses biologis, baik dalam kondisi normal maupun patologis. Oleh karena itu, penguasaan teknik dasar laboratorium biokimia menjadi kompetensi esensial bagi mahasiswa, khususnya yang menempuh pendidikan di bidang kesehatan, kedokteran, farmasi, bioteknologi, dan ilmu terkait lainnya. Selain itu, mahasiswa juga perlu memahami keselamatan dan keamanan kerja di laboratorium sebagai bagian dari budaya kerja ilmiah yang profesional.

Buku penuntun praktikum ini disusun untuk memberikan panduan yang sistematis dan terarah bagi mahasiswa dalam melaksanakan kegiatan praktikum Biokimia & Biologi Molekuler. Setiap percobaan dirancang agar mahasiswa mampu memahami prinsip dasar metode yang digunakan, mengikuti prosedur kerja secara benar, serta menganalisis dan menginterpretasikan hasil yang diperoleh secara ilmiah.

Ruang lingkup praktikum dalam buku ini mencakup berbagai pemeriksaan dan teknik dasar biokimia yang relevan dengan pembelajaran tingkat sarjana. Materi praktikum difokuskan pada penerapan metode analisis biokimia untuk memahami karakteristik dan pengukuran senyawa biologis melalui pendekatan eksperimental di laboratorium. Setiap bab praktikum dilengkapi dengan tujuan percobaan, dasar teori singkat, alat dan bahan yang diperlukan, prosedur kerja, serta panduan pengolahan dan pelaporan hasil, sehingga mahasiswa dapat melaksanakan praktikum secara sistematis dan terarah.

Dalam proses penyusunannya, buku penuntun praktikum ini juga banyak mengacu pada buku **Biokimia: Eksperimen Laboratorium** yang diterbitkan oleh Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia sebagai salah satu referensi utama dalam pengembangan materi praktikum biokimia. Penggunaan

referensi tersebut dilakukan sebagai acuan dalam penyusunan konsep dasar, metode percobaan, serta pendekatan praktikum yang telah digunakan secara luas dalam pendidikan biokimia di lingkungan akademik.

Buku penuntun ini diharapkan dapat membantu mahasiswa belajar secara lebih mandiri, terstruktur, dan bertanggung jawab selama kegiatan praktikum berlangsung. Dengan mengikuti panduan yang terdapat dalam buku ini, mahasiswa diharapkan mampu meningkatkan pemahaman teori sekaligus keterampilan praktis, serta membangun sikap teliti, jujur, dan disiplin sebagai calon tenaga profesional di bidang sains dan kesehatan.

Akhirnya, penyusun menyadari bahwa buku penuntun ini masih memiliki keterbatasan. Oleh karena itu, saran dan masukan yang konstruktif sangat diharapkan demi penyempurnaan buku ini di masa yang akan datang.

## DAFTAR ISI

<b>PENDAHULUAN</b>	<b>2</b>
<b>DAFTAR ISI</b>	<b>4</b>
<b>READY REFERENCE</b>	<b>5</b>
<b>The Greek Alphabet</b> .....	<b>5</b>
<b>Amino Acids</b> .....	<b>5</b>
<b>Prefixes used with SI (Système International) Units</b> .....	<b>6</b>
<b>Fractions</b> .....	<b>6</b>
<b>Multiples</b> .....	<b>6</b>
<b>Micro-measurements</b> .....	<b>6</b>
<b>PERATURAN TATA TERTIB LABORATORIUM</b>	<b>7</b>
<b>BIOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULER</b>	<b>7</b>
<b>FAKULTAS KEDOKTERAN</b>	<b>7</b>
<b>UNIVERSITAS TARUMANAGARA</b>	<b>7</b>
<b>SPEKTROFOTOMETRI</b>	<b>9</b>
<b>ISOLASI DAN PEMISAHAN PROTEIN</b>	<b>17</b>
<b>FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KERJA ENZIM</b>	<b>31</b>
<b>METABOLISME KARBOHIDRAT</b>	<b>44</b>
<b>PENETAPAN <math>K_m</math> (TETAPAN MICHAELIS) FOSFATASE HATI SAPI</b>	<b>53</b>
<b>AKTIVITAS SPESIFIK GLUTAMAT-PIRUVAT TRANSAMINASE (GPT) DAN GLUTAMAT-OKSALOASETAT TRANSAMINASE (GOT) PADA HATI DAN JANTUNG SAPI</b>	<b>59</b>
<b>SIFAT-SIFAT MEMBRAN</b>	<b>67</b>
<b>HEMOGLOBIN DAN SIFAT MEMBRAN</b>	<b>75</b>
<b>HIPOKSIA, OKSIDATIF STRESS, DAN ANTIOKSIDAN</b>	<b>86</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>94</b>

## READY REFERENCE

### The Greek Alphabet

<b>A</b>	<i><math>\alpha</math></i>	Alpha	<b>N</b>	<i><math>\nu</math></i>	Nu
<b>B</b>	<i><math>\beta</math></i>	Beta	<b>Ξ</b>	<i><math>\xi</math></i>	Xi
<b>Γ</b>	<i><math>\gamma</math></i>	Gamma	<b>Ο</b>	<i><math>ο</math></i>	Omicron
<b>Δ</b>	<i><math>\delta</math></i>	Delta	<b>Π</b>	<i><math>\pi</math></i>	Pi
<b>E</b>	<i><math>\epsilon</math></i>	Epsilon	<b>P</b>	<i><math>\rho</math></i>	Rho
<b>Z</b>	<i><math>\zeta</math></i>	Zeta	<b>Σ</b>	<i><math>\sigma</math></i>	Sigma
<b>H</b>	<i><math>\eta</math></i>	Eta	<b>T</b>	<i><math>\tau</math></i>	Tau
<b>Θ</b>	<i><math>\theta</math></i>	Theta	<b>Υ</b>	<i><math>\upsilon</math></i>	Upsilon
<b>I</b>	<i><math>\iota</math></i>	Iota	<b>Φ</b>	<i><math>\varphi</math></i>	Phi
<b>K</b>	<i><math>\kappa</math></i>	Kappa	<b>X</b>	<i><math>\chi</math></i>	Chi
<b>Λ</b>	<i><math>\lambda</math></i>	Lambda	<b>Ψ</b>	<i><math>\psi</math></i>	Psi
<b>M</b>	<i><math>\mu</math></i>	mu	<b>Ω</b>	<i><math>\omega</math></i>	omega

### Amino Acids

Alanine	Ala	A	Methionin e	Met	M
Cysteine	Sys	C	Asparagin e	Asn	N
Aspartic Acid	Asp	D	Proline	Pro	P
Glutamic Acid	Glu	E	Glutamine	Gln	Q
Phenylalanine	Phe	F	Arginine	Arg	R
Glycine	Gly	G	Serine	Ser	S
Histidine	His	H	Threonine	Thr	T
Isoleucine	Ile	I	Tryptopha n	Trp	W
Lysine	Lys	K	Tyrosine	Tyr	Y
Leucine	Leu	L	valine	Val	V

## Prefixes used with SI (Système International) Units

### Fractions

Prefix	Value	Symbol	Prefix	Value	Symbol
Atto	$10^{-18}$	a	Milli	$10^{-3}$	m
Centi	$10^{-2}$	c	Nano	$10^{-9}$	n
Deci	$10^{-1}$	d	Pico	$10^{-12}$	p
Femto	$10^{-15}$	f	Yocto	$10^{-24}$	y
Micro	$10^{-6}$	$\mu$	Zepto	$10^{-21}$	z

### Multiples

Prefix	Value	Symbol	Prefix	Value	Symbol
Deca	10	da	Mega	$10^6$	M
Exa	$10^{18}$	E	Peta	$10^{15}$	P
Giga	$10^9$	G	Tera	$10^{12}$	T
Hecto	$10^2$	h	Yotta	$10^{24}$	Y
Kilo	$10^3$	k	Zetta	$10^{21}$	Z

### Micro-measurements

$$1 \text{ \AA} (\text{\AA ngstr\o m}) = 10^{-1} \text{ nm} = 10^{-4} \mu\text{m} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ nm (nanometer)} = 10^{-3} \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ mm} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$1 \mu\text{m (micrometer, formerly micron)} = 10^{-3} \text{ mm} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$1 \text{ mm (millimeter)} = 10^{-1} \text{ cm} = 10^{-3} \text{ m} = 10^{-6} \text{ km}$$

**PERATURAN TATA TERTIB LABORATORIUM  
BIOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS TARUMANAGARA**

---

**Tata Tertib Praktikum**

1. Setiap mahasiswa wajib mengikuti seluruh kegiatan praktikum sesuai jadwal yang telah ditetapkan.
2. Mahasiswa harus hadir tepat waktu di ruang praktikum. Keterlambatan lebih dari 15 menit tidak diperkenankan mengikuti praktikum pada hari tersebut dan akan dianggap tidak hadir (absen). Tidak tersedia kesempatan untuk mengulang praktikum yang telah terlewat.
3. Selama berada di ruang praktikum, mahasiswa wajib mengenakan jas laboratorium (jas praktikum). Selain itu, mahasiswa harus membawa perlengkapan pribadi berupa buku laporan, kain lap/serbet, sabun, dan tisu gulung.
4. Sebelum memasuki ruang praktikum, mahasiswa diwajibkan mempelajari materi yang berkaitan dengan kegiatan praktikum hari itu dan menyiapkan catatan awal di dalam buku laporan. Setiap percobaan harus dilaksanakan dengan cermat dan sesuai petunjuk kerja, serta dilaporkan secara tertulis berdasarkan hasil pengamatan pribadi.
5. Hasil praktikum wajib diperlihatkan kepada instruktur/dosen setelah kegiatan praktikum selesai.
6. Selama kegiatan praktikum berlangsung, mahasiswa dilarang melakukan hal-hal berikut:
  - a. Bersenda gurau dan mengganggu teman selama bekerja
  - b. Melakukan aktivitas yang tidak berkaitan dengan praktikum
  - c. Meninggalkan ruang praktikum tanpa seizin instruktur/dosen
  - d. Makan, minum, atau merokok di dalam ruang praktikum
  - e. Membuang sampah ke dalam bak cuci — gunakan tempat sampah yang telah disediakan
  - f. Menempatkan tas atau buku yang tidak diperlukan di meja kerja
7. Mahasiswa bertanggung jawab atas kebersihan dan kerapian area kerja masing-masing.

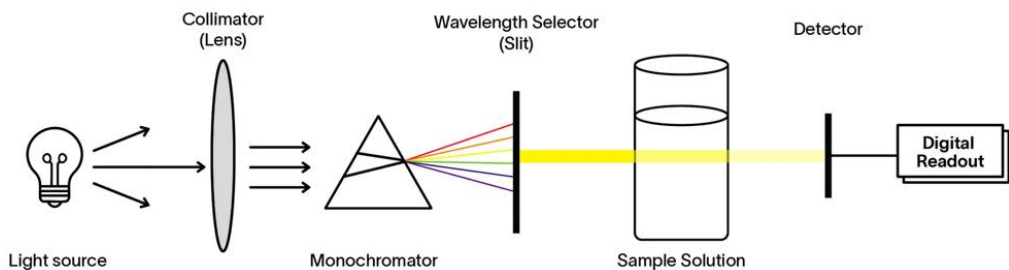
8. Mahasiswa diharapkan menggunakan bahan kimia secara hemat serta berhati-hati dalam menggunakan peralatan laboratorium.
9. Setiap mahasiswa bertanggung jawab atas peralatan laboratorium yang digunakan selama praktikum. Kerusakan atau kehilangan alat harus segera dilaporkan kepada instruktur/dosen. Penggantian alat yang rusak atau hilang menjadi tanggung jawab mahasiswa yang bersangkutan dan harus diselesaikan dalam waktu maksimal 1 (satu) minggu.
10. Mahasiswa yang berhalangan hadir wajib melapor ke bagian Biokimia dan Biologi Molekuler disertai bukti tertulis yang sah. Laporan ini harus disampaikan selambat-lambatnya 3 (tiga) hari setelah hari praktikum yang tidak diikuti.

# PRAKTIKUM SPEKTROFOTOMETRI

---

## Latar Belakang

Ketika seberkas sinar putih melewati larutan berwarna, sebagian panjang gelombang cahaya ( $\lambda$ ) akan diserap oleh zat terlarut, sedangkan sisanya diteruskan atau dipantulkan. Panjang gelombang yang diserap ini bergantung pada struktur kimia dan sifat optik zat tersebut (1). Sebagai contoh, larutan yang tampak merah menyerap cahaya pada daerah panjang gelombang kuning hingga biru, dan memantulkan atau meneruskan cahaya merah, sehingga warna merahlah yang tampak oleh mata (2). Dengan demikian, warna suatu larutan sebenarnya ditentukan oleh bagian dari spektrum cahaya tampak yang tidak diserap oleh larutan, melainkan diteruskan atau dipantulkan.



**Gambar 1** Prinsip dan skema alat spektrofotometer

(Sumber: <https://lifesciences.danaher.com/us/en/library/spectrophotometry.html>)

Fenomena ini juga dapat diamati dalam kehidupan sehari-hari. Intensitas warna suatu larutan sering kali digunakan untuk memperkirakan konsentrasi zat terlarut secara kasat mata. Sebagai contoh, larutan teh yang dibuat lebih pekat akan tampak berwarna coklat lebih gelap dibandingkan larutan teh yang lebih encer pada volume yang sama (3). Hubungan antara intensitas warna dan konsentrasi ini menjadi dasar dari metode spektrofotometri, yaitu teknik analisis kuantitatif yang memanfaatkan penyerapan cahaya oleh zat dalam larutan. Dalam spektrofotometri, cahaya dari sumber terlebih dahulu diuraikan menjadi cahaya monokromatis menggunakan prisma atau kisi difraksi, lalu dilewatkan melalui larutan sampel yang

akan dianalisis (4). Cahaya monokromatis ini adalah cahaya dengan satu panjang gelombang spesifik, dan akan diserap secara karakteristik oleh zat yang diuji.

Hubungan kuantitatif antara jumlah cahaya yang diserap dan konsentrasi zat dalam larutan dijelaskan melalui hukum Beer–Lambert. Hukum ini menyatakan bahwa intensitas cahaya yang diserap oleh larutan berwarna akan menurun secara eksponensial sebanding dengan konsentrasi zat penyerap dan panjang lintasan cahaya yang melewati larutan (3,4). Dalam praktik laboratorium, hukum ini dituliskan sebagai:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Keterangan:

A (Absorbansi): Jumlah cahaya yang diserap (serapan)

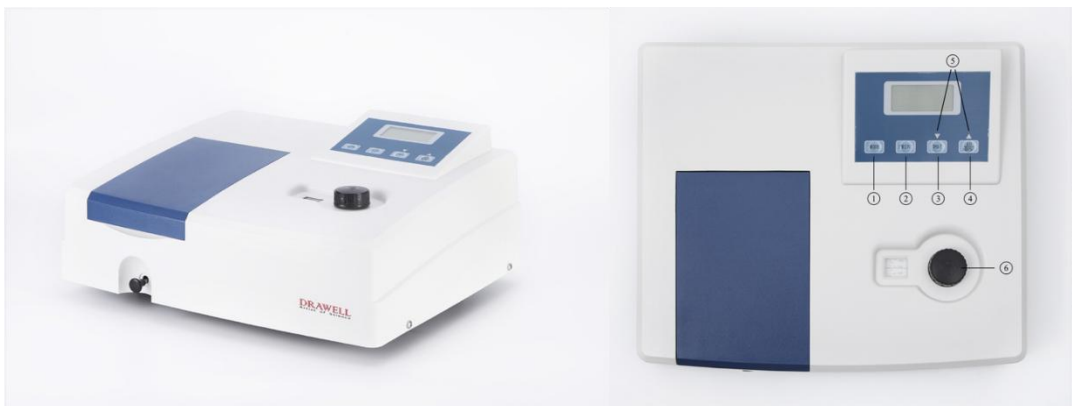
$\varepsilon$  (Epsilon): Koefisien ekstingsi molar (L/mol cm)

c: Konsentrasi zat terlarut (mol/L)

l: Panjang lintasan cahaya (cm) – umumnya 1 cm dalam kuvet standar

Karena nilai  $\varepsilon$  dan  $l$  dapat dianggap konstan dalam pengukuran tertentu, maka absorbansi akan sebanding langsung dengan konsentrasi zat dalam larutan. Prinsip inilah yang menjadikan spektrofotometri sebagai metode utama dalam analisis kuantitatif di berbagai bidang kimia, biologi, hingga farmasi.

Pada praktikum ini, akan digunakan alat spektrofotometer VIS 721G, namun petunjuk penggunaan alat disesuaikan dengan jenis (merk/tipe) alat yang digunakan.



**Gambar 2** Spektrofotometer Vis 721G

(Sumber: <https://www.drawellanalytical.com/dw-721g-vis-spectrophotometer/>)

Pada spektrofotometer VIS 721G yang digunakan, terdapat beberapa tombol kontrol yang digunakan untuk mengatur proses pengukuran. Adapun fungsi dari masing-masing tombol tersebut adalah sebagai berikut:

1. MODE: Memilih mode pengukuran (Absorbansi/% Transmittansi)
2. PRINT: Mencetak hasil pengukuran
3. 0%T: Kalibrasi nol (0% transmittansi)
4. A0/100%T: Mengatur *blank* (100% transmittansi / 0 absorbansi)
5. ▼/▲: Navigasi atau penyesuaian pengaturan
6. Knob  $\lambda$ : Mengatur panjang gelombang pengukuran

*Catatan:*

- Setiap memasukan kuvet ke dalam tempat sampel, bagian luar kuvet harus dilap sampai bersih dan kering dengan kertas tisu.
- Jangan sampai ada cairan yang tumpah pada alat.
- Untuk setiap penetapan pada panjang gelombang yang berbeda, pada setiap  $\lambda$  alat harus ditera dengan aquades (A harus menunjukkan angka 0 atau 100%T).

## **Tujuan Praktikum**

Berdasarkan penjelasan mengenai prinsip penyerapan cahaya oleh larutan berwarna dan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi melalui hukum Beer-Lambert, maka praktikum ini bertujuan untuk:

1. Menentukan serapan maksimum suatu larutan pada panjang gelombang tertentu.
2. Membuktikan kebenaran hukum Beer-Lambert melalui hubungan linier antara absorbansi dan konsentrasi.
3. Menentukan konsentrasi (kadar) zat dalam larutan berdasarkan data hasil pengukuran absorbansi.

## **Macam Percobaan**

### **1. Penentuan Panjang Gelombang dengan Serapan Maksimum**

**Prinsip Dasar:** Setiap zat akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu

**Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Spektrofotometer, kuvet 4 mL
- ii. Bahan: Larutan kobalt-nitrat 10 mM

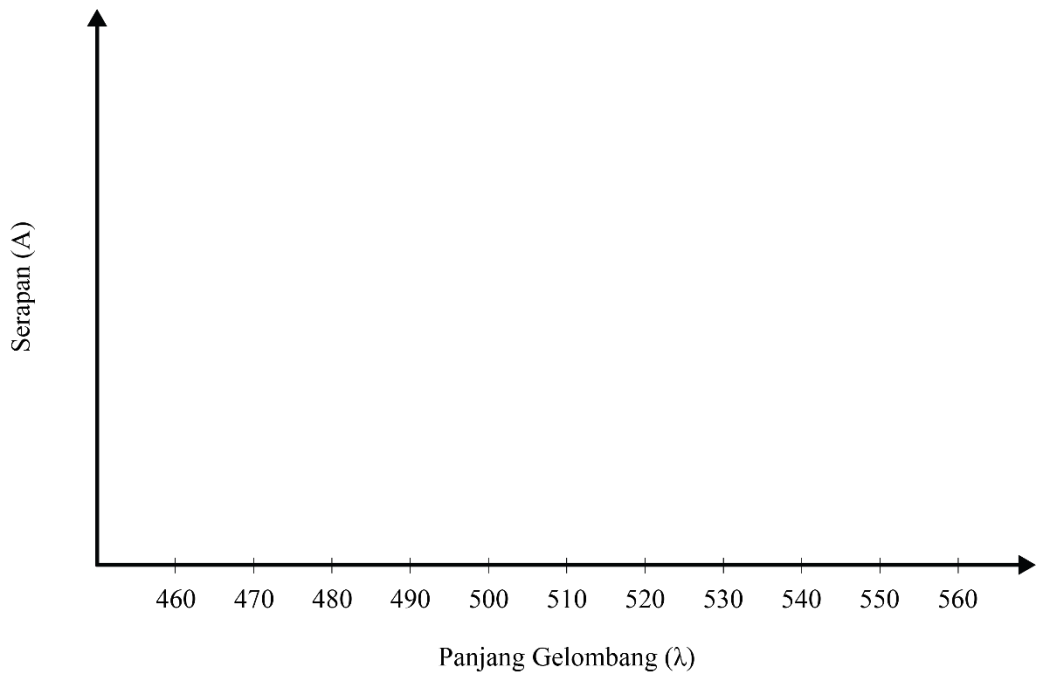
### Cara Kerja:

- ① Masukkan larutan kobalt-nitrat 10 mM ke dalam kuvet
- ② Baca serapan (A) larutan tersebut pada panjang gelombang 460-560 nm
- ③ Buatlah kurva hubungan serapan (A) dan panjang gelombang

### Hasil:

Panjang Gelombang ( $\lambda$ ) (nm)	Absorbansi (A)
460	
470	
480	
490	
500	
510	
520	
530	
540	
550	
560	

Kurva hubungan panjang gelombang ( $\lambda$ ) dengan serapan (A) kobalt nitrat



**Kesimpulan:**

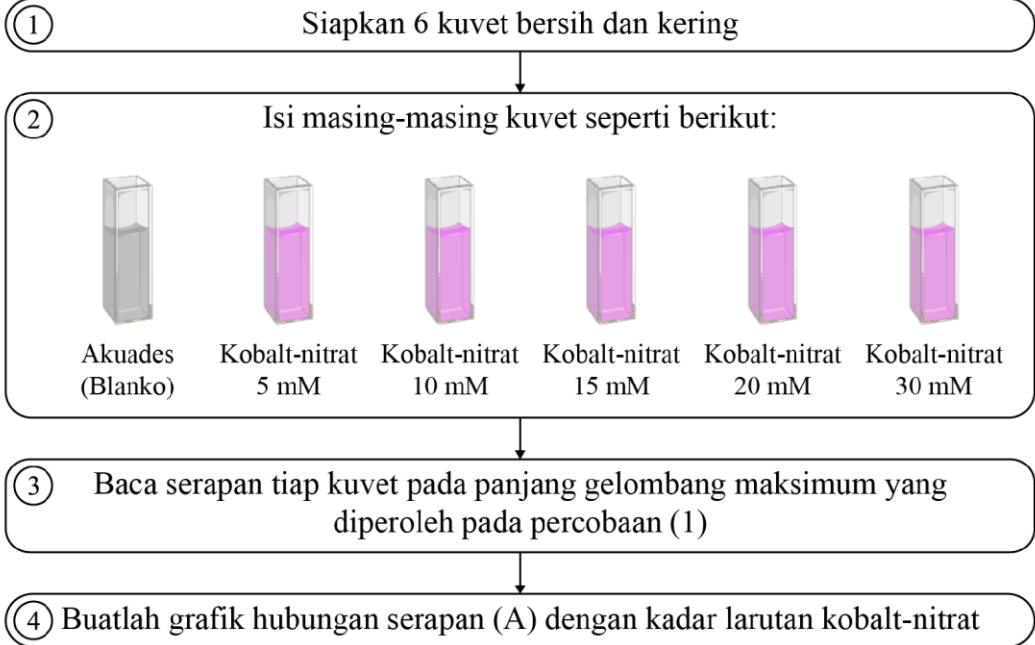
## **2. Hubungan Serapan dengan Kadar Zat dalam Larutan (Hukum Beer-Lambert)**

**Prinsip Dasar:** Jumlah cahaya yang diserap oleh suatu zat pada gelombang tertentu sebanding dengan kadar tersebut di dalam larutan.

**Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Spektrofotometer, 1 rangkaian tabung reaksi
- ii. Bahan: Larutan kobalt-nitrat (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM)

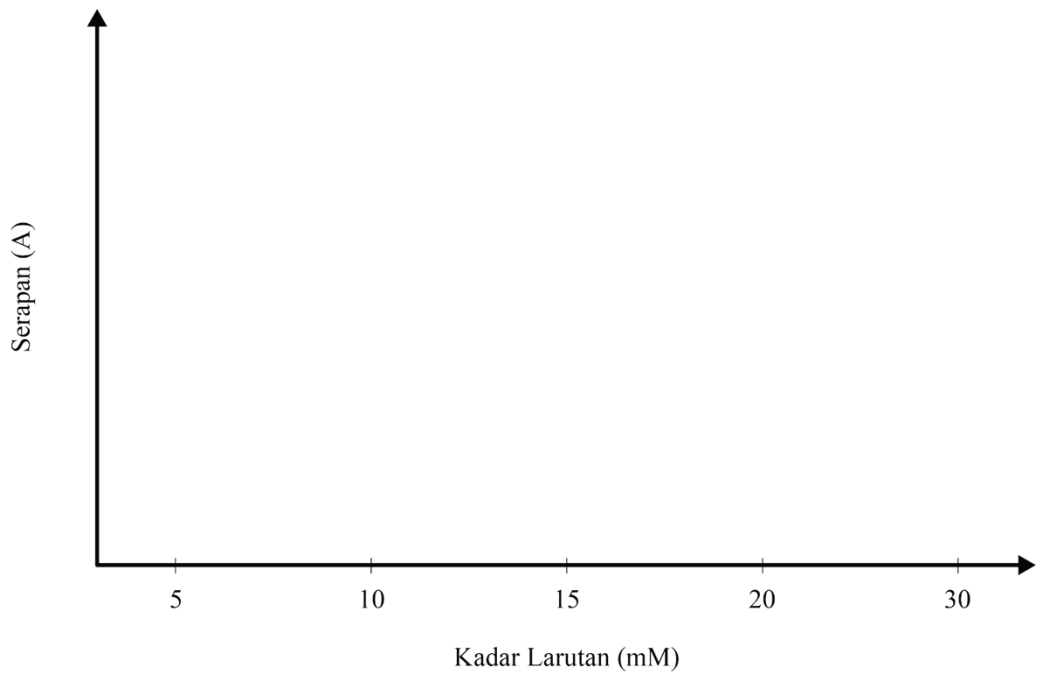
### Cara Kerja:



### Hasil:

Kadar larutan kobalt-nitrat	Absorbansi (A) pada $\lambda$ max
5 mM	
10 mM	
15 mM	
20 mM	
30 mM	

Grafik hubungan panjang kadar (mM) dengan serapan (A)



Buatlah kurva standar berdasarkan grafik hubungan panjang kadar (mM) dengan serapan (A), sehingga didapatkan persamaan garis regresi linear sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

y: Nilai absorbansi hasil pengukuran

a: Kemiringan garis (*slope*)

x: Kadar atau konsentrasi larutan

b: Intersep pada sumbu y saat  $x=0$

**Kesimpulan:**

### 3. Penentuan Kadar Suatu Zat Dalam Larutan

**Prinsip Dasar:** Kadar suatu zat dalam larutan dapat diketahui dengan membandingkan dengan kadar standar.

#### **Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Spektrofotometer
- ii. Bahan: Larutan kobalt-nitrat (yang akan ditentukan)

#### **Cara Kerja:**

- ① Baca serapan (A) larutan kobalt-nitrat (U1, U2, & U3) pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada percobaan (1)
- ② Hitung kadar larutan U1, U2, & U3 berdasarkan kurva standar yang telah dibuat pada percobaan (2)

#### **Hasil:**

Larutan	Absorbansi (A)	Kadar (mM)
U1		
U2		
U3		

# PRAKTIKUM

## ISOLASI DAN PEMISAHAN PROTEIN

---

### Latar Belakang

Protein merupakan molekul organik yang paling melimpah di dalam sel, menyusun sekitar 50-70% dari berat kering sel tergantung pada jenis dan aktivitas seluler (5). Protein memiliki peran sentral dalam menjalankan berbagai fungsi dasar kehidupan. Sebagai contoh, protein berperan dalam kontraksi otot untuk menghasilkan gerak, bertindak sebagai enzim dalam proses metabolisme, serta membawa dan mentransduksi informasi dari luar ke dalam sel maupun antar bagian dalam sel (6,7). Selain itu, protein juga berperan dalam regulasi ekspresi gen, yaitu mengatur kapan dan seberapa banyak informasi dalam DNA diungkapkan untuk sintesis protein, termasuk protein itu sendiri (7,8). Dengan demikian, protein secara tidak langsung turut mengendalikan sistem ekspresi yang merekam dan menerjemahkan informasi genetik (8).

Secara kimiawi, protein merupakan heteropolimer yang tersusun atas asam-asam amino, terhubung satu sama lain melalui ikatan peptida (9). Menariknya, semua protein yang berasal dari makhluk hidup manapun tersusun hanya dari 20 jenis asam amino standar (10). Perbedaan antara satu jenis protein dengan yang lain ditentukan oleh jumlah, urutan, dan posisi asam amino dalam rantai polipeptidanya (8). Dua ciri umum dari seluruh asam amino ini adalah konfigurasi L dan keberadaan satu gugus karboksil ( $-COOH$ ) serta satu gugus amino ( $-NH_2$ ) yang terikat pada atom karbon  $\alpha$  ( $C\alpha$ ) (9,10). Variasi kimia antar molekul protein ditentukan oleh perbedaan rantai samping (R) dari masing-masing asam amino, karena rantai samping inilah yang menentukan sifat kimia dan biologis protein secara keseluruhan (11). Rantai samping tidak ikut membentuk ikatan peptida, tetapi turut menentukan muatan total protein dalam larutan, bersama dengan gugus amino bebas di ujung N-terminal dan gugus karboksil bebas di ujung C-terminal (12).

Dalam air, molekul protein dapat membentuk larutan koloid karena ukurannya yang besar dan kemampuannya berinteraksi dengan molekul air melalui ikatan hidrogen, membentuk mantel air di sekelilingnya (13). Sifat ini berperan penting dalam menjaga stabilitas dan kelarutan protein di dalam larutan (14). Menariknya, keberadaan elektrolit dalam konsentrasi rendah dapat meningkatkan kelarutan protein melalui fenomena "*salting in*", sedangkan konsentrasi elektrolit tinggi justru dapat menyebabkan presipitasi protein melalui proses "*salting out*". Kedua sifat ini dimanfaatkan dalam proses pemisahan dan pemurnian protein (15). Selain itu, perbedaan ukuran molekul (yang bergantung pada jumlah asam amino penyusunnya)

serta variasi muatan (akibat jenis dan jumlah asam amino bermuatan) antara satu protein dengan yang lainnya menjadi dasar dari teknik pemisahan protein yang akan digunakan dalam praktikum ini (16,17).

## **Tujuan Praktikum**

Berdasarkan penjelasan mengenai prinsip isolasi dan pemisahan protein, maka praktikum ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui reaksi umum berdasarkan adanya beberapa ikatan peptida pada suatu protein dan mampu menggunakannya untuk melacak protein dalam suatu bahan.
2. Melakukan pemisahan suatu protein dari kelompok protein lain secara reversibel dengan menggunakan larutan garam divalen konsentrasi tinggi (*salting out*) dan menerangkan mekanisme pemisahan tersebut.
3. Melakukan pemisahan protein secara reversibel, dengan menggunakan bahan higroskopis dan menerangkan mekanisme pemisahan tersebut.
4. Melakukan pemisahan protein secara denaturasi ireversibel dengan menggunakan pereaksi alkaloid, menerangkan mekanisme kerjanya dan mampu menggunakannya untuk melacak protein.
5. Memperlihatkan kemampuan logam berat dalam mengendapkan dan mendenaturasi protein dan menjelaskan masalah yang ditimbulkan oleh logam berat sebagai pencemar lingkungan.
6. Mengetahui cara pemisahan suatu protein dari protein lain ataupun senyawa lain, berdasarkan perbedaan berat molekul, dengan menggunakan cara kromatografi gel penyaring molekul sederhana.

## **Macam Percobaan**

### **1. Uji Biuret**

**Tujuan Praktikum:** Menunjukkan bahwa protein memiliki ikatan peptida yang dapat bereaksi positif terhadap uji biuret, suatu reaksi spesifik yang tidak terjadi pada makromolekul lain.

**Prinsip Dasar:** Ikatan-ikatan peptida yang menyusun protein dan polipeptida akan menghasilkan warna lembayung apabila direaksikan dengan ion  $\text{Cu}^{2+}$  dalam suasana larutan yang bersifat alkali.

### **Alat dan Bahan:**

- Alat: Tabung reaksi
- Bahan: Larutan albumin atau putih telur, larutan enzim amilase, larutan pati 1%, NaOH 10%, dan larutan  $\text{CuSO}_4$  0.1%

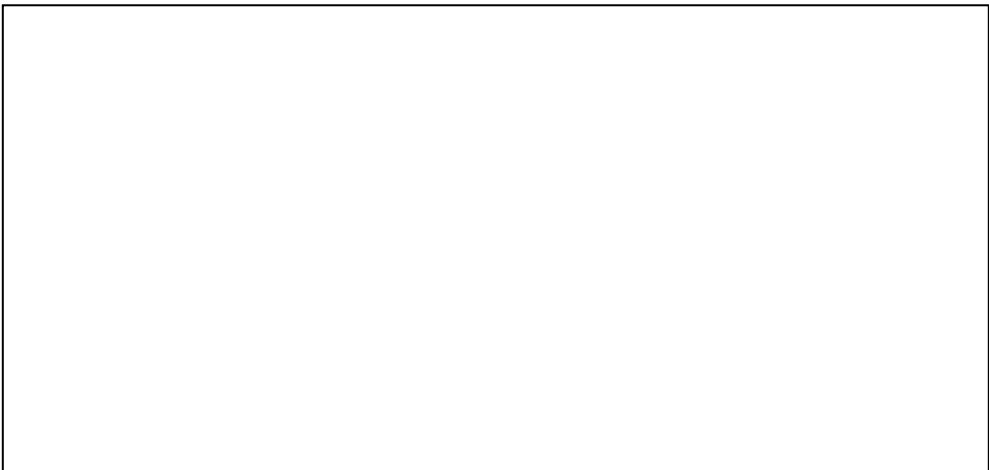
### Cara Kerja:



### Kesimpulan:

### Pertanyaan:

1. Apakah uji ini akan positif untuk asam amino?
2. Asam amino apa saja yang menyusun protein?
3. Bagaimana pengelompokan asam amino?
4. Apa yang dimaksud dengan asam amino esensial? Asam amino apa saja yang esensial?
5. Gambarkan ikatan peptida!



## 2. Pengendapan protein dengan larutan garam konsentrasi tinggi (*salting out*)

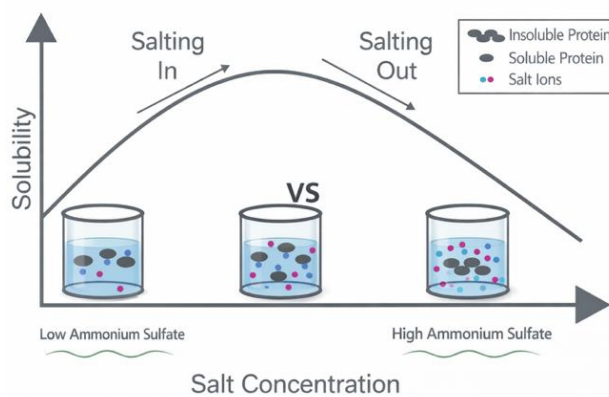
**Tujuan Praktikum:** Memperlihatkan, bahwa protein mempunyai ikatan peptida yang bereaksi positif dengan uji biuret. Reaksi ini tidak terjadi pada makromolekul lain.

### **Prinsip Dasar:**

Sebuah molekul dapat larut dalam air jika mampu membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air, sehingga molekul tersebut dapat tersebar merata dalam pelarut. Kemampuan berinteraksi ini sangat bergantung pada keberadaan gugus polar atau bermuatan. Keberadaan muatan listrik juga memfasilitasi kelarutan karena muatan sejenis pada molekul yang berbeda akan saling tolak-menolak, mencegah terjadinya agregasi antar molekul (12,13). Oleh karena itu, kelarutan suatu zat dipengaruhi oleh sifat kimia serta polaritas gugus-gugus yang dimilikinya.

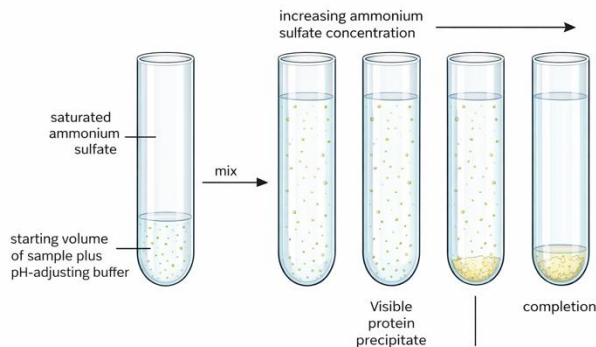
Protein tergolong makromolekul karena memiliki berat molekul yang relatif tinggi. Secara umum, protein bersifat larut dalam air karena adanya dua karakteristik penting. Pertama, gugus karbonil dan amina dalam struktur peptidanya dapat menjalin ikatan hidrogen dengan molekul air. Kedua, rantai samping asam amino dalam protein banyak yang bersifat hidrofilik atau memiliki muatan listrik, yang turut memperkuat interaksi dengan pelarut (15,16). Selain itu, muatan sejenis yang terdapat di permukaan protein akan saling tolak-menolak, sehingga mencegah terjadinya aglomerasi dan mendukung proses pelarutan. Fenomena peningkatan kelarutan ini dikenal sebagai *salting in* (17).

Kondisi yang menyebabkan hilangnya air dari sekitar permukaan protein akan secara drastis menurunkan kelarutannya dan mengarah pada pengendapan. Salah satu kondisi tersebut adalah penambahan garam dalam konsentrasi tinggi, yang dapat menarik air dari protein serta menetralkan muatan-muatan di permukaannya. Akibatnya, molekul-molekul protein menjadi lebih mudah saling berinteraksi dan membentuk agregat yang tidak larut (13,14). Karena proses ini tidak melibatkan perubahan struktur kimia dari protein, maka pengendapan yang terjadi bersifat reversibel. Jika kondisi larutan dikembalikan ke semula, kelarutan dan aktivitas biologis protein dapat pulih kembali.



**Gambar 3** Prinsip *salting out*

(Sumber: <https://www.goldbio.com/blogs/articles/understanding-salting-in-and-salting-out-salt-as-a-protein-purification-tool>)



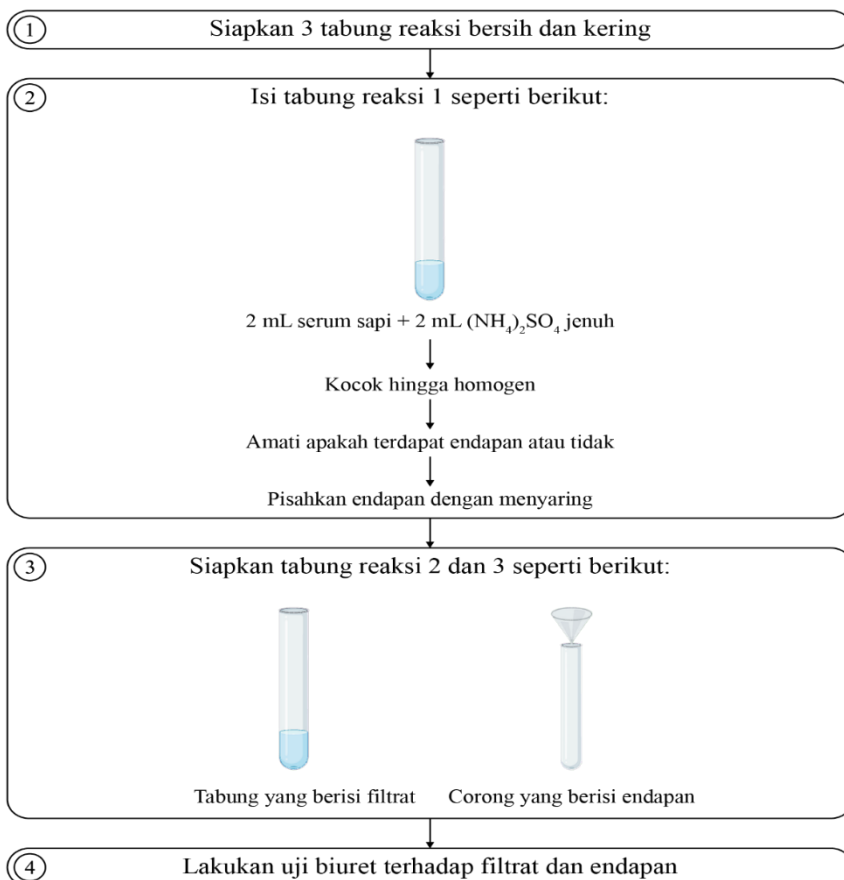
**Gambar 4** Pengendapan protein dengan larutan garam (18)

Garam-garam yang mengandung ion bervalensi dua (divalen) lebih efektif untuk mengendapkan protein dibandingkan garam monovalen, karena ion-ion divalen akan menghasilkan lebih banyak partikel terlarut yang berinteraksi dengan molekul air. Sebagai contoh, protein seperti globulin dapat diendapkan hanya dengan larutan amonium sulfat  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  setengah jenuh, sedangkan garam seperti natrium klorida (NaCl) memerlukan kondisi jenuh untuk menghasilkan efek yang sama. Protein lain, seperti albumin, memerlukan larutan  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  yang benar-benar jenuh untuk dapat mengendap. Dalam kasus tertentu, penambahan sedikit asam mineral diperlukan untuk mengendapkan albumin menggunakan NaCl (19–21).

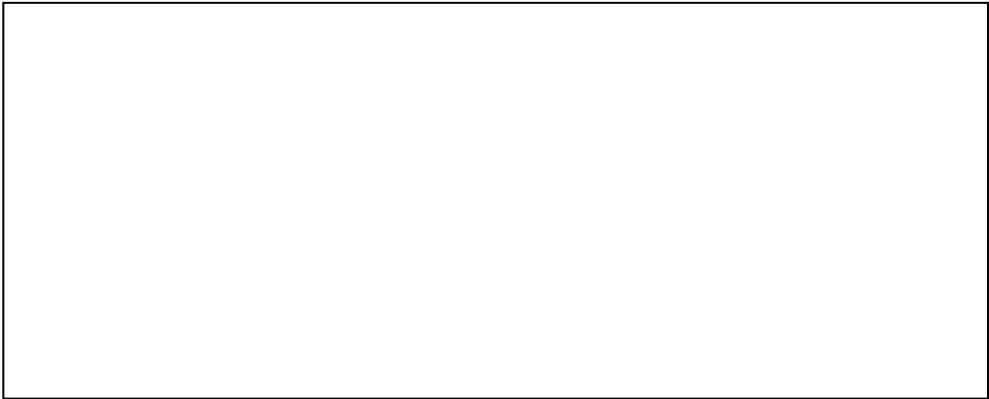
### Alat dan Bahan:

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Serum sapi, larutan amonium sulfat  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  jenuh, larutan NaOH 10%, dan larutan  $\text{CuSO}_4$  0.1%

### Cara Kerja:



**Kesimpulan:**



**Pertanyaan:**

1. Pada penambahan satu volume amonium sulfat jenuh ke dalam satu volume serum terjadi pengendapan protein. Apakah nama protein tersebut?
2. Apa nama protein serum yang tidak dapat diendapkan pada penambahan ammonium sulfat jenuh tersebut?
3. Apa fungsi protein tersebut dalam darah dan dimana disintesis?
4. Pada keadaan apa saja terjadi defisiensi protein tersebut dan apa gejala utamanya?



### 3. Pemisahan protein dengan etanol absolut

**Tujuan Praktikum:** Memperlihatkan bahwa sebagai makromolekul yang larut, protein dapat dipisahkan dengan mengendapkannya dengan penambahan etanol absolut.

#### **Prinsip Dasar:**

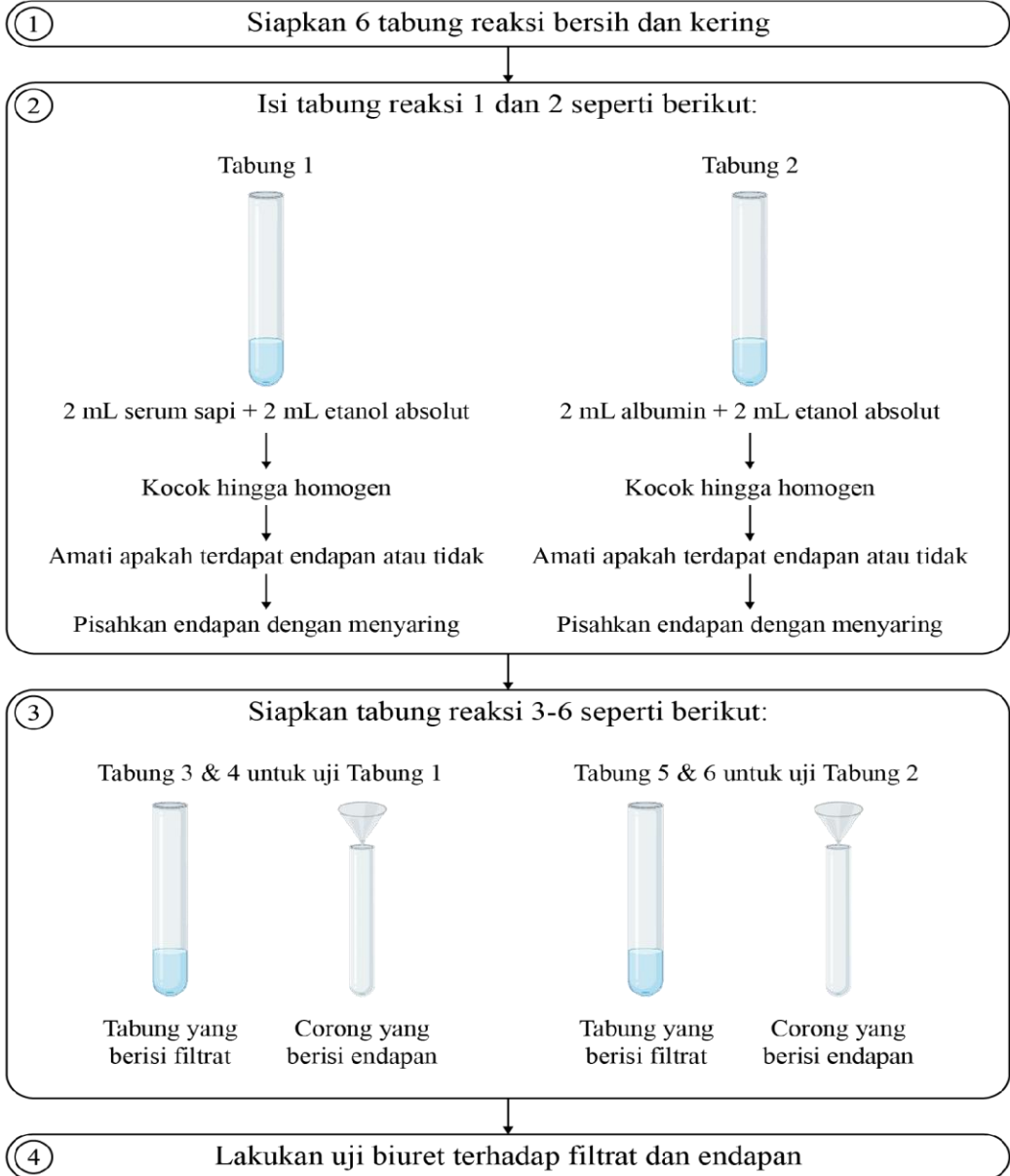
Etanol absolut memiliki sifat higroskopis yang tinggi, sehingga sangat efektif dalam menarik molekul air dari lingkungan sekitarnya. Ketika ditambahkan ke dalam larutan protein, etanol akan menarik molekul-molekul air yang sebelumnya membentuk ikatan hidrogen dengan gugus-gugus polar pada permukaan protein. Hilangnya interaksi ini menyebabkan terjadinya agregasi antar molekul protein akibat meningkatnya interaksi hidrofobik, yang kemudian mengarah pada pembentukan endapan protein (22,23). Jika endapan protein ini dibiarkan dalam kontak yang lama dengan etanol, maka akan terjadi denaturasi protein yang bersifat ireversibel, sehingga protein tidak dapat larut kembali ke dalam pelarut asalnya (24).

Pada suhu rendah dan dengan konsentrasi etanol yang bervariasi, metode fraksinasi protein telah dikembangkan oleh Edwin J. Cohn pada tahun 1940-an, yang memungkinkan pemisahan fraksi protein serum manusia. Fraksi kelima (fraksi V) yang dihasilkan dari metode ini didominasi oleh protein albumin, dan prinsip ini masih digunakan dalam isolasi protein hingga saat ini (25).

#### **Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Serum, larutan albumin telur, etanol absolut, larutan NaOH encer, dan larutan  $\text{CuSO}_4$

### Cara Kerja :



### Kesimpulan:

**Pertanyaan:**

1. Sebutkan secara garis besar protein utama fraksi Chon I sampai V!
2. Apakah fungsi masing-masing protein tersebut?

**4. Pengendapan protein secara denaturasi irreversible**

**4.1. Pengendapan dengan pereaksi alkaloid**

**Tujuan Praktikum :** Memisahkan protein dari larutan dengan cara mengendapkannya dengan senyawa yang bereaksi dengan protein tersebut.

**Prinsip Dasar :**

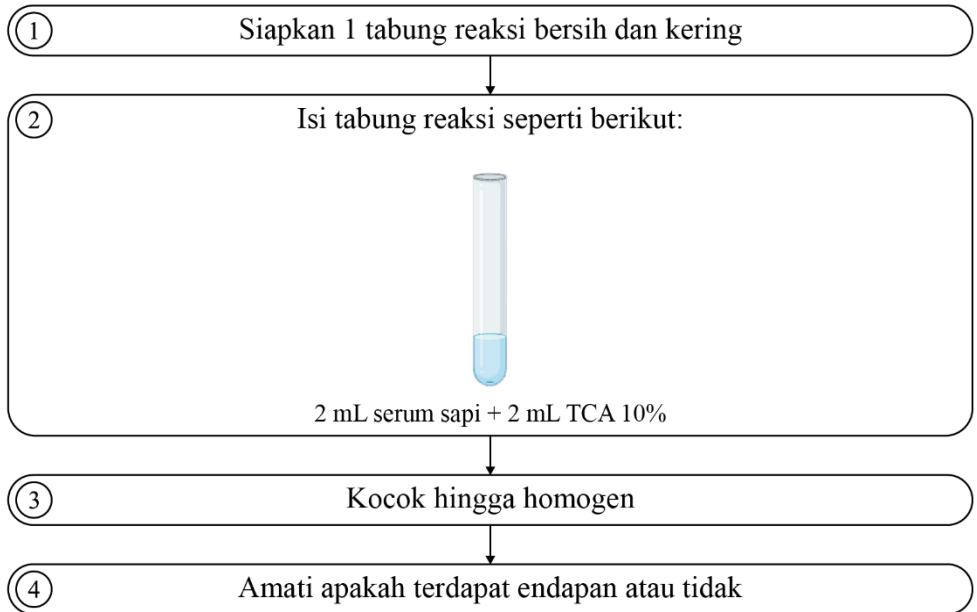
Pereaksi alkaloid merupakan kelompok asam organik yang mampu membentuk endapan dengan senyawa alkaloid maupun protein. Reaksi ini umumnya terjadi karena keberadaan gugus nitrogen trivalen yang terdapat pada kedua jenis molekul tersebut. Nitrogen trivalen bersifat basa lemah dan dapat berinteraksi dengan asam kuat membentuk garam tidak larut dalam air, sehingga memicu terjadinya pengendapan (26).

Salah satu senyawa yang paling umum digunakan untuk proses deproteinasi adalah asam trikloroasetat (TCA), yang efektif dalam mengendapkan protein dari larutan biologis seperti plasma, serum, atau cairan ekstraseluler (27). Sementara itu, asam sulfosalisilat digunakan secara luas dalam uji diagnostik klinis untuk mendeteksi keberadaan protein, khususnya albumin, dalam urin pasien dengan kondisi patologis seperti sindrom nefrotik atau gangguan ginjal lainnya (27,28).

**Alat dan Bahan :**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Serum, dan asam trikloroasetat (TCA: *trichloroacetic acid*) 10%

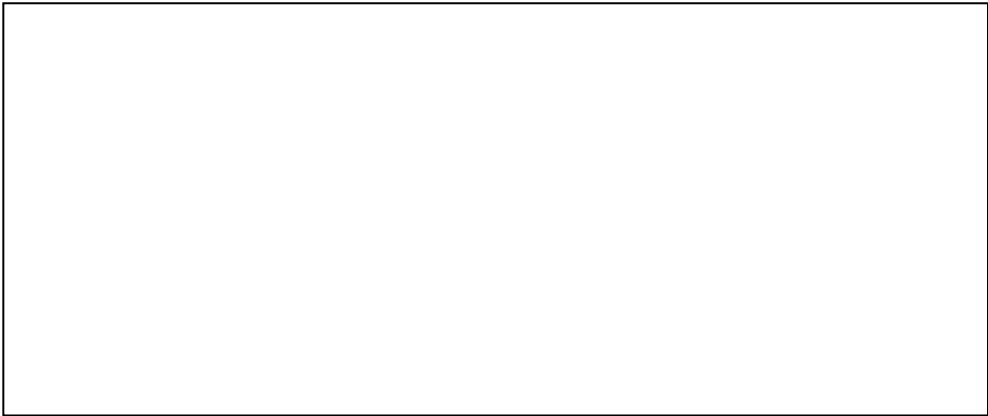
### Cara Kerja :



### Kesimpulan:

### Pertanyaan :

1. Tuliskan rumus TCA dan asam sulfosalisilat!
2. Apakah urin normal mengandung protein?
3. Pada keluhan apa saja terjadi proteinuria (protein terlacak dalam urin)? Mengapa?



## **4.2. Pengendapan protein dengan logam berat**

### **Tujuan Praktikum**

Menunjukkan bahwa logam berat dapat mengendapkan protein melalui mekanisme denaturasi yang bersifat ireversibel.

### **Prinsip Dasar**

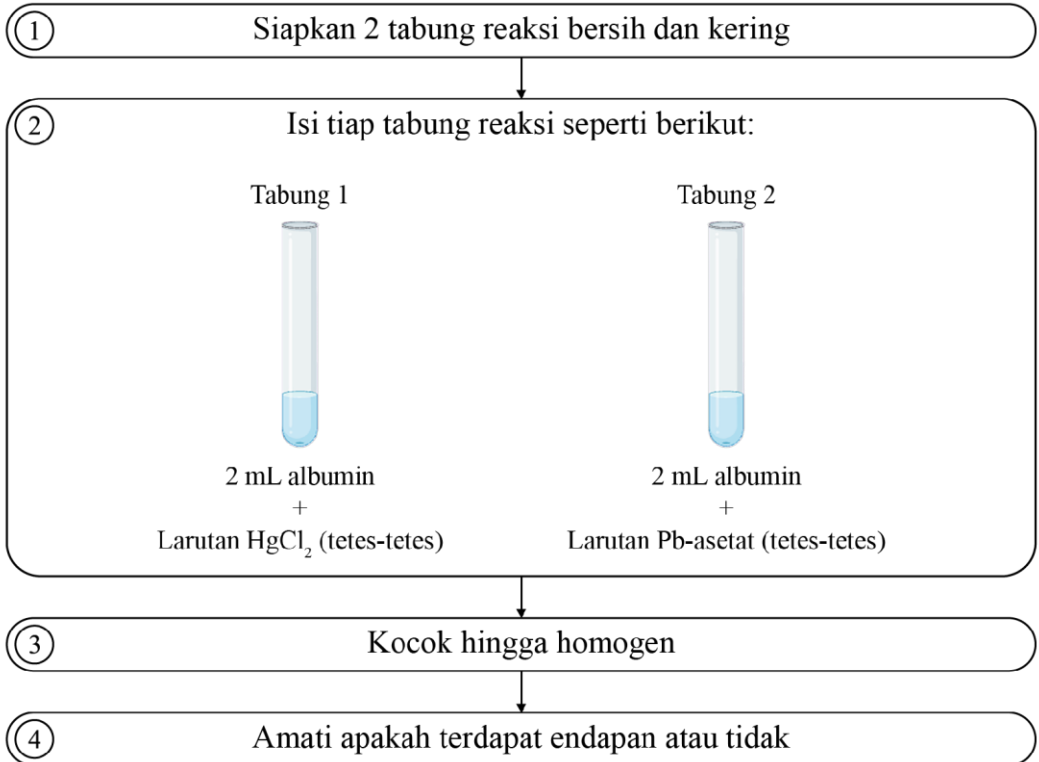
Logam berat memiliki kemampuan untuk menyebabkan denaturasi dan pengendapan protein melalui pembentukan kompleks ionik. Proses ini berlangsung ketika gugus-gugus bermuatan negatif di permukaan molekul protein berinteraksi dengan kation logam berat, membentuk senyawa garam yang tidak larut dalam larutan. Jumlah protein yang mengendap umumnya sebanding dengan konsentrasi logam berat yang ditambahkan, selama masih terdapat protein bebas dalam sistem (29,30).

Beberapa jenis protein memerlukan penyesuaian pH, biasanya dengan penambahan sejumlah kecil alkali, agar gugus fungsionalnya bermuatan negatif dan dapat membentuk kompleks dengan ion logam berat. Menariknya, kelebihan logam berat dalam larutan tidak hanya dapat menghambat proses pengendapan lebih lanjut, tetapi juga memungkinkan larutnya kembali kompleks logam-protein. Namun, walaupun kompleks tersebut larut kembali, struktur protein tetap dalam kondisi terdenaturasi, sehingga sifat biologisnya tidak dapat dipulihkan (31).

### **Alat dan Bahan :**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Albumin, larutan  $\text{HgCl}_2$  1%, dan larutan Pb asetat

**Cara Kerja :**

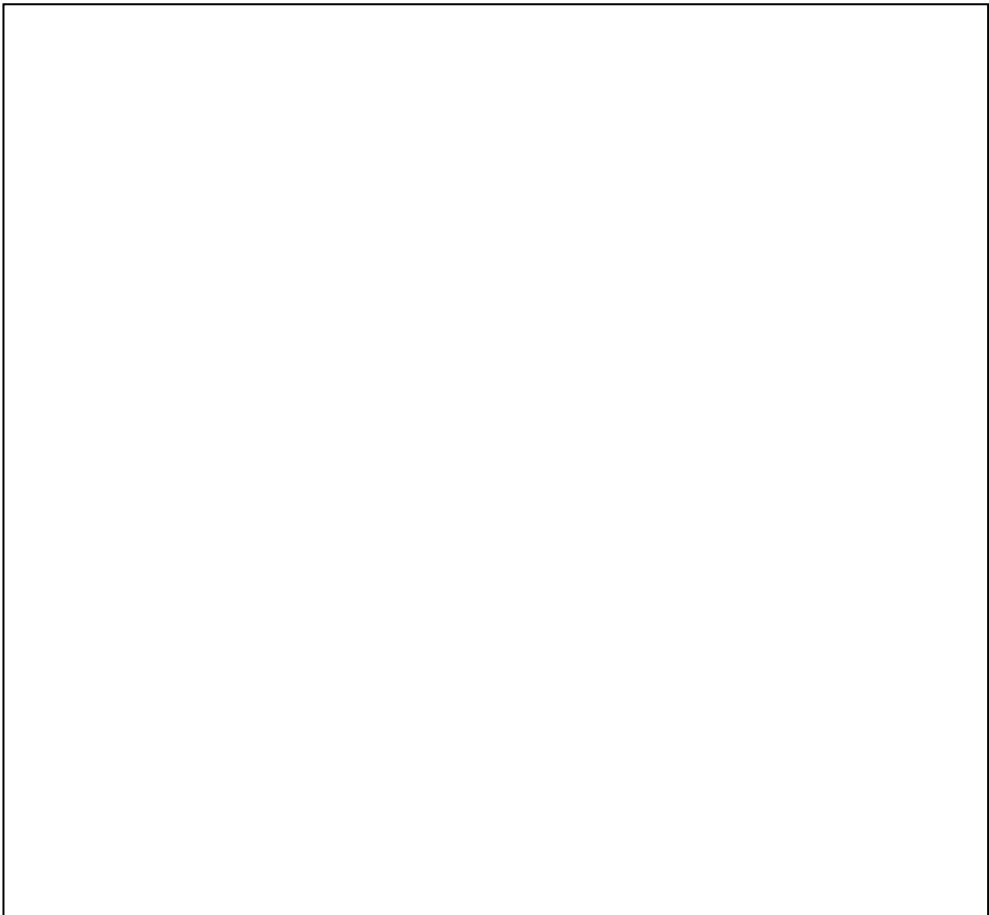


**Kesimpulan:**

**Pertanyaan :**

1. Apakah tiap kali penambahan logam berat diikuti oleh penambahan endapan protein? Mengapa?
2. Berapa tetes setiap logam diperlukan untuk mengendapkan protein di kedua bahan tersebut?

3. Sebutkan logam - logam berat yang menjadi pencemar utama lingkungan, sumber pencemaran dan jelaskan mengapa logam tersebut berbahaya. Sebutkan nama suatu penyakit terkenal yang diambil dari suatu nama teluk di Jepang, yang disebabkan oleh keracunan logam berat. Logam berat apakah yang menjadi penyebab dan jelaskan bagaimana logam tersebut meracuni manusia?
4. Apakah yang perlu dilakukan, bila terjadi keracunan logam berat yang akut? Sebutkan pula apakah yang perlu dilakukan bila terjadi paparan kronis. Berilah contoh nyata paparan kronis.



# PRAKTIKUM

## FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KERJA ENZIM

---

### **Pendahuluan**

Enzim adalah biomolekul protein yang berperan sebagai katalisator dalam berbagai reaksi kimia di dalam sistem biologis. Sebagai biokatalis, enzim mempercepat laju reaksi kimia tanpa mengalami perubahan permanen pada struktur atau fungsinya. Hampir setiap reaksi metabolik dalam organisme hidup dikatalisis oleh enzim, menjadikannya esensial untuk mempertahankan kehidupan dan fungsi seluler (32).

Sintesis enzim terjadi di dalam sel melalui proses translasi, di mana asam amino dirangkai sesuai dengan urutan yang ditentukan oleh mRNA. Setelah sintesis, enzim mengalami pelipatan (folding) menjadi struktur tiga dimensi yang spesifik, yang penting untuk aktivitas katalitiknya. Banyak enzim dapat diekstraksi dari sel tanpa kehilangan fungsinya, memungkinkan studi lebih lanjut mengenai sifat dan mekanisme kerjanya (33).

Pemahaman tentang dinamika enzim telah berkembang pesat dalam dekade terakhir. Penelitian menunjukkan bahwa enzim tidak bersifat statis, melainkan mengalami berbagai gerakan internal yang memengaruhi efisiensi katalitiknya (33). Fluktuasi konformasi internal ini dapat memengaruhi mekanisme reaksi dan efisiensi katalisis (32).

### **Kepentingan Medis Enzim**

Enzim terdistribusi di tempat-tempat tertentu di dalam sel, sesuai dengan golongan dan fungsinya. Sebagai contoh, enzim-enzim yang berperan dalam sintesis dan reparasi DNA terletak dalam inti sel. Enzim yang mengkatalisis berbagai reaksi yang menghasilkan energi secara aerob terletak di dalam mitokondria. Sementara itu, enzim yang berhubungan dengan biosintesis protein berada di ribosom. Distribusi ini memungkinkan reaksi kimia dalam sel berjalan sangat terarah dan efisien (33).

Analisis aktivitas enzim dalam serum dapat dimanfaatkan dalam diagnosis berbagai penyakit. Hal ini didasarkan pada beberapa prinsip dasar, yaitu bahwa sebagian besar enzim terdapat dan berfungsi secara intraseluler, dan bahwa enzim tertentu disintesis dalam jumlah besar oleh jaringan atau organ spesifik. Oleh karena itu, keberadaan enzim intraseluler dalam serum menandakan adanya kerusakan atau

disintegrasikan sel yang melepaskan enzim tersebut ke dalam sirkulasi darah. Jika enzim tersebut berasal dari jaringan tertentu, maka peningkatan aktivitasnya dalam serum dapat digunakan sebagai indikator adanya kerusakan atau gangguan pada jaringan atau organ yang bersangkutan (32).

### **Penggolongan Enzim**

Enzim merupakan biomolekul yang memiliki kemampuan katalitik tinggi dan spesifisitas yang luar biasa terhadap substratnya. Setiap enzim umumnya hanya mengkatalisis satu jenis reaksi atau bekerja pada satu jenis substrat tertentu. Berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisis, enzim diklasifikasikan ke dalam enam golongan utama oleh Komisi Enzim (*Enzyme Commission*), yaitu:

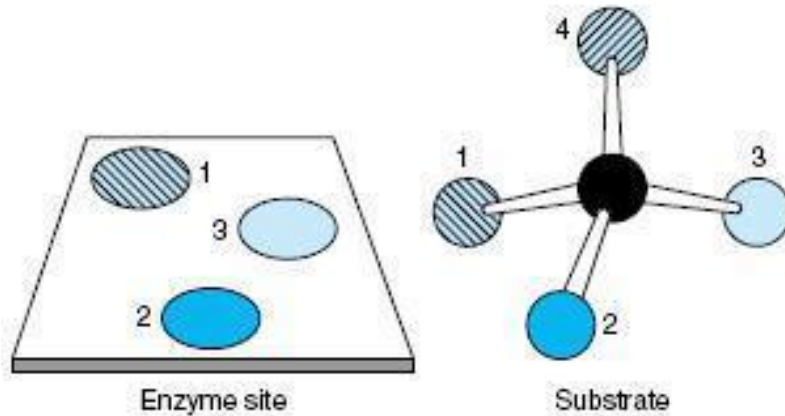
1. Oksidoreduktase (EC 1): Mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi, di mana terjadi transfer elektron antara molekul.
2. Transferase (EC 2): Memindahkan gugus fungsional seperti metil atau fosfat dari satu molekul ke molekul lain.
3. Hidrolase (EC 3): Mengkatalisis pemutusan ikatan kimia melalui penambahan molekul air (hidrolisis).
4. Liase (EC 4): Memecah ikatan kimia tanpa menggunakan air atau oksidasi, sering menghasilkan pembentukan ikatan rangkap atau cincin baru.
5. Isomerase (EC 5): Mengkatalisis konversi isomer, yaitu perubahan struktur molekul tanpa mengubah komposisi atomnya.
6. Ligase (EC 6): Menggabungkan dua molekul besar dengan membentuk ikatan kovalen baru, seringkali disertai dengan hidrolisis ATP (34).

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>A<sub>red</sub> + B<sub>ox</sub> ⇌ A<sub>ox</sub> + B<sub>red</sub></p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C <sub>1</sub> -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H<sub>2</sub>O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP + P</p> <p>X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

**Gambar 5** Kelas enzim  
 (Sumber: *Color Atlas of Biochemistry*)

Spesifisitas enzim dapat dibedakan menjadi beberapa jenis, antara lain:

1. Spesifisitas Optik: Enzim menunjukkan preferensi terhadap satu isomer optik dari suatu senyawa. Misalnya, enzim-enzim yang bekerja pada karbohidrat umumnya hanya mengenali isomer D, sedangkan enzim yang bekerja pada asam amino dan protein biasanya spesifik terhadap isomer L (34).
2. Spesifisitas Gugus: Enzim hanya mengenali substrat yang memiliki gugus fungsional tertentu. Contohnya, alkohol dehidrogenase mengkatalisis reaksi dehidrogenasi pada senyawa alkohol, tetapi tidak pada senyawa lain yang tidak memiliki gugus hidroksil (-OH) (34).



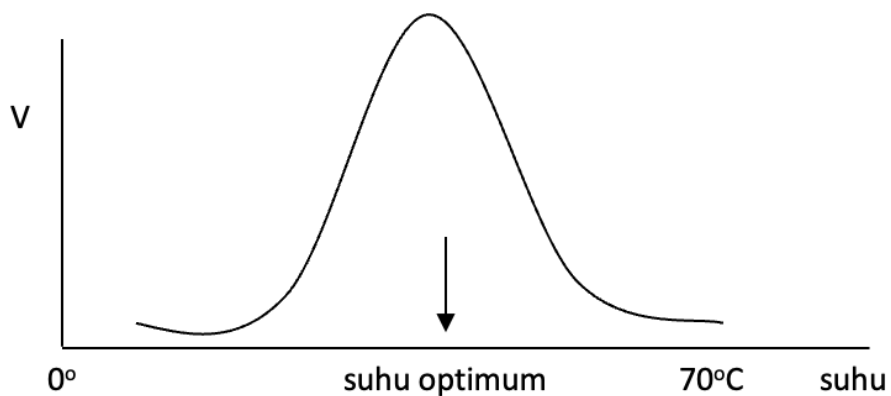
Gambar 6 Spesifisitas enzim (35)

### Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor fisikokimia yang menentukan efisiensi dan kestabilan reaksi enzimatik. Faktor-faktor utama yang memengaruhi kerja enzim meliputi suhu, pH, konsentrasi enzim, dan konsentrasi substrat.

#### 1. Suhu

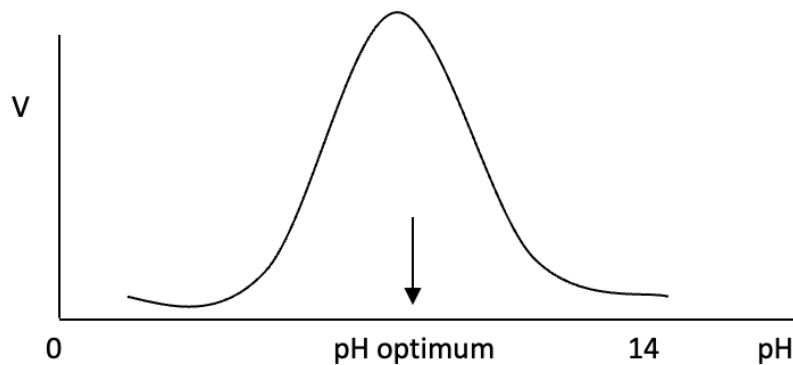
Suhu memengaruhi kecepatan reaksi enzimatik dengan meningkatkan energi kinetik molekul, sehingga meningkatkan frekuensi tumbukan antara enzim dan substrat. Setiap enzim memiliki suhu optimum di mana aktivitasnya maksimal. Peningkatan suhu di atas nilai optimum dapat menyebabkan denaturasi enzim, yaitu perubahan struktur tiga dimensi yang mengakibatkan hilangnya aktivitas katalitik. Sebagian besar enzim manusia memiliki suhu optimum sekitar 37°C dan mengalami denaturasi pada suhu sekitar 60°C (36)



Gambar 11 Pengaruh suhu pada kecepatan reaksi enzimatik

## 2. pH

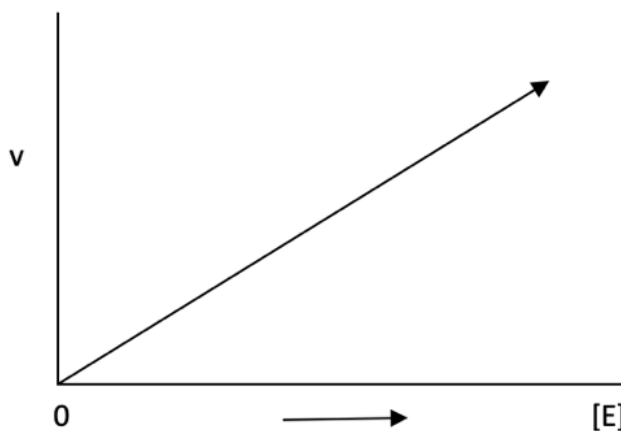
pH lingkungan memengaruhi ionisasi gugus aktif pada enzim dan substrat, yang dapat mengubah afinitas enzim terhadap substrat dan stabilitas struktur enzim. Setiap enzim memiliki pH optimum tertentu; misalnya, pepsin memiliki pH optimum sekitar 2, sedangkan enzim lain mungkin memiliki pH optimum yang berbeda. Perubahan pH yang signifikan dari nilai optimum dapat menyebabkan denaturasi enzim dan penurunan aktivitasnya (36).



**Gambar 12** Pengaruh pH pada kecepatan reaksi enzimatik

## 3. Konsentrasi Enzim

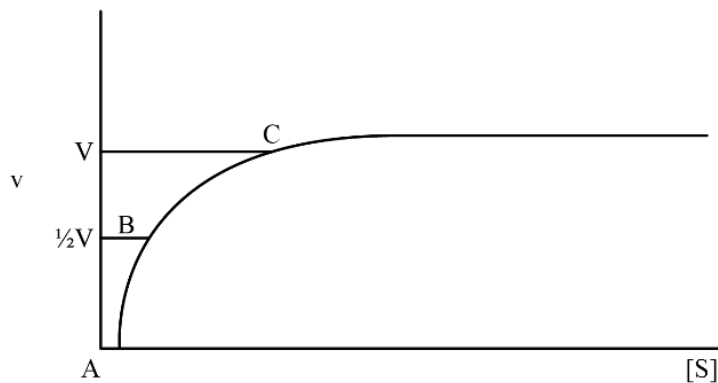
Peningkatan konsentrasi enzim, dengan jumlah substrat yang tetap, akan meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik secara proporsional hingga semua substrat terikat oleh enzim. Setelah titik jenuh tercapai, penambahan enzim lebih lanjut tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi karena keterbatasan substrat yang tersedia (37).



**Gambar 13** Pengaruh konsentrasi enzim [E] terhadap kecepatan reaksi enzimatik (v)

#### 4. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi enzimatik meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat hingga mencapai kecepatan maksimum ( $V_{max}$ ), di mana semua situs aktif enzim terikat oleh substrat. Pada titik ini, enzim berada dalam kondisi jenuh, dan penambahan substrat lebih lanjut tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi. Fenomena ini dijelaskan oleh model kinetika Michaelis-Menten (37).



**Gambar 14** Pengaruh konsentrasi substrat [S] terhadap kecepatan reaksi enzimatik ( $v$ )

*Keterangan:*

Pada titik A dan B belum semua enzim bereaksi dengan substrat (belum jenuh). Sehingga pada A dan B penambahan substrat akan menyebabkan kecepatan reaksi bertambah. Pada titik C semua enzim telah bereaksi dengan substrat (jenuh), sehingga penambahan substrat tidak akan menambah kecepatan reaksi, sebab tidak ada lagi enzim yang bebas.

#### Tujuan Praktikum

Praktikum ini dirancang untuk memahami dan membuktikan berbagai faktor yang mempengaruhi aktivitas enzimatik. Secara khusus, tujuan dari praktikum ini meliputi:

1. Membuktikan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzimatik.
2. Membuktikan pengaruh pH terhadap aktivitas enzimatik.
3. Membuktikan pengaruh kadar enzim terhadap aktivitas enzimatik.

## Macam Percobaan

### 1. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim

**Tujuan Praktikum:** Membuktikan bahwa kecepatan reaksi enzimatik meningkat seiring dengan kenaikan suhu hingga mencapai titik optimum, dan akan menurun apabila suhu melebihi suhu optimum tersebut.

#### **Prinsip Dasar:**

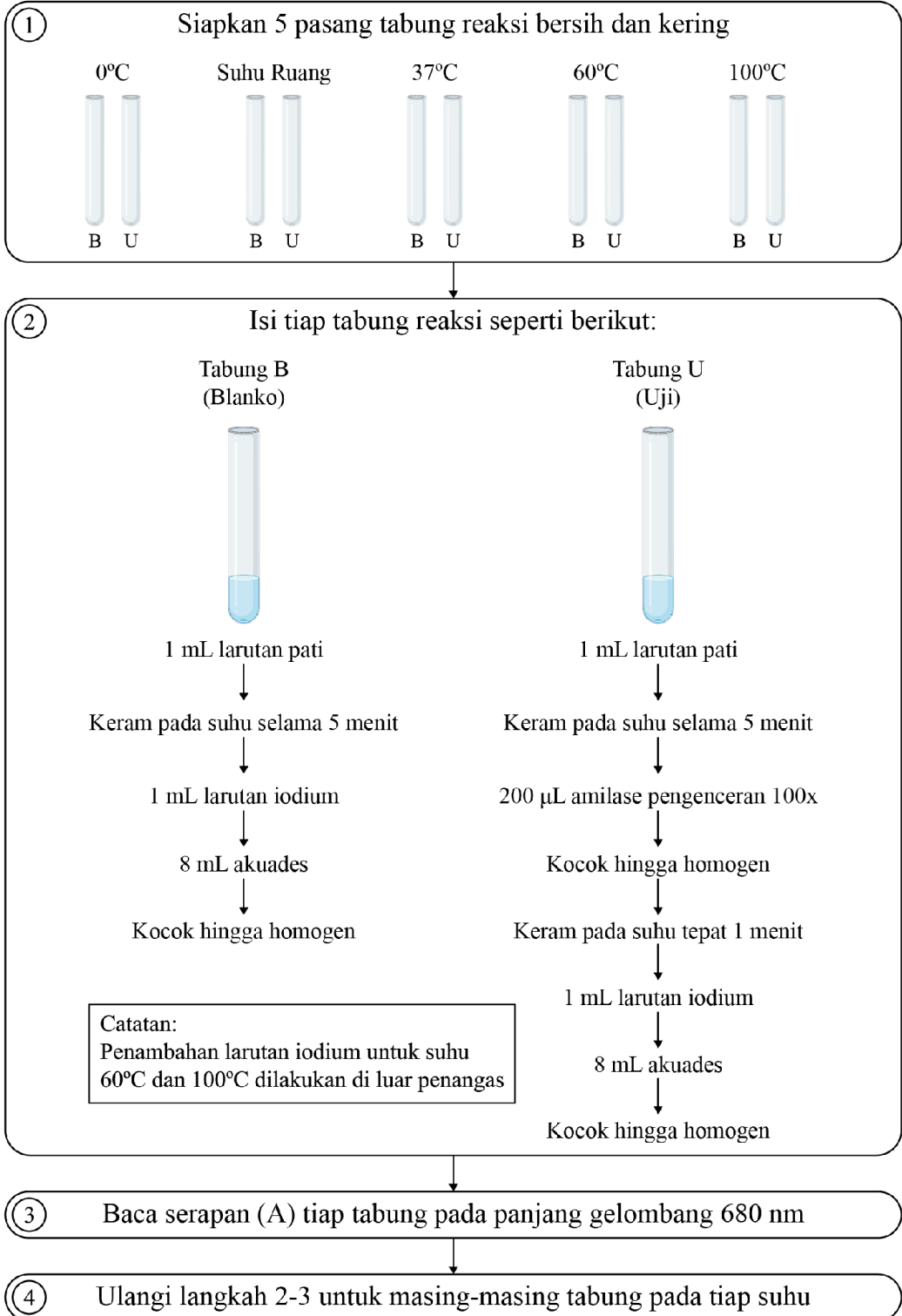
Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh suhu lingkungan. Pada suhu yang sangat rendah, energi kinetik molekul enzim dan substrat menurun, sehingga frekuensi tumbukan efektif antara keduanya berkurang. Akibatnya, pembentukan kompleks enzim-substrat (ES) yang esensial untuk berlangsungnya reaksi katalitik menjadi terhambat, dan produk reaksi tidak terbentuk. Namun, kondisi ini bersifat reversibel; peningkatan suhu secara bertahap dapat mengembalikan aktivitas enzim karena meningkatnya energi kinetik yang memungkinkan terbentuknya kompleks ES Kembali (36).

Seiring dengan peningkatan suhu, kecepatan reaksi enzimatik umumnya meningkat karena meningkatnya energi kinetik yang memperbesar kemungkinan tumbukan efektif antara enzim dan substrat. Namun, peningkatan suhu hanya meningkatkan aktivitas enzim hingga mencapai suhu optimum tertentu, di mana aktivitas enzim mencapai puncaknya. Setelah melewati suhu optimum, aktivitas enzim menurun tajam karena denaturasi protein enzim. Denaturasi ini mengakibatkan perubahan struktur tiga dimensi enzim, khususnya pada situs aktifnya, sehingga enzim kehilangan kemampuan untuk mengikat substrat dan menjalankan fungsi katalitiknya. Proses denaturasi ini bersifat ireversibel dan menyebabkan hilangnya aktivitas enzim secara permanen (37).

#### **Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung reaksi dan penangas air.
- ii. Bahan: larutan enzim amilase, larutan pati 0.4 mg/mL, dan larutan iodium.

### Cara Kerja:



Isilah tabel berikut ini:

Suhu	AB	AU	$\Delta A/\text{menit (v)}$
0 °C			
Suhu Ruangan			
37 °C			
60 °C			
100 °C			

Buatlah kurva yang menggambarkan hubungan kecepatan reaksi enzimatik ( $v = \Delta A/\text{menit}$ ) sebagai sumbu  $y$ , dengan suhu sebagai sumbu  $x$ .

## 2. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim

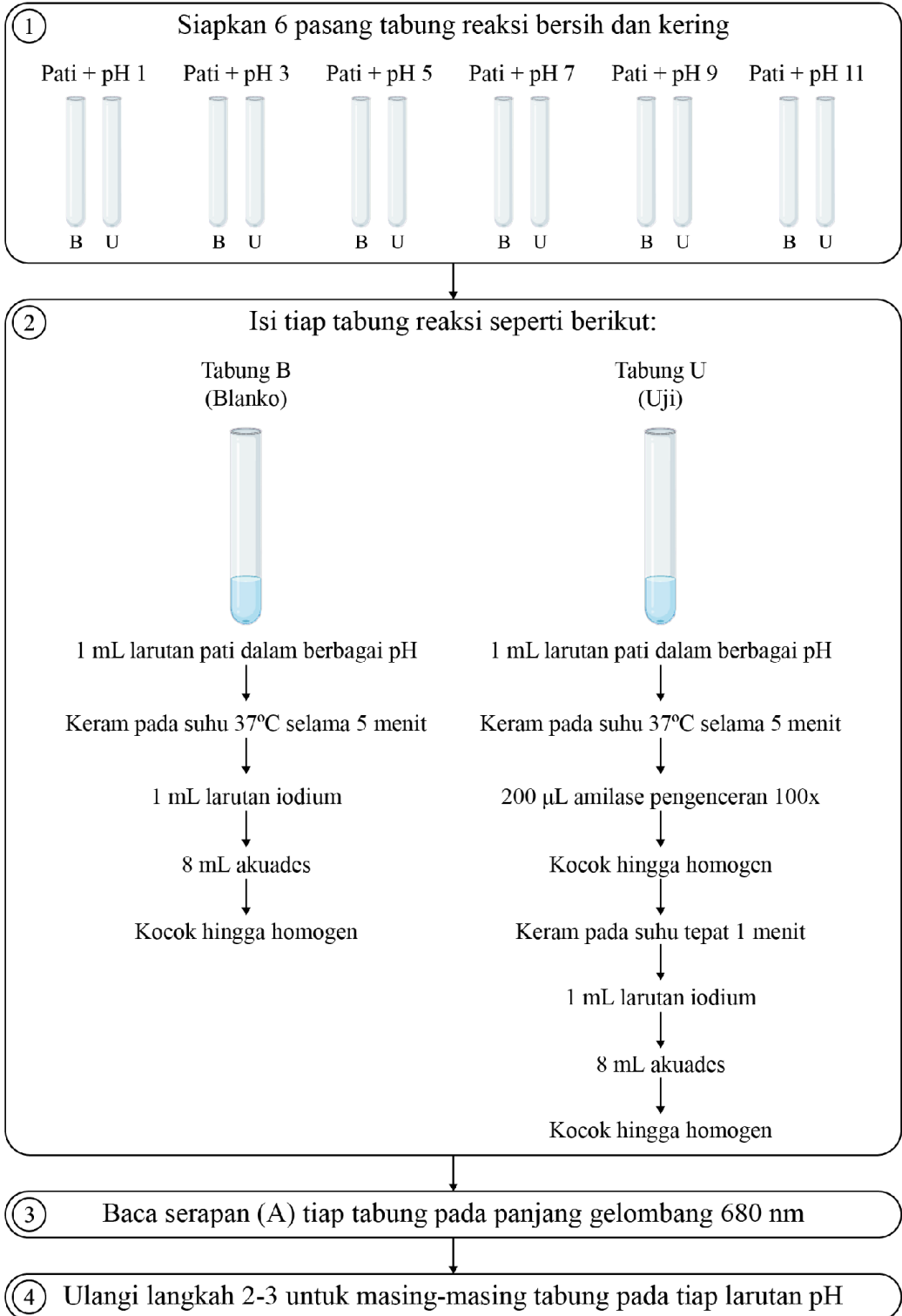
**Tujuan Praktikum:** Membuktikan bahwa derajat keasaman (pH) mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik.

**Prinsip Dasar:** Enzim bekerja pada kisaran pH tertentu dan menunjukkan kerja maksimum pada pH optimum. Di luar pH optimum aktivitas enzim dapat terganggu.

### **Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Larutan enzim amilase, larutan pati 0.4 mg/mL yang dilarutkan dalam berbagai pH (1, 3, 5, 7, 9, dan 11), dan larutan iodium.

### Cara Kerja:



Isilah tabel berikut ini:

pH	A <sub>B</sub>	A <sub>U</sub>	ΔA/menit (v)
1			
3			
5			
7			
9			
11			

Buatlah kurva yang menggambarkan hubungan kecepatan reaksi enzimatik ( $v = \Delta A/\text{menit}$ ) sebagai sumbu  $y$ , dengan pH sebagai sumbu  $x$ .



### 3. Pengaruh kadar enzim terhadap aktivitas enzim

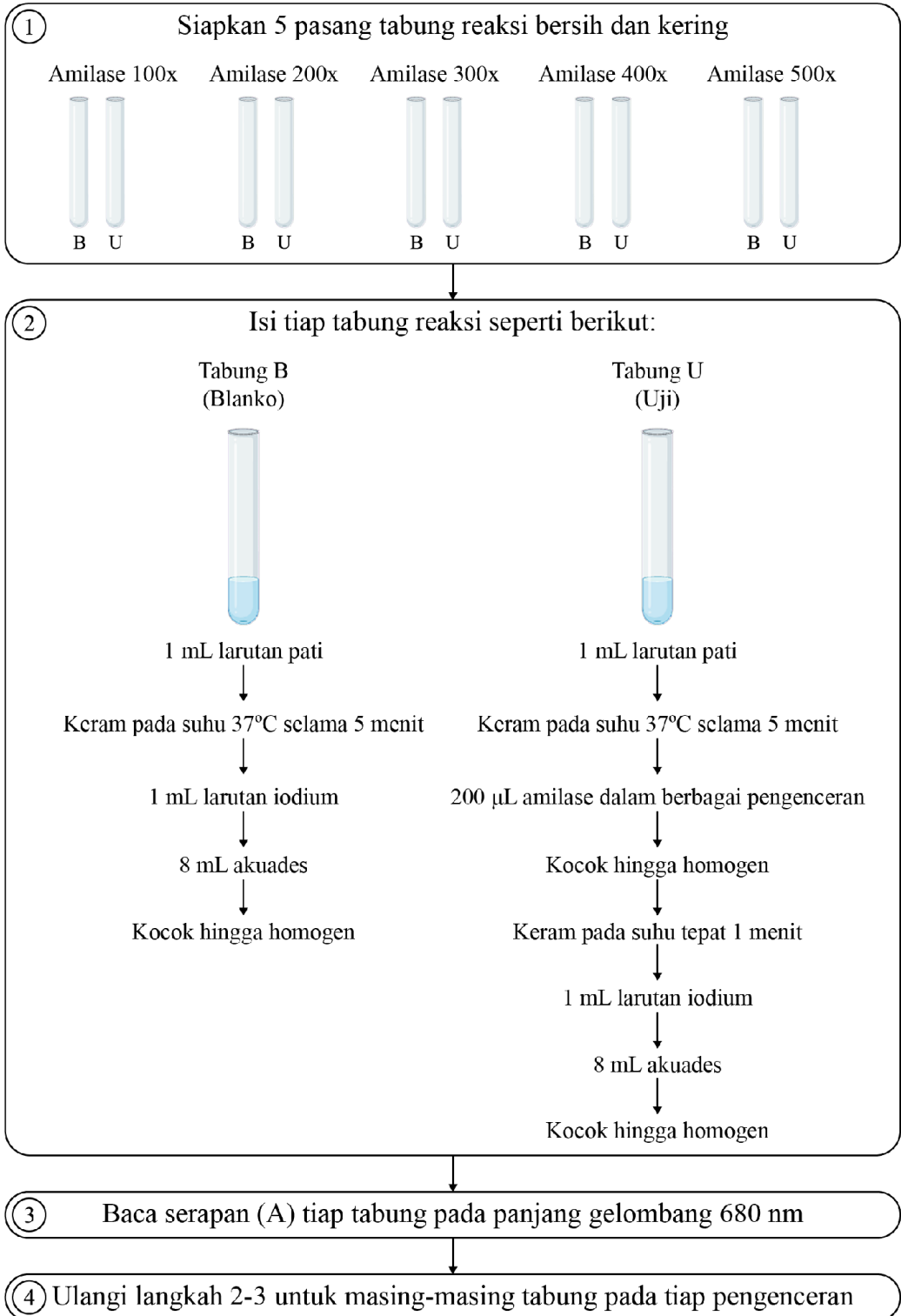
**Tujuan Praktikum:** Membuktikan bahwa kecepatan reaksi enzimatik berbanding lurus dengan konsentrasi enzim.

**Prinsip Dasar:** Pada konsentrasi substrat tertentu, penambahan enzim dengan konsentrasi bertingkat akan meningkatkan pembentukan kompleks enzim – substrat, sehingga jumlah produk yang terbentuk akan meningkat.

#### **Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Larutan enzim amilase, larutan pati 0.4 mg/mL, dan larutan iodium.

### Cara Kerja:



Isilah tabel sebagai berikut:

Pengenceran Enzim	A <sub>B</sub>	A <sub>U</sub>	ΔA/menit (v)
500x			
400x			
300x			
200x			
100x			

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



# PRAKTIKUM

## METABOLISME KARBOHIDRAT

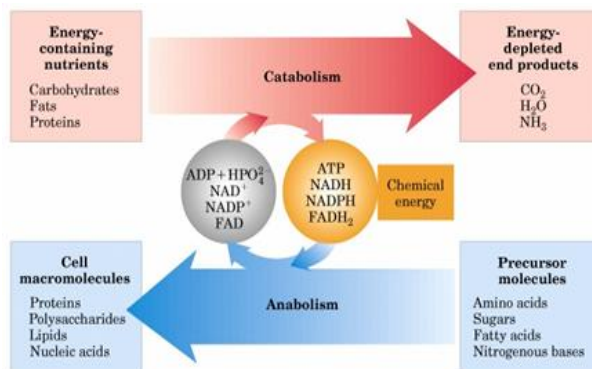
---

### Pendahuluan

Metabolisme merupakan serangkaian reaksi kimia yang terjadi dalam sel atau organisme hidup untuk mempertahankan kehidupan. Proses ini memungkinkan organisme memperoleh energi dari lingkungan, mengubahnya menjadi bentuk yang dapat digunakan, serta mensintesis komponen struktural dan fungsional yang diperlukan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan (38).

Senyawa seperti karbohidrat, lipid, dan protein berperan sebagai sumber energi utama dalam metabolisme seluler. Di dalam sel, senyawa-senyawa ini mengalami transformasi melalui berbagai reaksi enzimatik yang terorganisir dalam jalur-jalur metabolik (39).

Jalur metabolik dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori utama: jalur **katabolik**, yang memecah molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana dengan pelepasan energi; jalur **anabolik**, yang mensintesis molekul kompleks dari prekursor sederhana dengan memerlukan input energi; dan jalur **amfibolik**, yang berfungsi dalam kedua arah, seperti siklus asam sitrat yang berperan dalam degradasi molekul untuk menghasilkan energi sekaligus menyediakan prekursor biosintetik (38).



**Gambar 7** Metabolisme katabolik dan anabolik

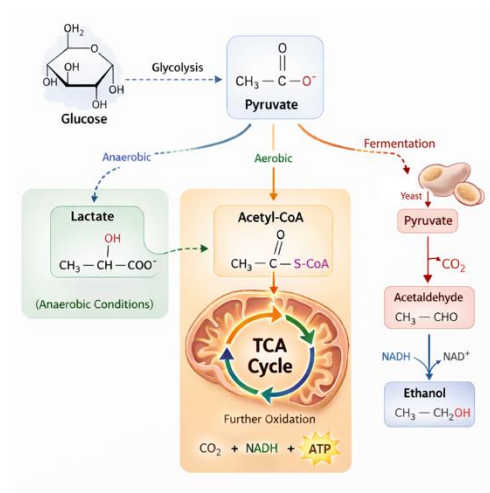
(Sumber: <https://mentalandbodycare.com/foods-increase-metabolism-fast/>)

Sebagian besar jalur metabolisme dan reaksi yang terjadi dalam jalur metabolisme pada berbagai organisme, mulai dari bakteri sederhana hingga mamalia tingkat tinggi, memiliki kesamaan prinsip dasar. Salah satu jalur utama dalam

metabolisme karbohidrat adalah **glikolisis**, yang berfungsi menghasilkan energi bagi sel. Jalur glikolisis tidak hanya berperan dalam metabolisme karbohidrat, tetapi juga berfungsi sebagai jalur amfibolik apabila dikombinasikan dengan siklus asam sitrat, yaitu jalur yang dapat berperan baik dalam katabolisme maupun anabolisme (40).

Glikolisis berlangsung secara kontinu dan tersebar luas di seluruh makhluk hidup, mulai dari mikroorganisme seperti bakteri dan ragi, hingga manusia dan hewan. Pada hewan, khususnya dalam kondisi anaerob, hasil akhir dari glikolisis adalah asam laktat. Namun, pada sel ragi (*Saccharomyces cerevisiae*), hasil akhirnya adalah etanol dan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) melalui proses fermentasi alkohol (41).

Dalam modul praktikum ini, akan dilakukan pengamatan terhadap proses glikolisis yang terjadi di dalam sel ragi (42,43)



**Gambar 8** Glukosa dalam jalur metabolisme (Sumber: Ilustrasi oleh AI, diadaptasi dari (44))

## Tujuan Praktikum

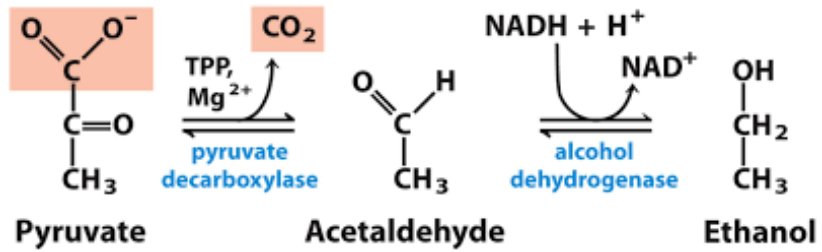
Berdasarkan uraian pendahuluan di atas, maka praktikum ini bertujuan untuk mengamati proses glikolisis yang terjadi di dalam sel ragi.

## Macam Percobaan

### 1. Glikolisis Dalam Sel Ragi

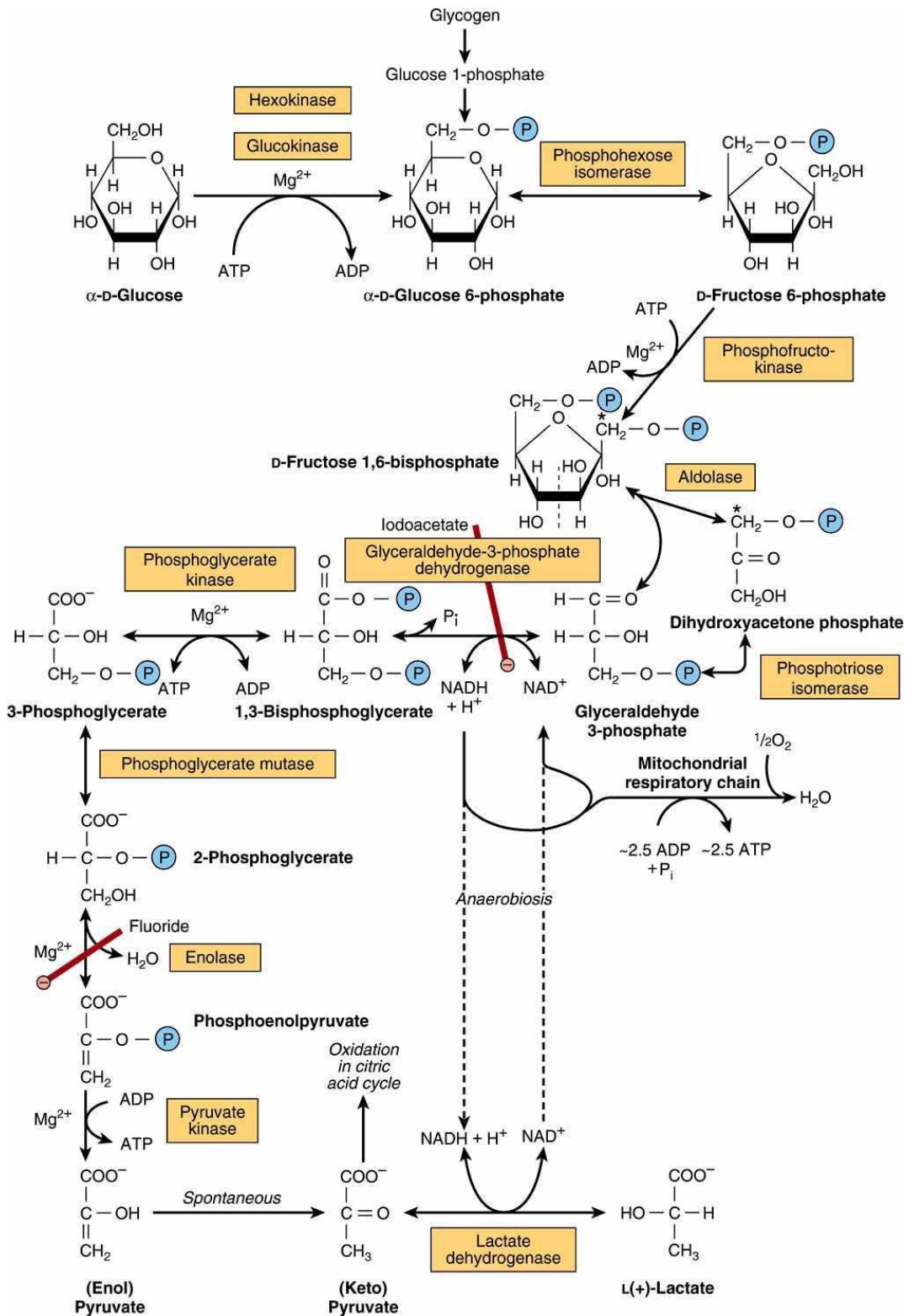
**Tujuan Praktikum:** Mempelajari / mengamati proses glikolisis di dalam sel ragi dengan mengukur kadar glukosa yang tersisa, tinggi kadar etanol dan tinggi kolom CO<sub>2</sub> yang dihasilkan, serta pengaruh inhibitor seperti fluorida dan arsenat terhadap proses glikolisis.

**Prinsip Dasar:** Glukosa oleh enzim-enzim glikolisis di dalam sel ragi akan diubah menjadi etanol dan CO<sub>2</sub>.



**Gambar 9** Glukosa dalam jalur metabolisme

(Sumber: <https://www.medschoolcoach.com/fermentation-mcat-biochemistry/>)



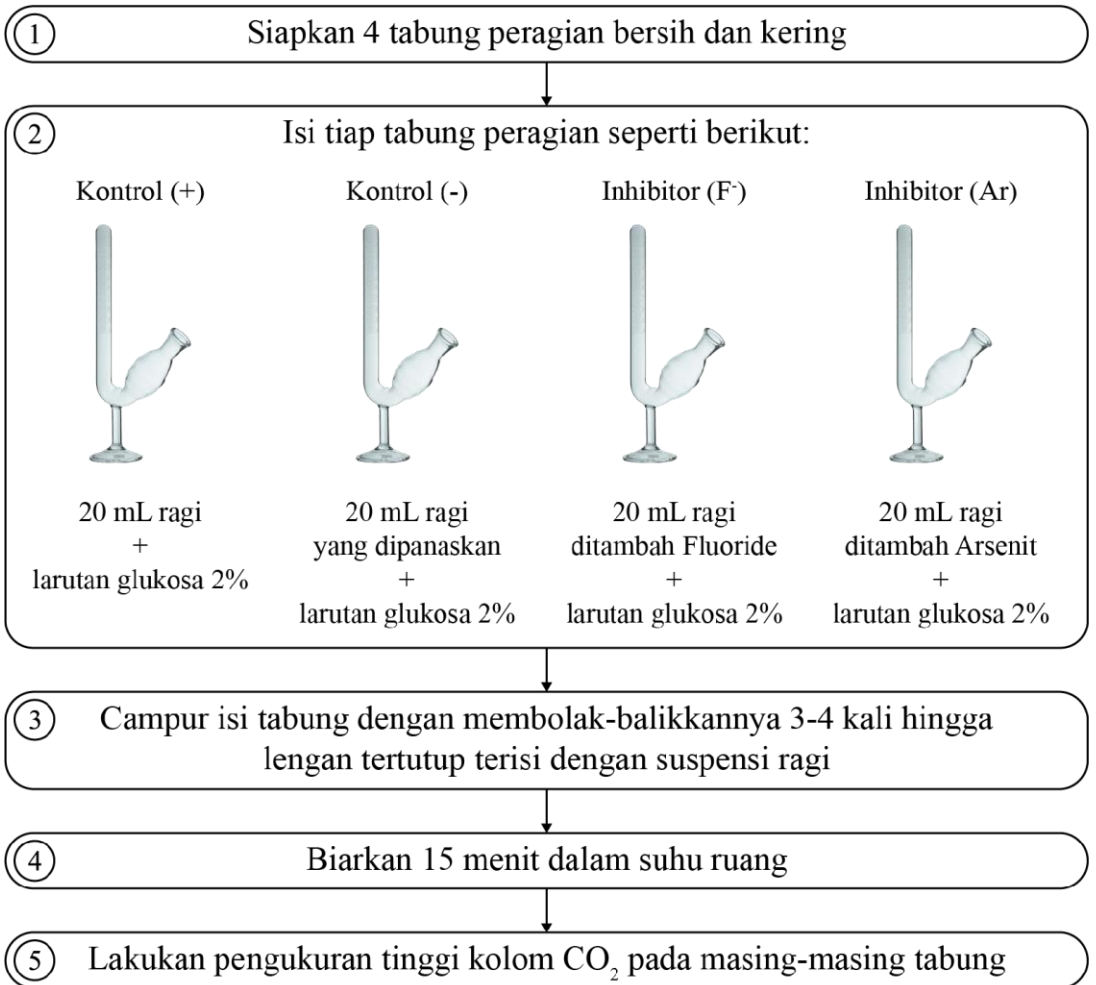
Gambar 10 Jalur glikolisis

(Sumber: <https://basicmedicalkey.com/glycolysis-the-oxidation-of-pyruvate/>)

**Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung peragian
- ii. Bahan: Suspensi ragi, larutan glukosa 2%, inhibitor proses glikolisis, larutan florida, dan larutan arsenat

**Cara Kerja:**



### Hasil:

Tabung	1 Kontrol +	2 Kontrol -	3 + fluorida	4 + arsenat
Tinggi kolom CO <sub>2</sub> yang terbentuk (cm)				
Kadar glukosa				

### Kesimpulan:

## 2. Penetapan Kadar Glukosa

### Metode Folin - Wu

#### Prinsip Dasar

Metode Folin-Wu digunakan untuk penetapan kadar glukosa dalam larutan melalui reaksi reduksi ion tembaga ( $\text{Cu}^{2+}$ ) dalam larutan alkali oleh glukosa. Reaksi ini menghasilkan senyawa kupro yang tidak larut. Penambahan asam fosfomolibdat menyebabkan senyawa kupro larut dan mereduksi asam fosfomolibdat menjadi molibdenum biru, yang intensitas warnanya sebanding dengan konsentrasi glukosa dalam sampel. Proses ini diukur secara kolorimetri pada panjang gelombang 430 nm (45).

Sebelum analisis, sampel darah harus melalui proses deproteinisasi untuk menghilangkan protein yang dapat mengganggu hasil pengukuran. Prosedur ini melibatkan penambahan asam tungstat dan asam sulfat, diikuti dengan sentrifugasi untuk memperoleh filtrat bebas protein. Filtrat ini kemudian digunakan dalam reaksi reduksi tembaga untuk penetapan kadar glukosa.

### Pembuatan Filtrat Bebas Protein dengan Metode Folin - Wu

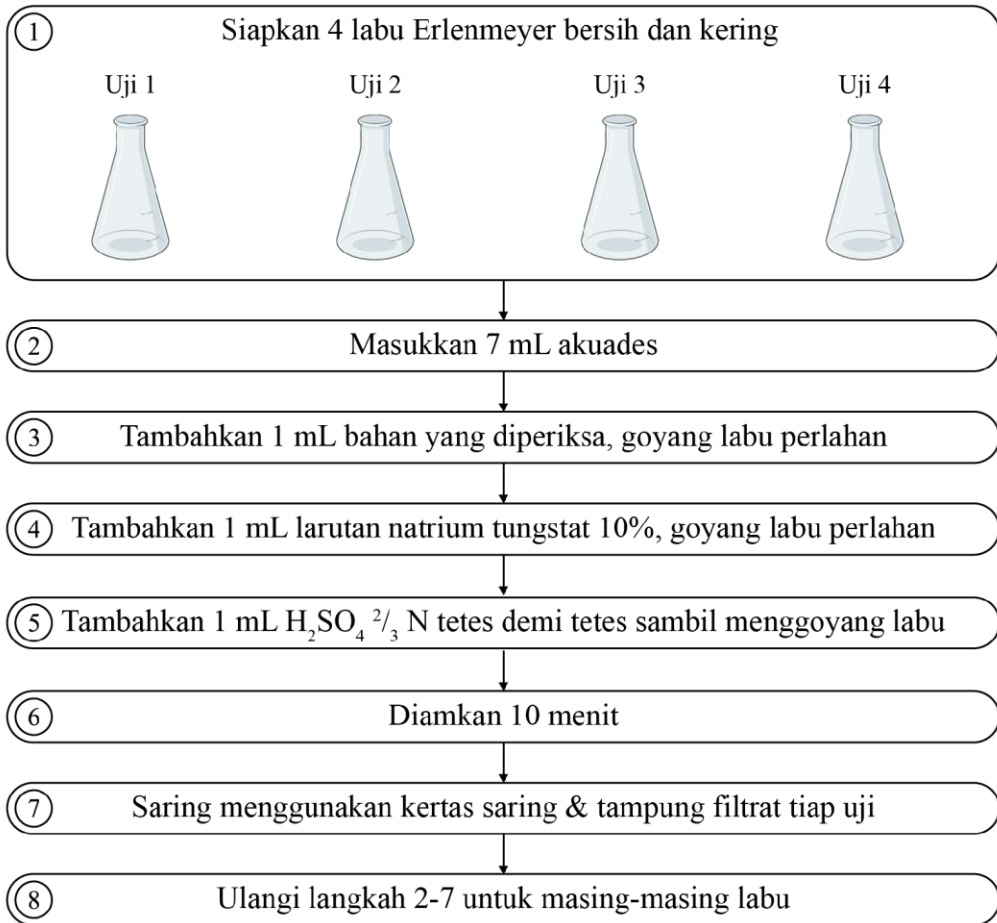
#### Prinsip Dasar

Protein akan mengendap pada penambahan asam tungstat

### Alat dan Bahan

- i. Alat: Labu Erlenmeyer 125 mL
- ii. Bahan: Bahan yang akan diperiksa, akuades, larutan natrium tungstat 10%, larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2/3 N

### Cara Kerja



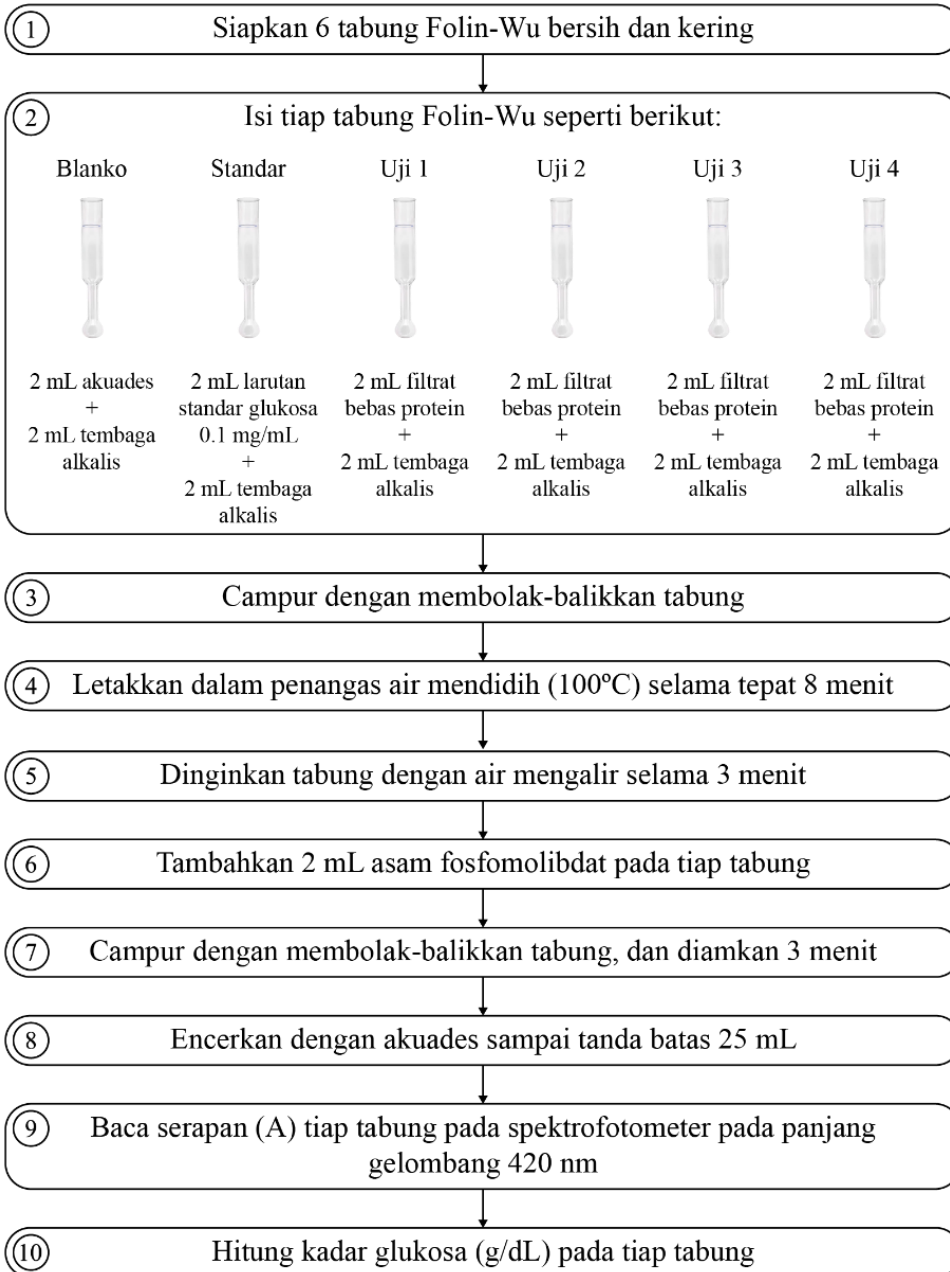
### Pengukuran Kadar Glukosa

#### Alat dan Bahan

- i. Alat: Tabung Folin – Wu
- ii. Bahan: Filtrat bebas protein, larutan tembaga alkalis mengandung natrium karbonat, tembaga sulfat dan asam tartat, pereaksi asam fosfomolibdat menandung asam molibdat dan natrium tungstat, larutan standar glukosa mengandung 0.1 mg/mL

### Cara Kerja

Pengukuran kadar glukosa dilakukan dengan menggunakan tabung Folin – Wu



### Perhitungan

$$\text{Kadar Glukosa} = \frac{A_U - A_B}{A_S - A_B} \times 0.2 \times \frac{100}{0.2} \text{ mg}/100\text{mL}$$

### Hasil

<b>Tabung</b>	<b>Kontrol + Uji 1</b>	<b>Kontrol - Uji 2</b>	<b>+ Flurida Uji 3</b>	<b>+ Arsenat Uji 4</b>
Kadar glukosa (g/dL)				

### **Kesimpulan**

# PRAKTIKUM

## PENETAPAN $K_m$ (TETAPAN MICHAELIS) FOSFATASE HATI SAPI

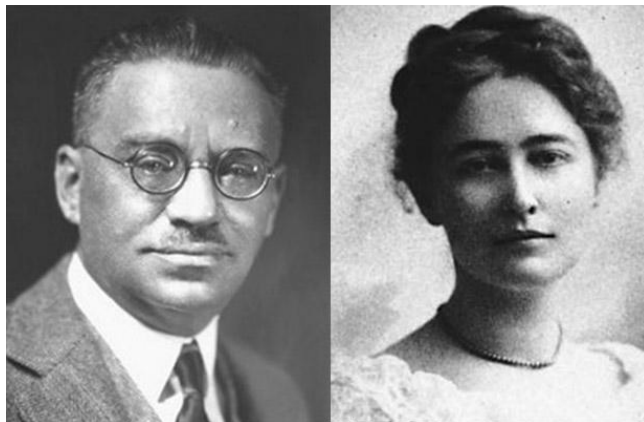
---

### Pendahuluan

Kinetika enzim merupakan cabang penting dalam biokimia yang mempelajari laju reaksi enzimatik dan faktor-faktor yang memengaruhinya. Pemahaman tentang kinetika enzim tidak hanya memberikan wawasan mengenai mekanisme kerja enzim, tetapi juga berperan dalam pengembangan aplikasi industri dan medis, seperti dalam desain obat dan biokatalisis (46,47).

Telah diketahui, bahwa konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi enzimatik (katalitik). Hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzimatik dapat dinyatakan secara kuantitatif. Kurva yang menggambarkan hubungan ini mempunyai bentuk umum hiperbolik. Bentuk kurva hiperbolik itu dapat diekspresikan secara aljabar dan disebut sebagai persamaan Michaelis – Menten, dengan  $[S]$  = konsentrasi substrat,  $V_0$  = kecepatan reaksi enzimatik pada  $t = 0$ ,  $V_{max}$  = kecepatan reaksi enzimatik maksimum dan  $K_m$  = tetapan Michaelis – Menten (47). Persamaan *Michaelis – Menten* tersebut adalah sebagai berikut:

$$V_0 = \frac{V_{max}}{K_m + [S]}$$



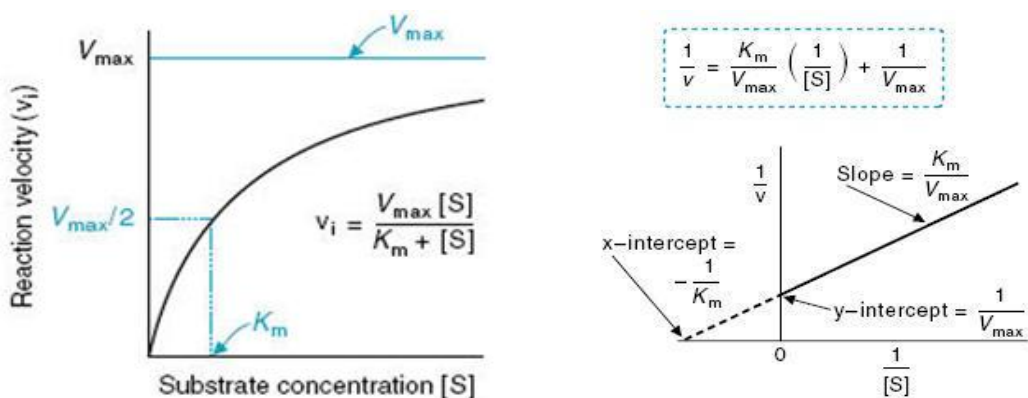
**Gambar 11** Michaelis-Menten

(Sumber: <https://carnotcycle.wordpress.com/2014/12/02/the-michaelis-menten-equation/>)

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

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

Persamaan ini disebut Persamaan *Lineweaver - Burk*. Persamaan ini berbentuk garis lurus dengan *slope* (kemiringan garis) :  $a = K_m/V_{max}$  dan *intercept* (titik potong) pada axis =  $- 1/K_m$ , titik potong pada sumbu tegak (ordinat) :  $b = 1/V_{max}$  dan garis yang diperoleh disebut *Lineweaver - burk Plot*.



**Gambar 12** (a) Kurva Michaelis - Menten (b) Garis Lineweaver - Burk (Marks)

(Sumber: <https://carnotcycle.wordpress.com/2014/12/02/the-michaelis-menten-equation/>)

Pada gambar 11 tampak grafik dari kedua persamaan tersebut. Secara aljabar, hanya diperlukan 3 titik untuk membuat garis lurus, sedangkan untuk membuat garis lengkung seperti hiperbola diperlukan lebih banyak titik. Secara operasional, hal ini akan sangat mempermudah penentuan kedua nilai bilangan tetap tersebut, karena dengan menggunakan persamaan Lineweaver - Burk pengukuran kecepatan reaksi cukup dilakukan dalam 3 atau 4 konsentrasi substrat saja. Selain itu, dengan menggunakan persamaan tersebut nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  dapat langsung dilihat atau dihitung. Sebaliknya, untuk membuat hiperbola yang tepat, sesuai dengan persamaan, diperlukan jumlah titik yang lebih banyak. Nilai maksimum ( $V_{max}$ ) sukar ditetapkan, sedangkan nilai  $K_m$  harus dihitung secara grafis dari kurva.

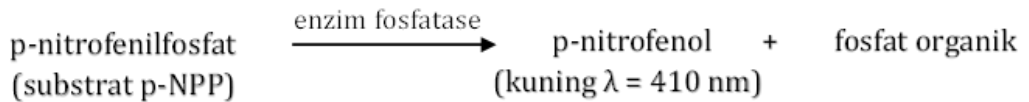
## Tujuan Praktikum

Menetapkan nilai  $K_m$  enzim fosfatase alkali dan enzim fosfatase asam yang berasal dari hati sapi dan memperlihatkan bahwa kedua enzim ini mengkatalisis reaksi

yang sama dengan substrat dan produk yang sama, tetapi mempunyai pH optimum yang berbeda.

### Prinsip Dasar

Dalam percobaan berikut ini, kedua macam fosfatase memecah substrat fosfat organik yang sama, yaitu para-nitrofenilfosfat (p-NPP) menjadi fosfat anorganik dan



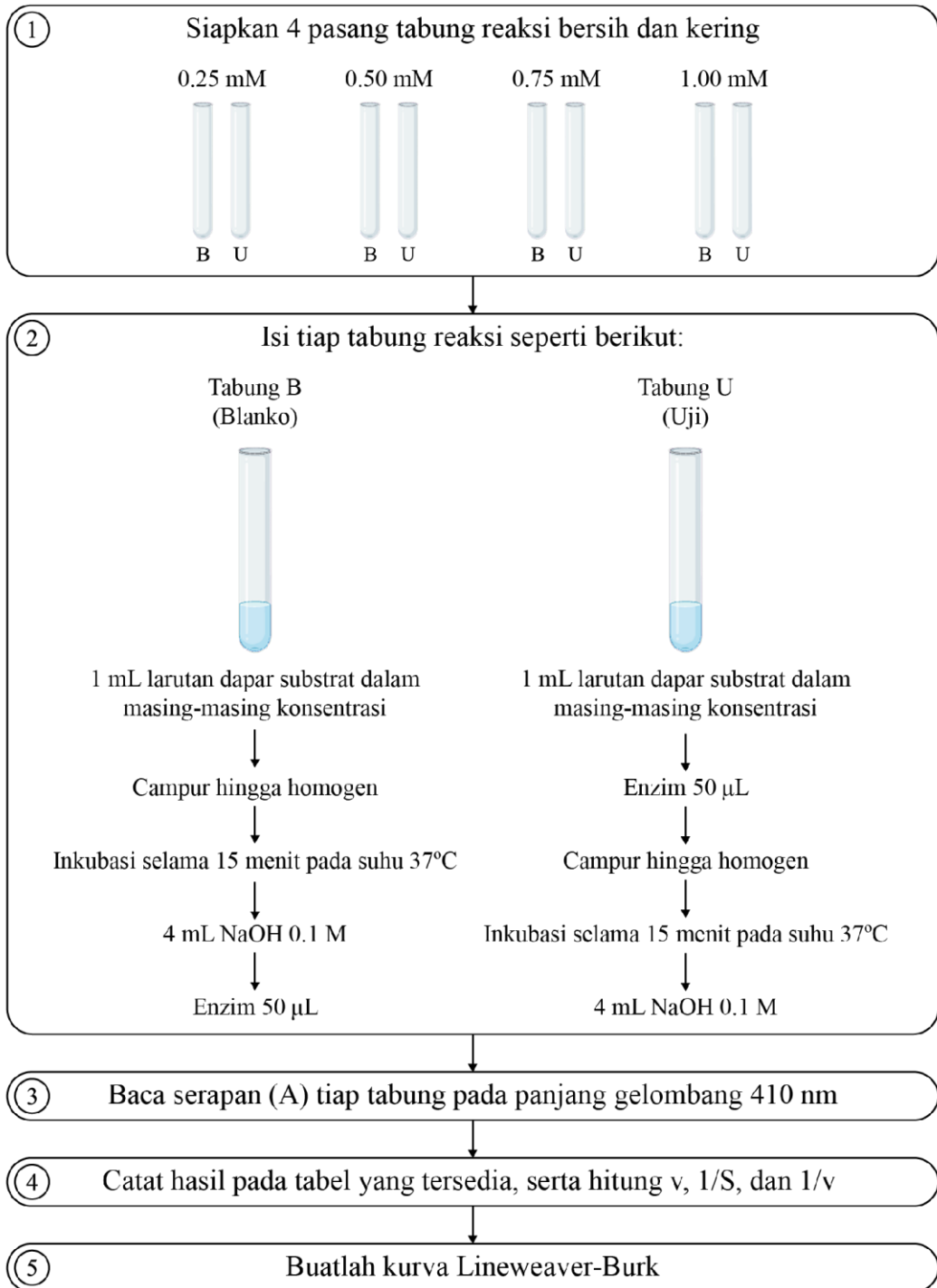
para-nitrofenol (p-NP) yang berwarna kuning dalam suasana basa. Densitas optik p-NP yang terbentuk dibaca pada  $\lambda=410$  nm.

Oleh karena 1 mol p-NPP diubah menjadi 1 mol p-NP yang berwarna, pengukuran densitas optik p-NP menggambarkan jumlah p-NPP yang diolah. Dalam percobaan ini, kecepatan reaksi pada saat enzim baru saja berikatan dengan substrat membentuk kompleks ES dan belum membentuk produk (kecepatan reaksi pada saat  $t=0$ ) dianggap sama dengan kecepatan reaksi pada tabung blanko (B). Dengan sendirinya densitas optik pada saat itu ( $DO_0$ ) ialah DO pada tabung B.

### Alat dan Bahan

- i. Alat: Blender, *centrifuge*, penangas air, dan spektrofotometer
- ii. Bahan: Hati sapi, larutan NaCl 0.9%, larutan dapar karbohidrat bikarbonat pH 9.6, larutan substrat p-nitrofenilfosfat (p-NPP) 60 mmol, dan larutan NaOH 0.1M

## Cara Kerja



### Hasil

Tuliskan hasil pengukuran densitas optik, kecepatan reaksi, kebalikan konsentrasi substrat (1/S) dan kebalikan kecepatan reaksi (1/v) pada tabel berikut:

No. Tabung (S)	A <sub>B</sub>	A <sub>U</sub>	ΔA	v	1/S	1/v
0.25 mM						
0.5 mM						
0.75 mM						
1.00 mM						

1. Gambarlah kurva Lineweaver – Burk yang menyatakan hubungan antara perubahan konsentrasi dengan kecepatan reaksi, dengan menggunakan 1/S sebagai sumbu x dan 1/v sebagai sumbu y.



2. Berdasarkan data di atas, buatlah persamaan garis regresi liniernya.

$$\frac{1}{V} = a \frac{1}{S} + b$$
$$a = \frac{K_m}{V_{max}} ; b = \frac{1}{V_{max}}$$

3. Dari persamaan garis regresi linier yang diperoleh hitunglah nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  untuk fosfatase alkali.

### **Pertanyaan**

1. Apakah yang dimaksud dengan  $K_m$ ? Apa artinya secara kinetik dan berdasarkan kinetik tersebut, bagaimana menafsirkan hubungannya dengan afinitas enzim terhadap substrat?
2. Enzim manakah yang mempunyai afinitas lebih besar terhadap p-NPP, fosfatase asam atau fosfatase alkali? jelaskan!
3. Apakah yang dimaksud dengan isoenzim? Apakah kedua enzim ini isoenzim satu sama lain?

# PRAKTIKUM

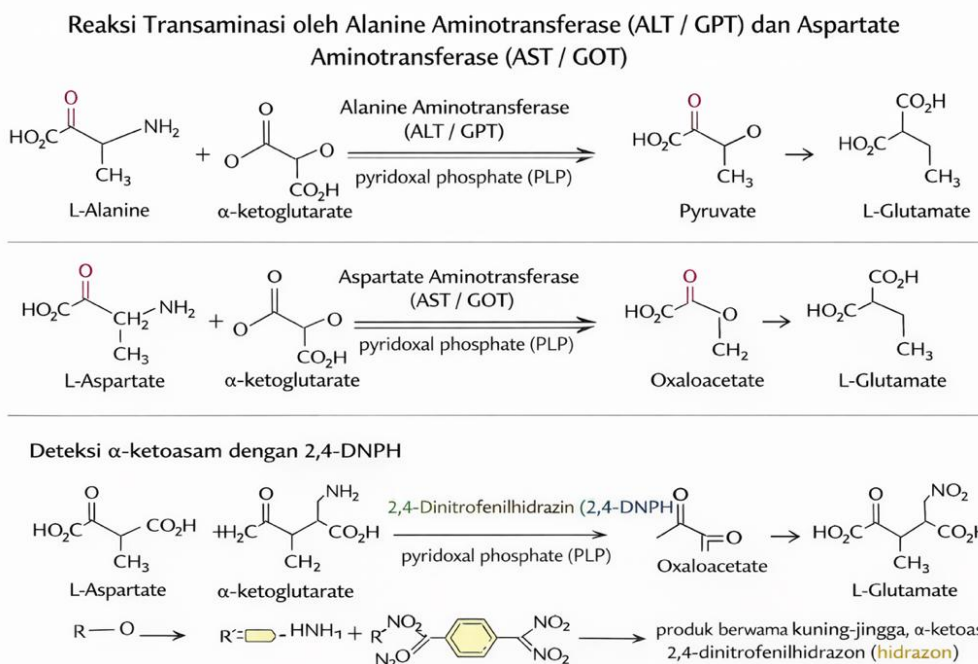
## AKTIVITAS SPESIFIK GLUTAMAT-PIRUVAT TRANSAMINASE (GPT) DAN GLUTAMAT- OKSALOASETAT TRANSAMINASE (GOT) PADA HATI DAN JANTUNG SAPI

---

### Pendahuluan

*Glutamate Pyruvate Transaminase* (GPT) dan *Glutamate Oxaloacetate Transaminase* (GOT) merupakan enzim golongan aminotransferase yang berperan penting dalam metabolisme asam amino. Kedua enzim ini tersebar pada berbagai jaringan, terutama hati dan jantung, dengan distribusi dan aktivitas spesifik yang berbeda sesuai fungsi fisiologis masing-masing jaringan.

GPT dan GOT mengkatalisis reaksi transaminasi, yaitu pemindahan gugus amino ( $-NH_2$ ) dari suatu asam amino ke suatu asam  $\alpha$ -keto, sehingga terbentuk asam  $\alpha$ -keto baru dan asam amino baru (48,49). Secara umum, reaksi tersebut dapat dinyatakan sebagai berikut:



**Gambar 13** Reaksi transaminase oleh GPT dan GPT (50)

Dalam konteks fisiologis, aktivitas GPT banyak berkaitan dengan metabolisme alanin dan piruvat, sedangkan GOT berperan dalam konversi aspartat dan oksaloasetat yang terintegrasi dengan siklus asam sitrat serta metabolisme energi sel. Oleh karena itu, perbedaan aktivitas spesifik kedua enzim pada jaringan hati dan jantung mencerminkan karakteristik metabolik dan kebutuhan energi masing-masing jaringan (51).

Pengukuran aktivitas enzim transaminase dapat dilakukan melalui beberapa pendekatan analitik. Pada praktikum ini digunakan metode kolorimetri Reitman dan Frankel, yang didasarkan pada reaksi antara asam  $\alpha$ -keto hasil transaminasi dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH) membentuk senyawa hidrazon berwarna. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi produk reaksi dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 505 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung aktivitas enzim dalam satuan tertentu, sehingga dapat dibandingkan aktivitas spesifik GPT dan GOT pada jaringan hati dan jantung sapi (51).

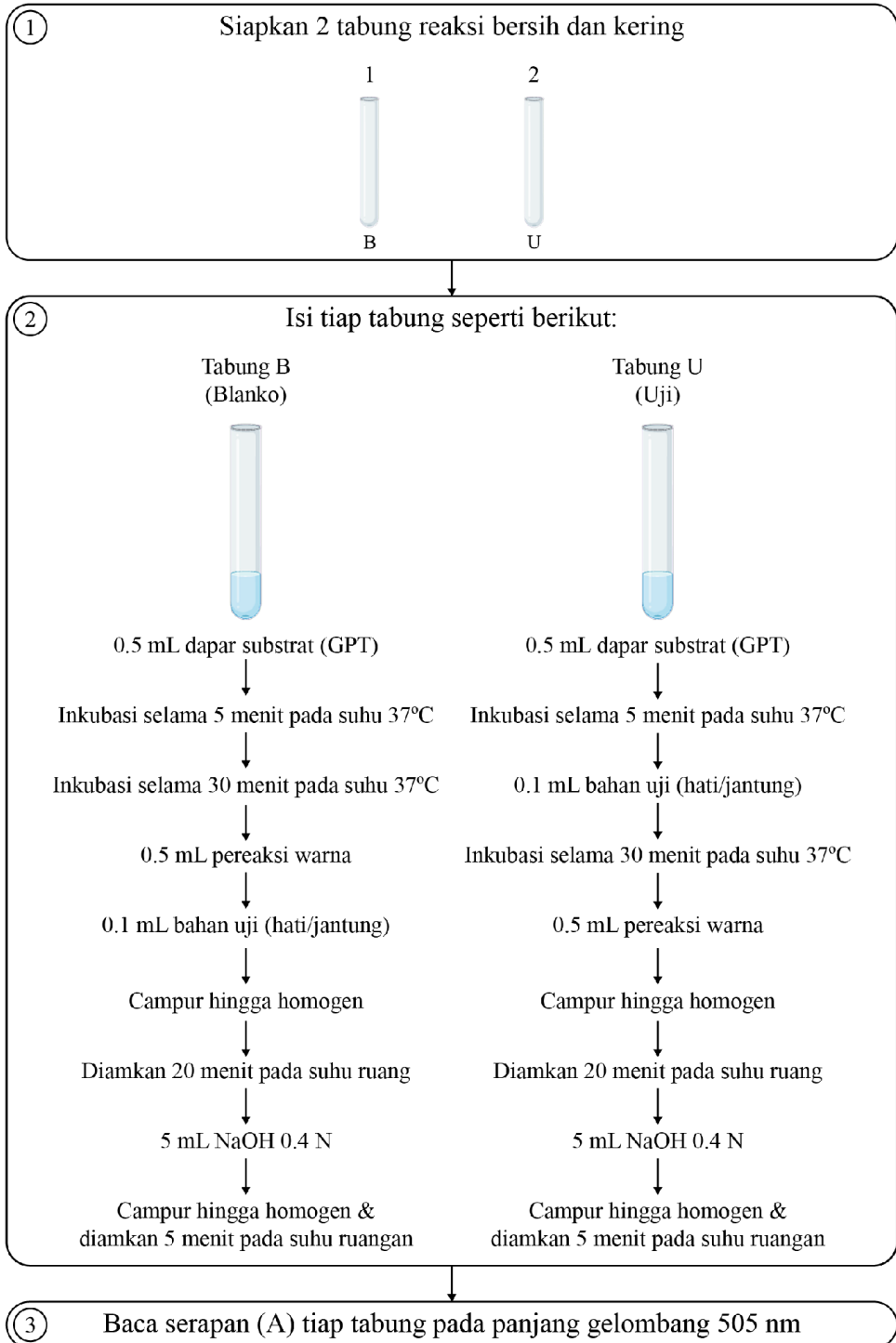
### **Tujuan Praktikum**

Praktikum ini bertujuan untuk memahami dan mengkaji konsep aktivitas spesifik enzim, yaitu besarnya aktivitas enzim yang dinyatakan per satuan kadar protein total dari sumber enzim tersebut. Aktivitas spesifik merupakan parameter penting dalam analisis biokimia karena mencerminkan tingkat kemurnian relatif dan konsentrasi fungsional suatu enzim dalam campuran protein. Melalui pendekatan ini, mahasiswa diharapkan mampu menginterpretasikan hubungan antara aktivitas katalitik enzim dan kandungan protein total dalam suatu ekstrak jaringan.

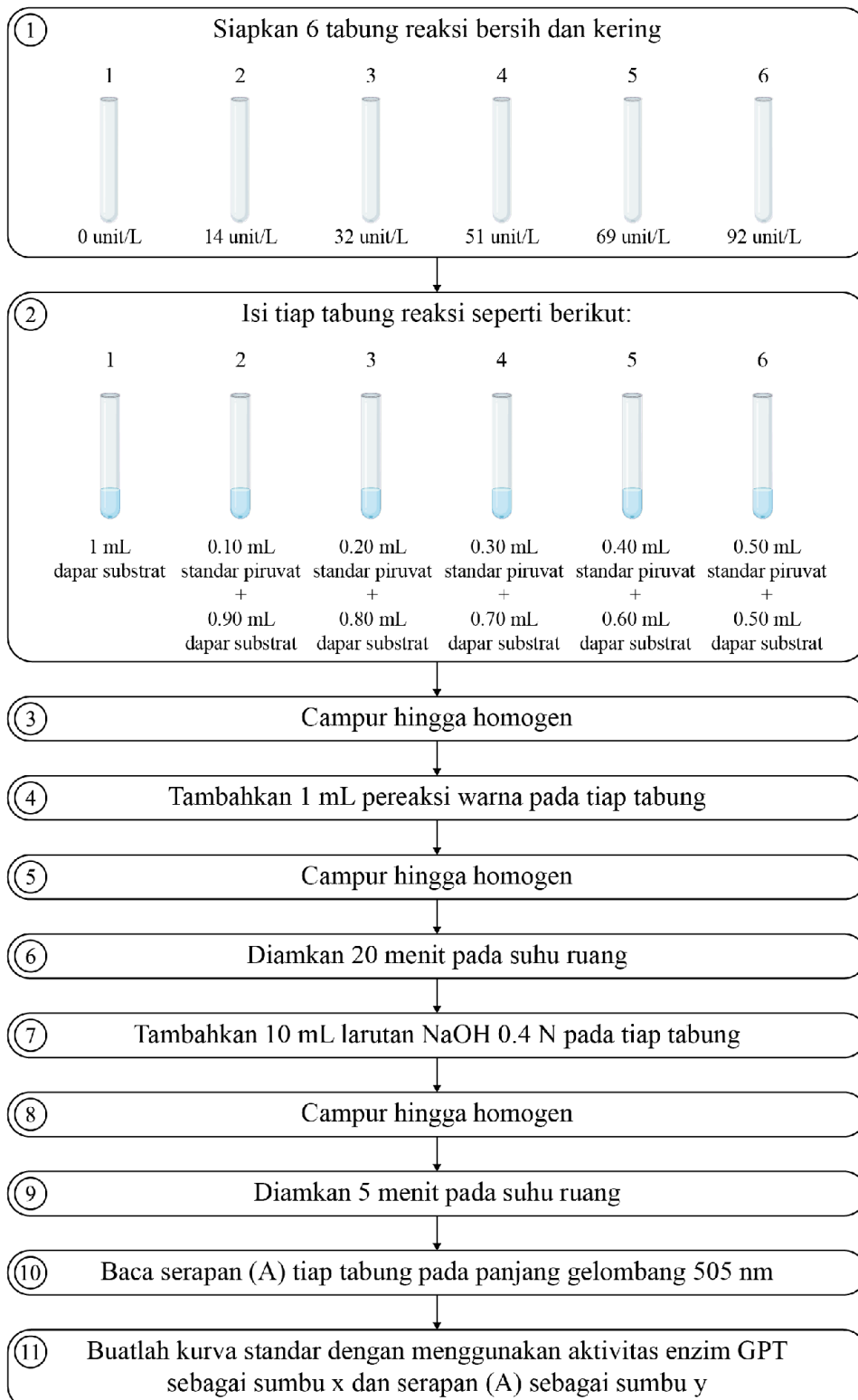
Selain itu, praktikum ini bertujuan untuk membandingkan nilai aktivitas spesifik enzim yang sama yang berasal dari dua sumber jaringan yang berbeda. Dalam percobaan ini akan dikaji aktivitas spesifik enzim GPT dan GOT yang diperoleh dari jaringan hati dan jantung sapi. Melalui perbandingan tersebut, mahasiswa diharapkan dapat memahami bahwa nilai aktivitas spesifik suatu enzim tidak selalu identik antar jaringan, melainkan dapat berbeda secara signifikan sesuai dengan karakteristik fisiologis dan fungsi metabolik masing-masing organ.

## Macam Percobaan

### 1. Pengukuran aktivitas enzim GPT

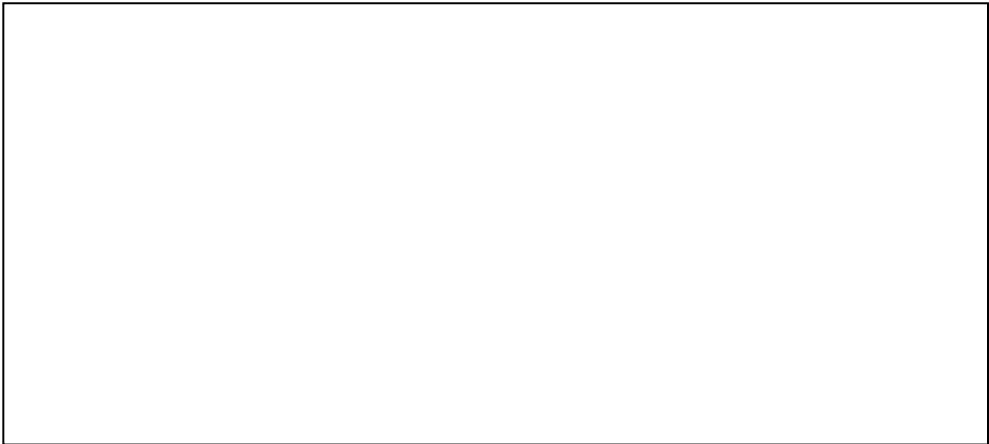


## 2. Pembuatan kurva standar GPT



### Hasil

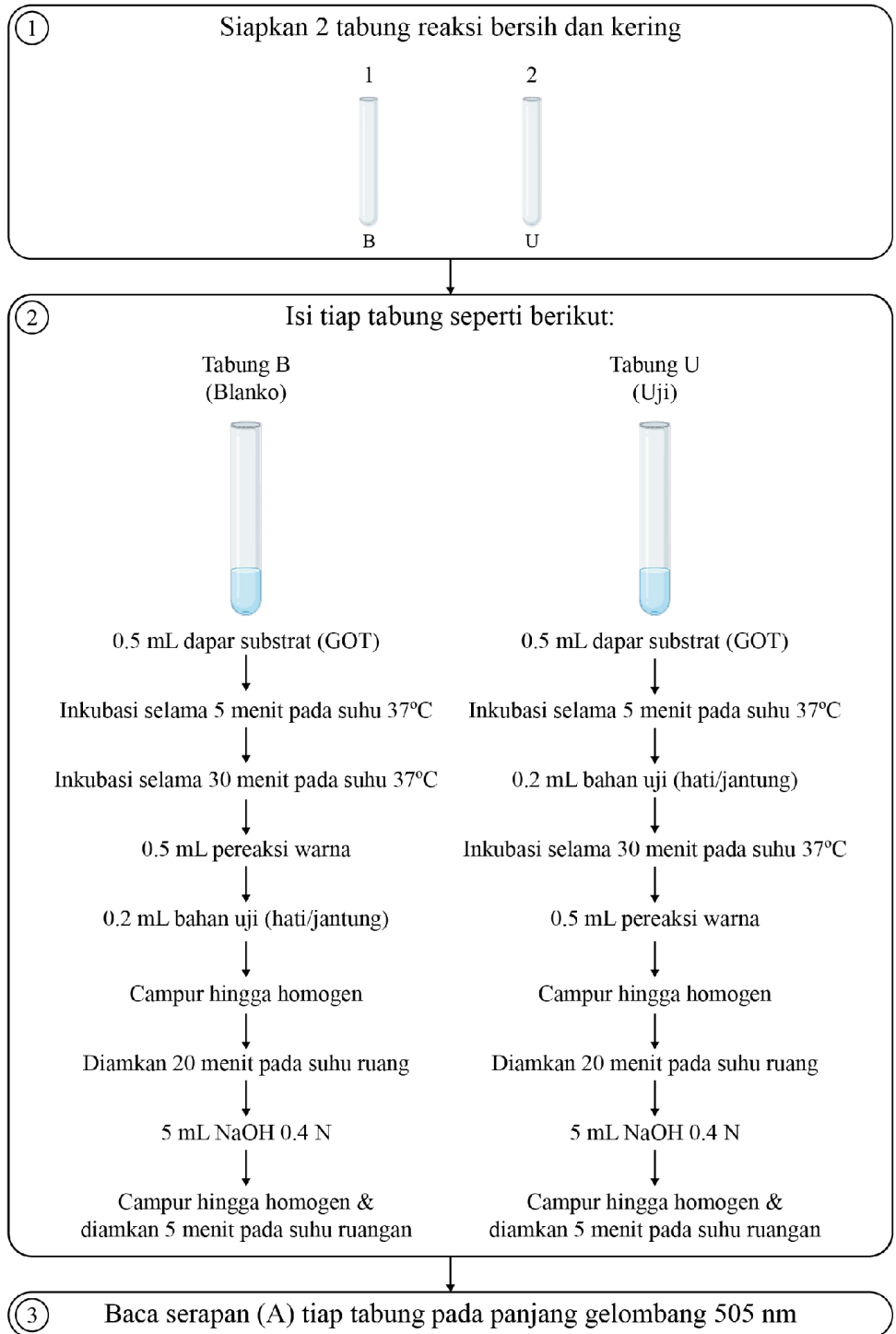
1. Gambarlah kurva standar yang menyatakan hubungan antara aktivitas enzim GPT dengan serapan, dengan menggunakan aktivitas enzim sebagai sumbu  $x$  dan serapan ( $A$ ) sebagai sumbu  $y$ .



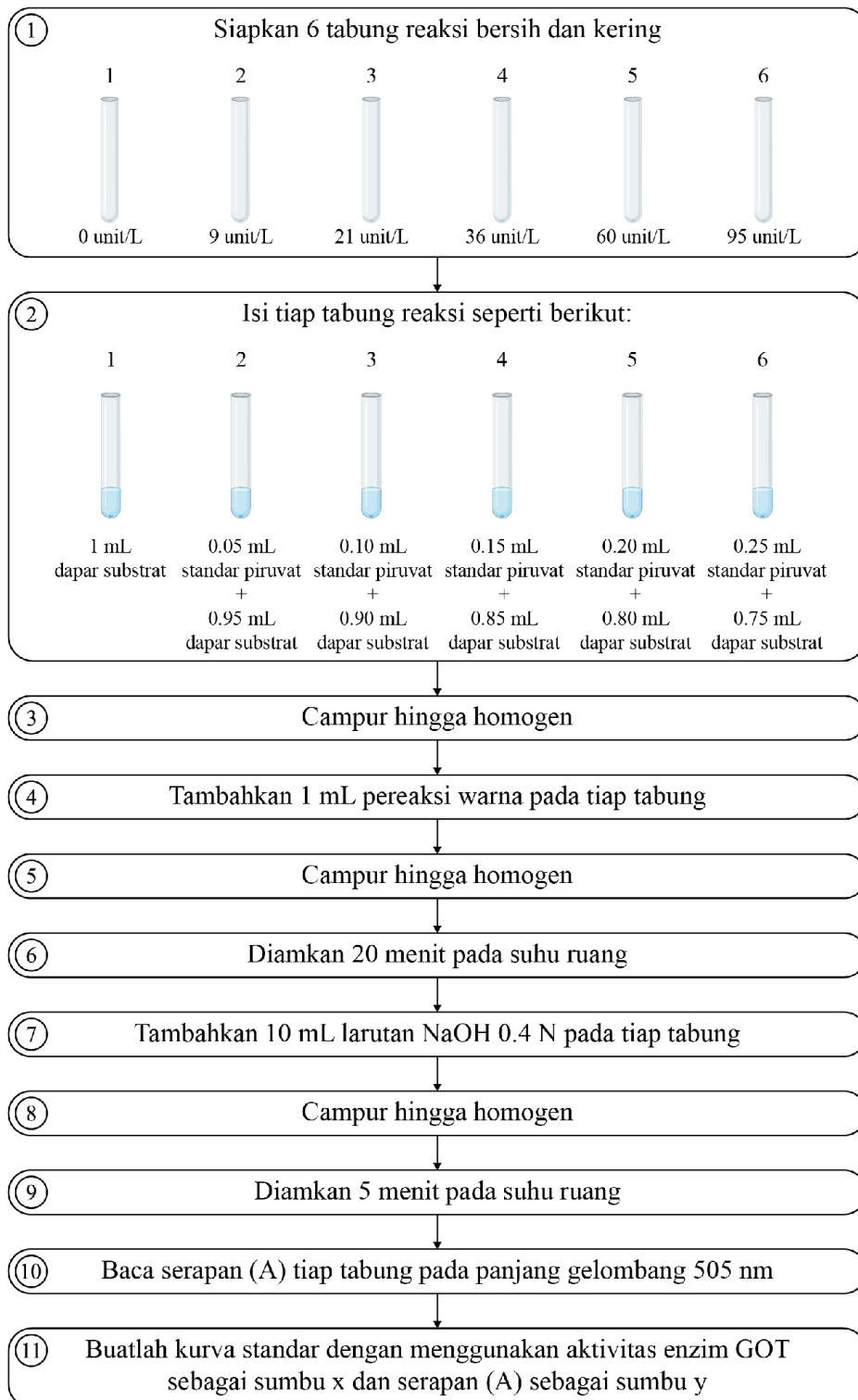
2. Dari persamaan garis regresi linier yang diperoleh, hitunglah nilai aktivitas enzim GPT.



### 3. Pengukuran aktivitas enzim GOT

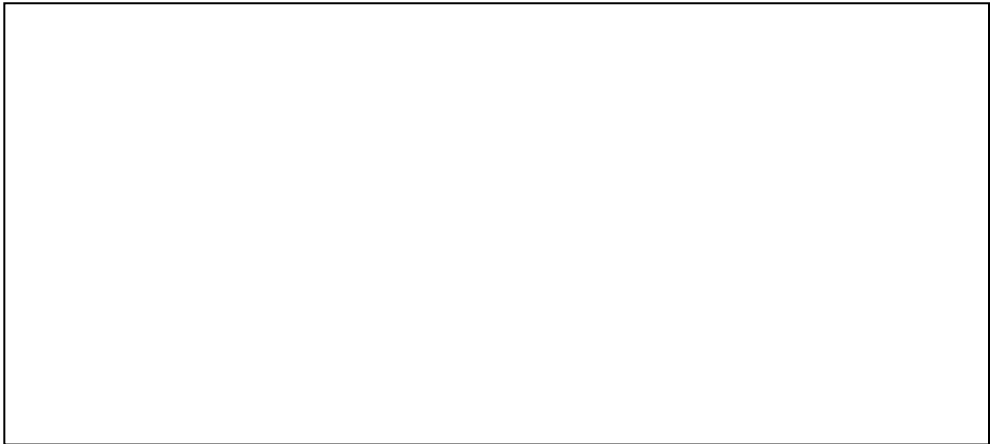


#### 4. Pembuatan kurva standar GOT



### Hasil

1. Gambarlah kurva standar yang menyatakan hubungan antara aktivitas enzim GPT dengan serapan, dengan menggunakan aktivitas enzim sebagai sumbu  $x$  dan serapan ( $A$ ) sebagai sumbu  $y$ .



2. Dari persamaan garis regresi linier yang diperoleh, hitunglah nilai aktivitas enzim GPT.



# PRAKTIKUM

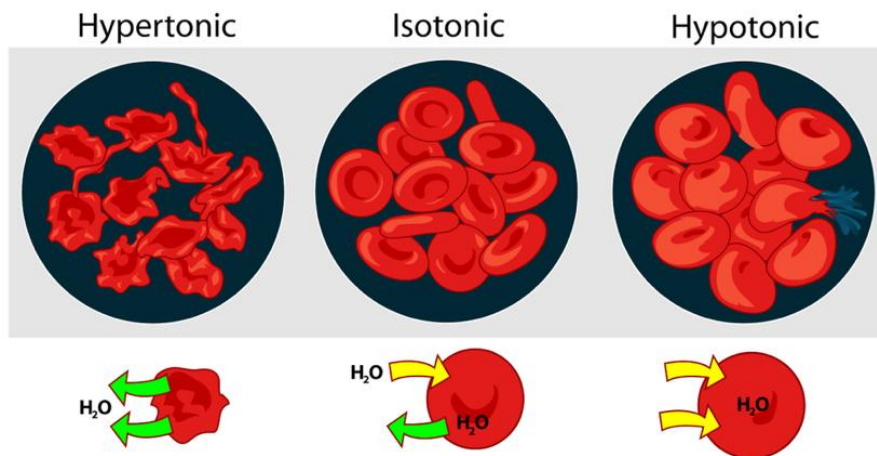
## SIFAT-SIFAT MEMBRAN

---

### Pendahuluan

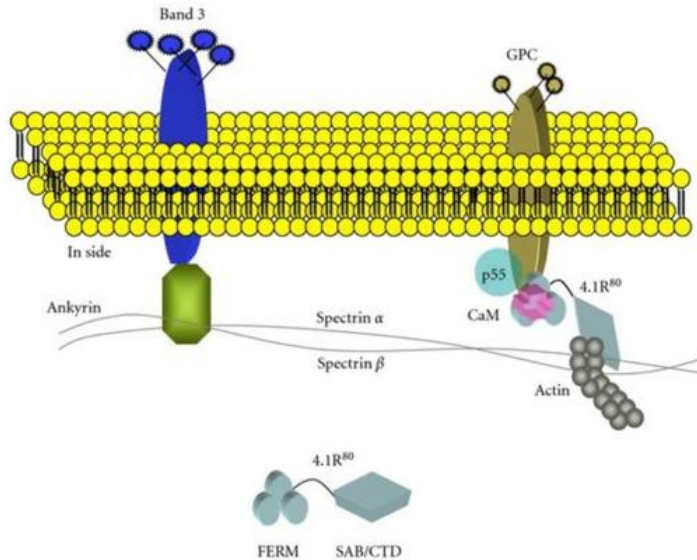
Membran biologis merupakan struktur fundamental yang membatasi dan melindungi sel serta organel di dalamnya. Struktur umum membran biologis terdiri dari dua komponen utama: lipid dan protein, yang tersusun dalam bentuk lapisan ganda lipid (*lipid bilayer*) dan diikat oleh interaksi nonkovalen (52).

Lapisan ganda lipid ini berfungsi sebagai penghalang selektif yang relatif impermeabel terhadap molekul-molekul yang larut dalam air, memungkinkan sel untuk mempertahankan lingkungan internal yang stabil. Protein membran, yang tertanam dalam atau terasosiasi dengan *lipid bilayer*, memainkan peran penting dalam berbagai fungsi seluler. Beberapa protein membran bertindak sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia, sementara yang lain berfungsi sebagai reseptor untuk menerima dan mentransduksi sinyal kimia dari lingkungan eksternal ke dalam sel (53).



**Gambar 14** Osmosis melalui membran semipermeabel akibat perbedaan konsentrasi zat terlarut (54)

Interaksi antara lipid dan protein dalam membran tidak hanya penting untuk stabilitas struktural, tetapi juga mempengaruhi dinamika dan fungsi membran secara keseluruhan. Pemahaman mendalam tentang struktur dan fungsi membran biologis sangat penting dalam berbagai bidang, termasuk biokimia, fisiologi, dan pengembangan terapi medis (52,53).



**Gambar 15** Membran sel darah merah (55)

Berbagai percobaan berikut memperlihatkan hal-hal yang mempengaruhi membran sel darah merah dan suatu model mengenai proses difusi larutan koloid melalui suatu membran.

### **Tujuan Praktikum**

1. Menunjukkan pengaruh larutan hiper/hipotonik terhadap membran sel darah merah.
2. Menunjukkan pengaruh pelarut organik terhadap fragilitas membran sel darah merah.
3. Menunjukkan bahwa suatu larutan koloid tidak dapat berdifusi melalui membran dialisis.

### **Macam Percobaan**

#### **1. Hemolisis sel darah merah**

**Tujuan Praktikum:** Menunjukkan pengaruh larutan hipertonik atau hipotonik terhadap membran sel darah merah.

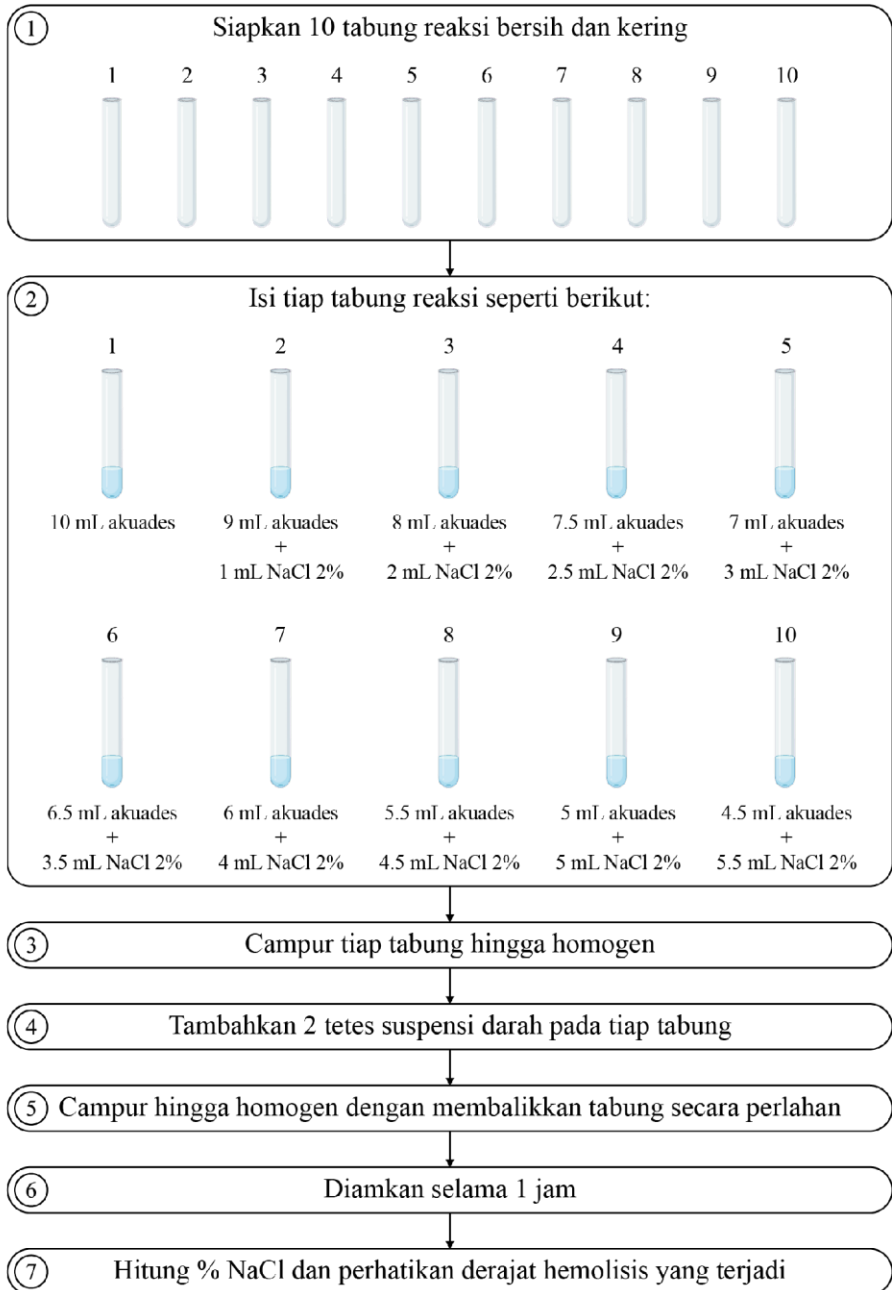
**Prinsip Dasar:** Dalam larutan hipotonik sel darah merah akan mengembang karena cairan dari luar sel akan masuk ke dalam sel darah merah. Bila pembengkakan SDM melalui batas fragilitas SDM, sel itu akan pecah atau terjadi hemolisis. Hemoglobin akan larut dalam cairan hipotonik sehingga

larutan akan berwarna merah jernih. Di dalam larutan hipertonik terhadap tekanan osmotik plasma darah maka cairan dari SDM akan keluar dari sel sehingga SDM akan mengkerut (*crenated*).

**Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Darah segar, dan larutan NaCl 2%

## Cara Kerja:



**Hasil:**

Tabung	% NaCl	Hemolisis
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

*Catatan:*

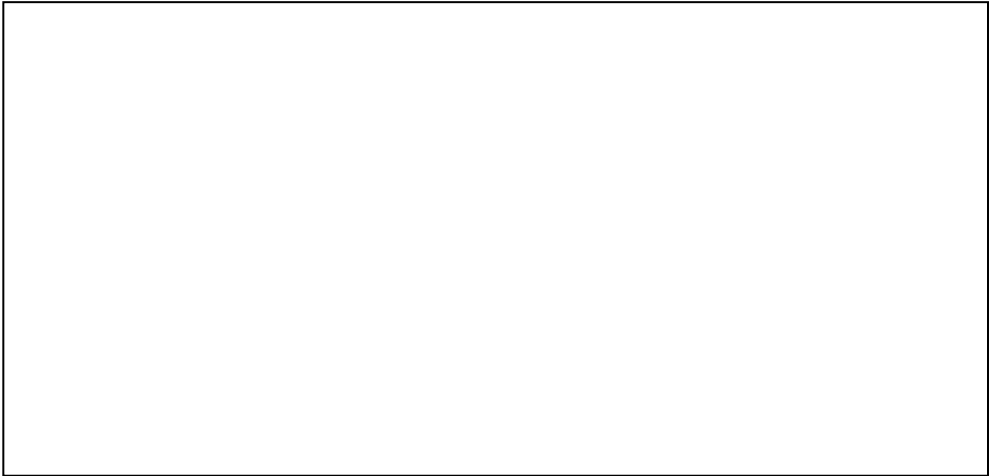
1. %NaCl dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\%NaCl = \frac{V_{NaCl} \times C_{NaCl}}{V_{total}}$$

**Keterangan:**

- $V_{NaCl}$ : volume larutan NaCl 2% yang ditambahkan
  - $C_{NaCl}$ : konsentrasi NaCl awal (2%)
  - $V_{total}$ : total volume campuran
2. Derajat hemolisis dinyatakan dengan tanda (+), (++) , dan (+++), yang ditentukan berdasarkan intensitas warna merah pada larutan. Tanda (+) menunjukkan hemolisis ringan, (++) menunjukkan hemolisis sedang, dan (+++) menunjukkan hemolisis kuat.

**Kesimpulan:**



**Pertanyaan:**

Dari percobaan di atas berapakah resistensi osmotik minimum sel darah merah?



2. **Pengaruh pelarut organik terhadap membran sel darah merah**

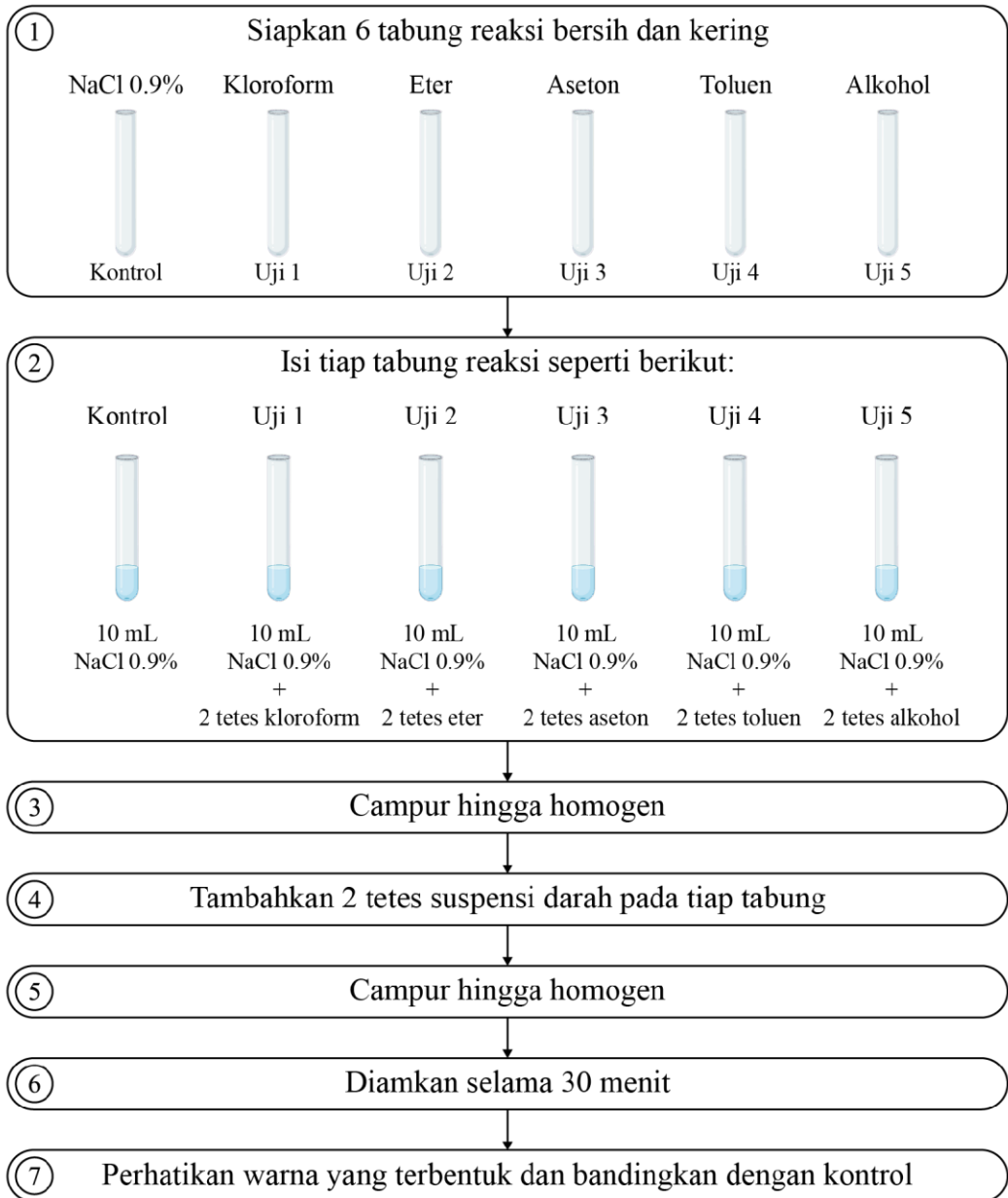
**Tujuan Praktikum:** Memperlihatkan bahwa membran sel darah merah dapat mengalami lisis dalam pelarut organik tertentu.

**Prinsip Dasar:** Membran SDM mengandung lipid. Pelarut organik tertentu yang bersifat melarutkan lemak akan menyebabkan lipid membran larut sehingga terjadi hemolisis.

**Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Darah segar, larutan NaCl 0.9%, kloroform, eter, aseton, toluene, dan alkohol

**Cara Kerja:**



**Hasil:**

Pelarut	Hemolisis
NaCl 0.9% (kontrol)	
Kloroform	
Eter	
Aseton	
Toluen	
Alkohol 96%	

**Kesimpulan:**

--

# PRAKTIKUM

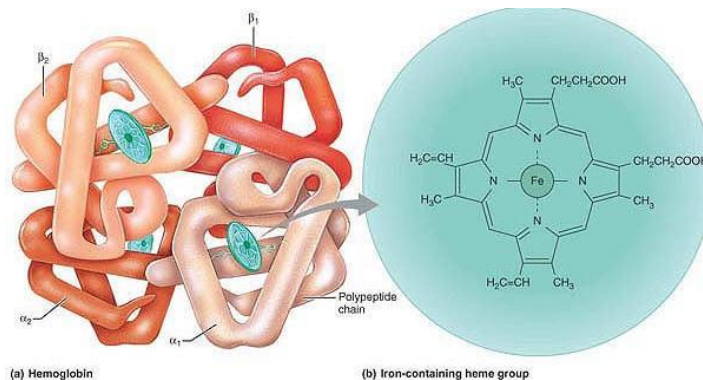
## HEMOGLOBIN DAN SIFAT MEMBRAN

### Pendahuluan

Hemoglobin (Hb) adalah protein utama dalam sel darah merah (eritrosit) yang berperan penting dalam transportasi oksigen dan karbon dioksida dalam tubuh. Fungsi utama hemoglobin meliputi:

1. Mengikat dan mengangkut oksigen dari paru-paru ke seluruh jaringan tubuh.
2. Mengikat dan mengangkut karbon dioksida dari jaringan tubuh kembali ke paru-paru.
3. Memberikan warna merah pada darah.
4. Mempertahankan keseimbangan asam-basa dalam tubuh.

Struktur hemoglobin terdiri dari empat subunit protein (dua rantai alfa dan dua rantai beta), masing-masing terikat pada gugus prostetik heme yang mengandung atom besi. Setiap molekul hemoglobin memiliki berat molekul sekitar 64.610 Dalton dan dapat mengikat hingga empat molekul oksigen. Konsentrasi hemoglobin dalam darah bervariasi tergantung pada jenis kelamin dan usia individu. Pada pria dewasa, kadar normal berkisar antara 13.8 hingga 17.2 g/dL, sedangkan pada wanita dewasa berkisar antara 12.1 hingga 15.1 g/dL (56–58)

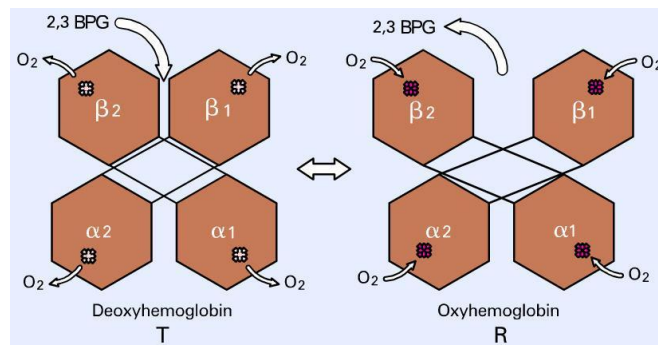


Gambar 16 Hemoglobin (58)

Hemoglobin (Hb) adalah protein dalam sel darah merah yang berfungsi mengangkut oksigen dari paru-paru ke jaringan tubuh. Setiap molekul hemoglobin terdiri dari empat subunit (dua rantai alfa dan dua rantai beta), masing-masing mengandung gugus heme dengan atom besi ( $\text{Fe}^{2+}$ ) di pusatnya. Atom besi ini memiliki enam posisi koordinasi; empat di antaranya terikat pada nitrogen dalam cincin

porfirin, posisi kelima terikat pada residu histidin proksimal dari rantai globin, dan posisi keenam tersedia untuk mengikat molekul oksigen secara reversible (56).

Ketika oksigen terikat pada posisi koordinasi keenam, hemoglobin berada dalam bentuk teroksigenasi (oksihemoglobin,  $\text{HbO}_2$ ). Sebaliknya, ketika oksigen dilepaskan, hemoglobin berada dalam bentuk deoksihemoglobin (Hb). Proses pengikatan dan pelepasan oksigen ini bersifat reversibel dan menunjukkan efek kooperatif, di mana pengikatan satu molekul oksigen meningkatkan afinitas hemoglobin terhadap molekul oksigen berikutnya (59).



**Gambar 17** Oksi dan deoksi Hb (60)

Hemoglobin (Hb) memiliki kemampuan untuk berikatan dengan karbon monoksida (CO), gas beracun yang dihasilkan dari pembakaran tidak sempurna. Afinitas hemoglobin terhadap CO sekitar 200 hingga 250 kali lebih tinggi dibandingkan dengan oksigen, membentuk karboksihemoglobin ( $\text{HbCO}$ ). Pembentukan  $\text{HbCO}$  ini menghambat kemampuan hemoglobin untuk mengangkut oksigen, menyebabkan hipoksia jaringan meskipun kadar oksigen dalam darah tampak normal (61).

Selain itu, hemoglobin dapat mengalami oksidasi pada atom besi pusatnya dari bentuk ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) menjadi ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ), menghasilkan methemoglobin (MetHb). Methemoglobin tidak mampu mengikat oksigen, sehingga mengurangi kapasitas pengangkutan oksigen dalam darah dan dapat menyebabkan kondisi yang disebut methemoglobinemia (62).

Untuk mengidentifikasi berbagai derivat hemoglobin seperti oksihemoglobin ( $\text{HbO}_2$ ), deoksihemoglobin (Hb), karboksihemoglobin ( $\text{HbCO}$ ), dan methemoglobin (MetHb), teknik spektrofotometri dapat digunakan. Setiap derivat memiliki spektrum serapan cahaya yang unik, memungkinkan identifikasi berdasarkan panjang gelombang spesifik yang diserap. Metode ini efektif dalam analisis kuantitatif dan kualitatif derivat hemoglobin dalam sampel darah (63).

## Tujuan Praktikum

Untuk memahami berbagai bentuk dan fungsi fisiologis dari hemoglobin, praktikum ini bertujuan sebagai berikut:

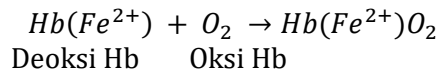
1. Memperlihatkan bahwa hemoglobin dapat mengikat dan melepaskan oksigen.
2. Memperlihatkan bahwa ikatan Hb dengan karbonmonoksida jauh lebih kuat dibandingkan ikatan Hb dengan oksigen.
3. Memperlihatkan bahwa besi dalam molekul Hb bila dioksidasi akan menjadi MetHb dan tidak dapat mengikat oksigen lagi.
4. Demonstrasi spektrum derivat – derivat hemoglobin.
5. Penetapan kadar Hb kuantitatif (cara sianmethemoglobin).

## Macam Perobaan

### 1. Uji oksihemoglobin dan deoksihemoglobin

**Tujuan Praktikum:** Membuktikan hemoglobin dapat mengikat oksigen membentuk oksihemoglobin ( $HbO_2$ ) dan dapat terurai kembali menjadi  $O_2$  dan deoksihemoglobin.

**Prinsip Dasar:** Dalam keadaan tereduksi Fe dalam molekul Hb dapat mengikat dan melepaskan oksigen tergantung pada tekanan  $O_2$  dan  $CO_2$ .

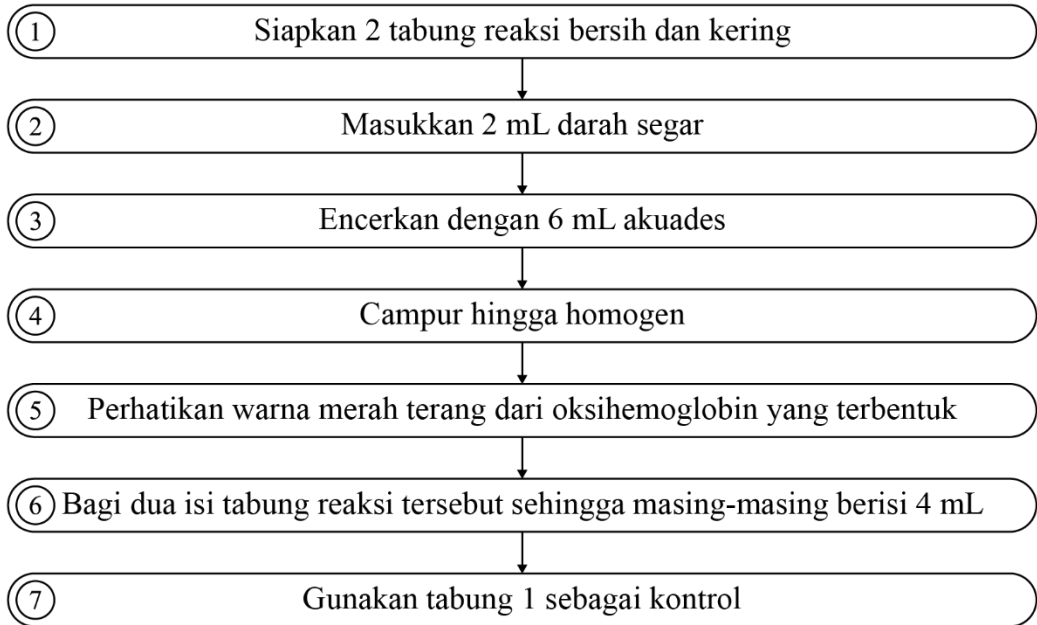


### Alat dan Bahan:

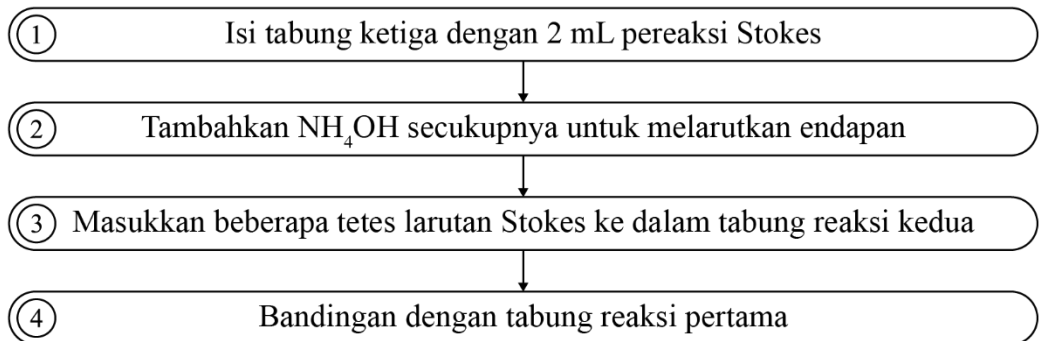
- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Darah segar, pereaksi Stokes, dan larutan  $NH_4OH$

**Cara Kerja:**

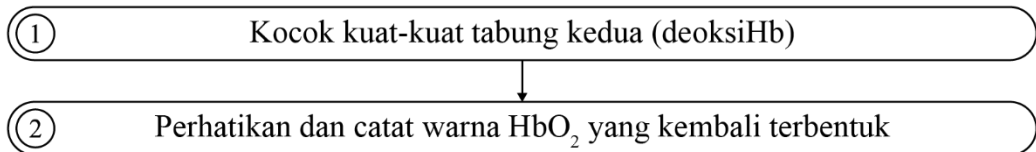
i. Oksi Hb



ii. Pembentukan deoksi Hb



iii. Pembentukan kembali oksi Hb dari deoksi Hb



**Hasil:**

Hasil (warna tabung)	Tabung 1 OksiHb	Tabung 2 DeoksiHb	Tabung 3 Reoksigenasi deoksi Hb

**Kesimpulan:**

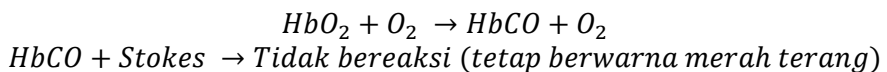
**Pertanyaan:**

1. Peristiwa faal apakah yang ditiru dari percobaan ini?

**2. Uji terhadap karbonmonoksida hemoglobin (HbCO)**

**Tujuan Praktikum:** Membuktikan bahwa Hb dapat mengikat CO yang ikatannya lebih kuat dari pada Hb dengan O<sub>2</sub>.

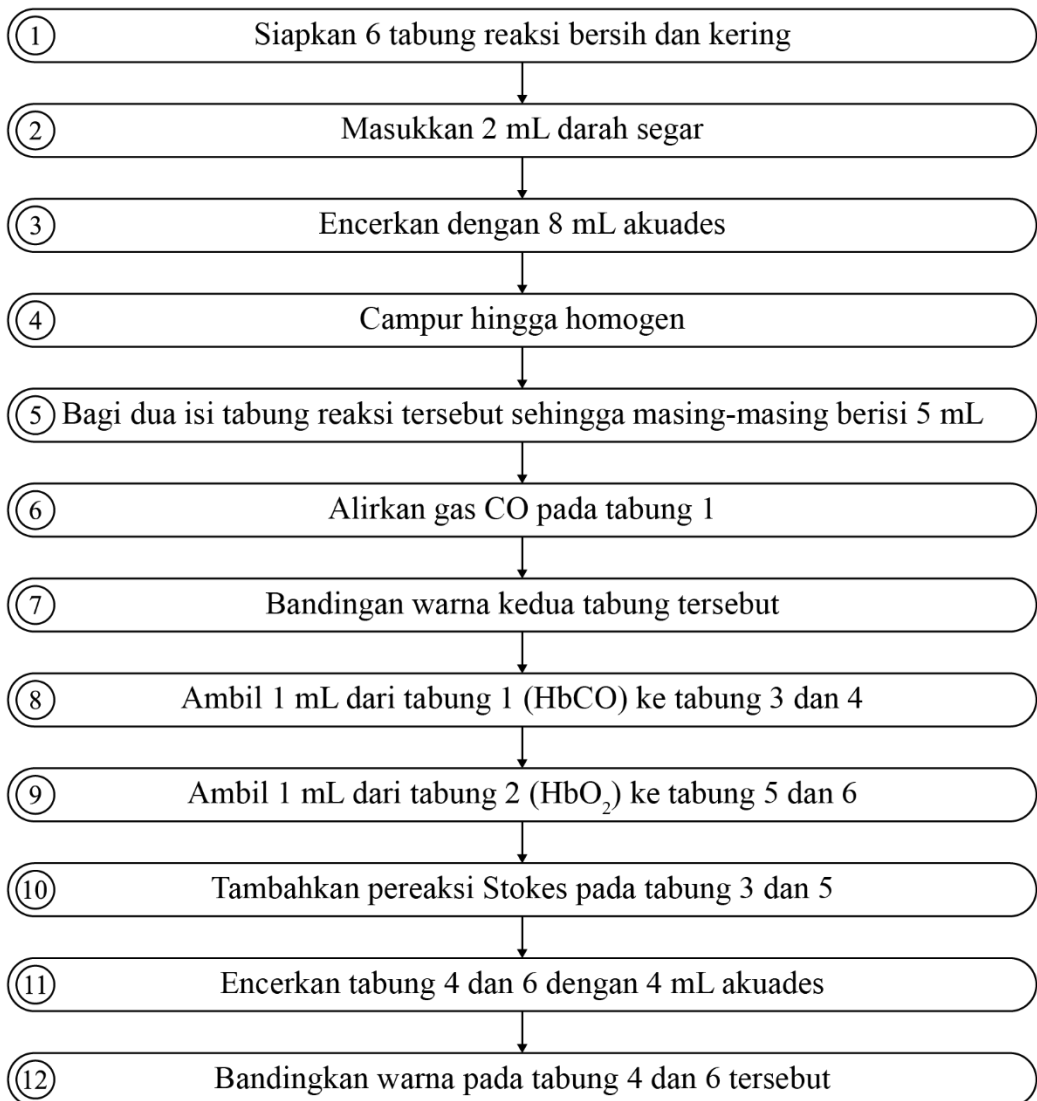
**Prinsip Dasar:** Gas CO yang berasal dari proses – proses pembakaran yang tidak sempurna dapat mengikat Hb membentuk HbCO. Ikatan ini sangat kuat (lebih kurang 200 kali lebih kuat daripada ikatan Hb dengan oksigen). HbCO berwarna merah terang.



**Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Darah segar, sumber gas CO, pereaksi Stokes, dan  $\text{NH}_4\text{OH}$

**Cara Kerja:**



**Hasil:**

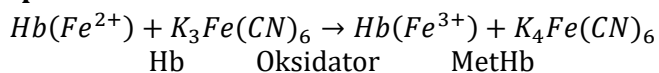
Tabung	Oksi Hb	Karbonmonoksi Hb
Warna sebelum penambahan pereaksi Stokes		
Warna setelah penambahan pereaksi Stokes		

**Kesimpulan:****Pertanyaan:**

Gejala-gejala apakah yang jelas terlihat pada seseorang yang keracunan CO?

**3. Uji untuk methemoglobin**

**Tujuan Praktikum:** Memperlihatkan bila besi dalam molekul hemoglobin dioksidasi menjadi  $Fe^{3+}$ , maka terbentuk methHb yang tidak lagi bisa mengikat oksigen

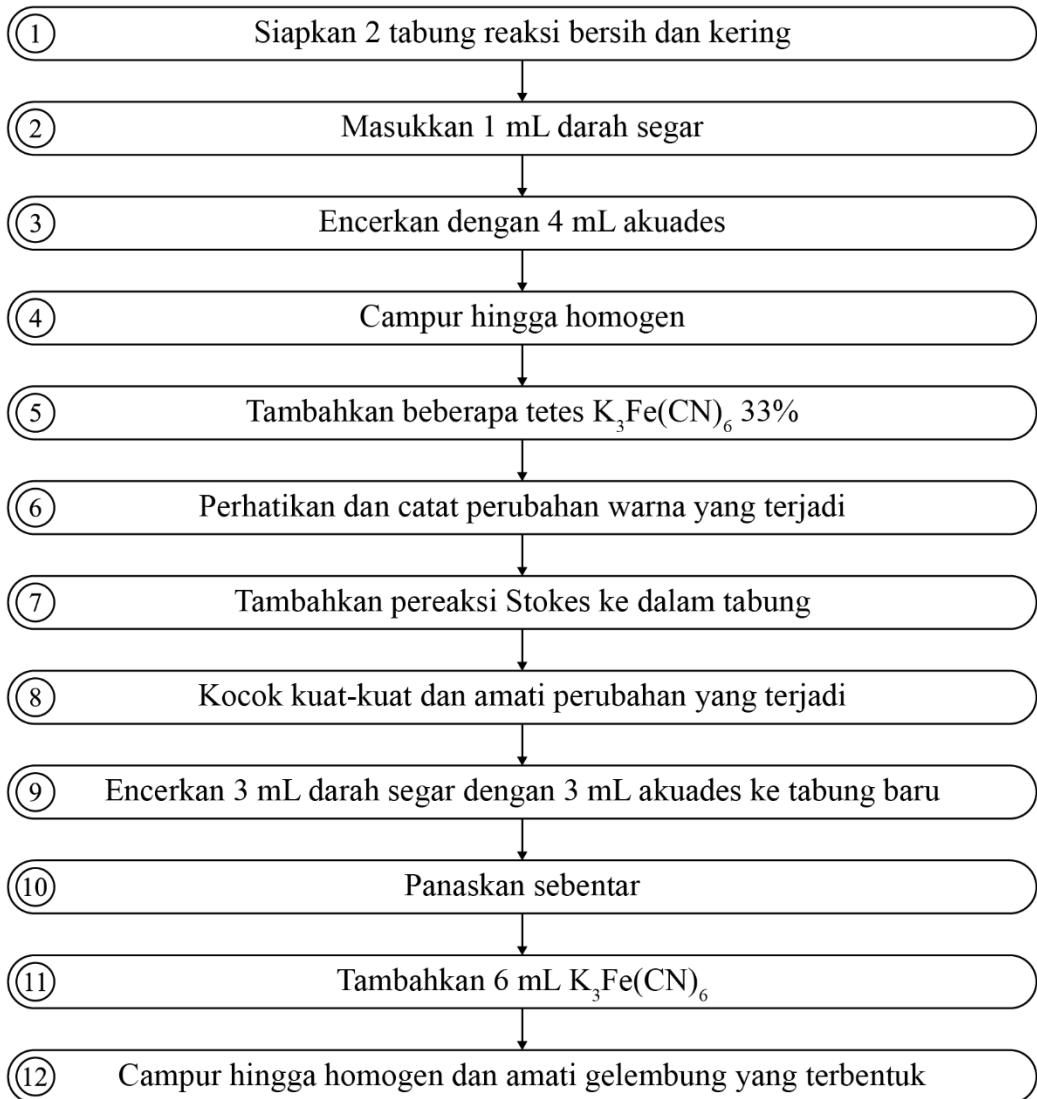
**Prinsip Dasar:**

MethHb ini tidak dapat lagi mengikat oksigen.

**Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Tabung reaksi
- ii. Bahan: Darah segar, pereaksi  $K_3Fe(CN)_6$ , pereaksi Stokes

### Cara Kerja:



**Hasil:**

Tabung	Warna Tabung 1
+ $K_3Fe(CN)_6$	
Pengocokan kuat	
+ Stokes	
Pengocokan kuat	

Tabung	Warna Tabung 2
+ $K_3Fe(CN)_6$	
Gelembung udara	

**Kesimpulan:**

**Pertanyaan:**

1. Percobaan ini terdiri dari dua bagian, apakah perbedaan dari kedua percobaan itu?

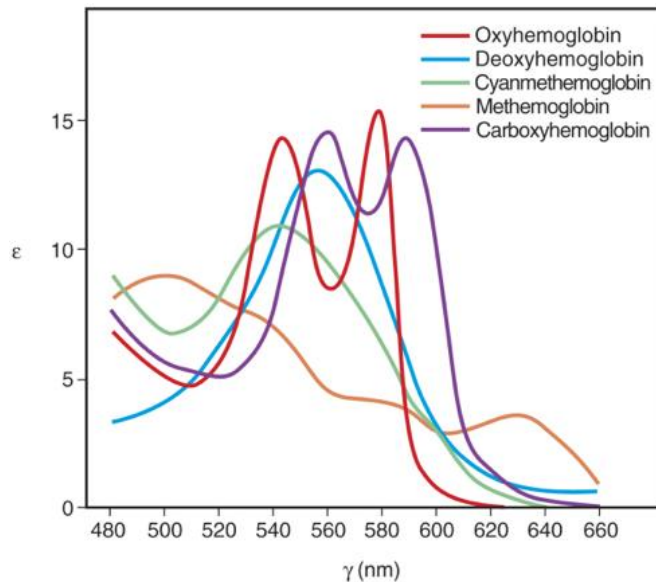
**4. Demonstrasi spektrum hemoglobin**

**Prinsip Dasar:** Derivat-derivat Hb masing-masing dapat dibedakan dengan menggunakan alat spektrofotometer, yaitu suatu teknik yang berdasarkan perbedaan serapan warna - warna tertentu dari spektrum cahaya putih. Bila suatu larutan berisi suatu zat warna diletakkan di antara alat tersebut dan sumber cahaya, akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu.

**Alat dan Bahan:**

- i. Alat: Spektrofotometer
- ii. Bahan: Derivat-derivat Hb yang sudah diencerkan

**Cara Kerja:** Untuk percobaan ini akan diperlihatkan spektrum serapan Hb dan beberapa derivatnya. Jelas tidaknya pita – pita serapan tergantung juga dari pengenceran zat yang diperiksa. Untuk pemeriksaan spektrofotometer ini darah perlu diencerkan ( $\pm 100$  kali). Untuk oksihb terdapat 2 serapan maksimal yaitu 577 nm dan yang lain 542 nm dan yang ketiga pada 415 nm (pita ini hampir tidak terlihat karena sudah mendekati sinar ultra ungu). Untuk deoksiHb pita serapannya lebih lebar dan terletak pada 559 nm. karbonmonoksidaHb pita spektrumnya terdapat pada 570 nm dan 542 nm. MetHb netral mempunyai serapan pada 634 nm.



<b><i>Derivative of hemoglobin</i></b>	<b><i>Absorption maxima (nm)</i></b>
Deoxyhemoglobin	431, 555
Oxyhemoglobin	414, 540, 578
Methemoglobin (acidic form)	404, 500, 630
Carbonyl hemoglobin	420, 538-540, 568-569
Cyanmethemoglobin	421, 540

**Gambar 18** Spektrum & nomenklatur serapan derivat Hb (64)

**Hasil:**

<b>Derivat Hb</b>	<b>Jumlah serapan maksimal dan lokasi</b>
Oksi Hb	
Deoksi Hb	
COHb	
MetHb	

# PRAKTIKUM

## HIPOKSIA, OKSIDATIF STRESS, DAN ANTIOKSIDAN

---

### Pendahuluan

Oksigen adalah unsur vital bagi seluruh organisme eukariota, esensial untuk memicu reaksi fosforilasi oksidatif dalam rantai pernapasan mitokondria yang berperan dalam produksi energi (65). Oleh karena itu, mempertahankan suplai oksigen yang konsisten ke semua organ merupakan hal yang sangat krusial, dan pada mamalia, tugas ini diemban oleh sistem kardiovaskular. Distribusi oksigen ke jaringan diatur oleh fungsi pembuluh darah, sementara kebutuhan oksigen ditentukan oleh jumlah sel yang ada dalam jaringan tersebut (66).

Meskipun udara atmosfer yang kita hirup mengandung sekitar 21% O<sub>2</sub>, konsentrasi oksigen di dalam jaringan tubuh cenderung lebih rendah, bervariasi antara 0,5-12%, tergantung pada tingkat vaskularisasi dan konsumsi oksigennya (67). Sebagai ilustrasi, kadar O<sub>2</sub> di alveoli paru-paru sekitar 14%, dalam darah arteri 12%, di vena 5-6%, di miokard >10%, serta di hati, jaringan ikat, dan sumsum tulang sekitar 2-8%. Rentang kadar oksigen yang lebar di berbagai sel, jaringan, dan organ ini menyulitkan dalam merumuskan definisi tunggal hipoksia. Namun, secara praktis dan relevan untuk tujuan klinis serta kondisi fisiologis, hipoksia didefinisikan sebagai suatu keadaan di mana pasokan oksigen tidak memadai untuk memenuhi kebutuhan sel, jaringan, atau organ, sehingga mengganggu fungsi biologisnya (68). Hipoksia dapat dipicu oleh beberapa faktor, meliputi:

- **Hipoksia hipoksemik:** Kondisi rendahnya tekanan parsial O<sub>2</sub> di dalam arteri (69).
- **Hipoksia anemik:** Penurunan kemampuan hemoglobin dalam mengangkut O<sub>2</sub> akibat anemia (70).
- **Hipoksia iskemik:** Berkurangnya aliran darah (perfusi) ke jaringan, baik secara umum maupun lokal (69).
- **Hipoksia histotoksik atau sitotoksik:** Penurunan kapasitas jaringan untuk memanfaatkan O<sub>2</sub> karena adanya keracunan pada sel atau jaringan (71).
- **Hipoksia difusi:** Gangguan dalam proses difusi oksigen yang disebabkan oleh aliran darah yang berlawanan arah di dalam pembuluh kapiler (69).

Hipoksia merepresentasikan kondisi stres lingkungan yang parah, yang dapat membahayakan kelangsungan hidup sel. Telah diketahui bahwa hipoksia dapat terjadi selama proses perkembangan embrio, dalam kondisi fisiologis normal, dan pada

berbagai kondisi patofisiologis (68,72). Dengan demikian, kemampuan untuk merasakan perubahan oksigen (*oxygen sensing*) menjadi sangat penting dalam menjaga keseimbangan oksigen (homeostasis), baik pada skala sistemik maupun pada tingkat seluler dan molekuler (73). Terlepas dari penyebabnya, organisme aerob telah mengembangkan beragam mekanisme untuk mendeteksi oksigen dan merespons kondisi hipoksia. Mamalia, termasuk manusia, menunjukkan dua jenis respons yang berbeda: respons tingkat sistemik atau organisme keseluruhan, yang bersifat akut atau refleksif; dan respons tingkat seluler dan molekuler, yang bersifat kronis-adaptif (68,72).

Pada tingkat sistemik, deteksi hipoksia dilakukan oleh kemoreseptor yang tersebar di pusat dan perifer tubuh. Kemoreseptor pusat yang berlokasi di sistem saraf pusat melibatkan area seperti talamus, hipotalamus, pons, dan medula. Aktivasi daerah-daerah yang sensitif terhadap  $O_2$  di pusat saraf ini akan memicu peningkatan aktivitas simpatis dan frekuensi pernapasan (73). Sementara itu, kemoreseptor perifer ditemukan di beberapa jaringan spesifik, termasuk *aortic bodies* dan *carotid bodies* (CB), kemoreseptor pada saluran napas berupa *neuroepithelial bodies* (NEBs), serta sel otot polos di arteri pulmonal (*pulmonary artery smooth muscle cells*, PASMIC) (73,74).

Respons akut pada dasarnya melibatkan perubahan dalam eksitabilitas, kontraksi, dan sekresi sel. Perubahan ini mencakup peningkatan laju pernapasan, denyut jantung, dan curah jantung, serta vasokonstriksi pembuluh darah paru dan pelebaran pembuluh darah sistemik. Semua ini bertujuan untuk memastikan pasokan oksigen yang cukup ke organ vital, seperti jantung dan otak (73,75). Mekanisme kompensasi ini bertumpu pada kemampuan sel glomus, atau sel tipe I, yang terdapat di kemoreseptor perifer, untuk mendeteksi oksigen. Hipoksia menginduksi penghambatan beberapa jenis kanal- $K^+$  yang sensitif terhadap oksigen, seperti kanal- $K_v$  (*voltage-gated*), kanal- $K_{Ca}$  (*calcium activated*), dan kanal-TASK (*twik-related acid sensitive K<sup>+</sup>*), yang berfungsi sebagai efektor utama dalam menerima sinyal hipoksia (76). Penghambatan ini memicu kaskade reaksi yang meliputi depolarisasi membran sel, pembukaan kanal- $Ca^{2+}$ , masuknya dan mobilisasi ion kalsium dari retikulum sarkolema, peningkatan konsentrasi ion kalsium intraseluler, serta sekresi dan pelepasan dopamin dari sel glomus (73,76). Selanjutnya, dopamin akan mengaktifkan saraf sensorik aferen yang kemudian meneruskan informasi ini ke Sistem Saraf Pusat (SSP) di batang otak. Pada akhirnya, serabut eferen simpatis dari SSP akan memicu respons sistem kardiorespiratorik terhadap hipoksia akut (73).

Respons pada tingkat sel dan molekuler merepresentasikan adaptasi terhadap hipoksia kronis, yang mulai terlihat setelah hipoksia berlangsung selama beberapa menit atau jam. Ketika suatu jaringan atau sel terpapar hipoksia, sel tersebut berisiko

mengalami kematian, baik secara langsung akibat kerusakan struktur sel oleh hipoksia, maupun sebagai konsekuensi dari gangguan metabolisme energi (penipisan ATP) (68,77). Untuk memastikan kelangsungan hidupnya, sel akan merespons lebih lanjut dengan meregulasi ekspresi berbagai gen. Melalui pengaturan ekspresi gen ini, sel melakukan adaptasi, misalnya dengan menggeser metabolisme aerob menjadi anaerob, serta meningkatkan produksi protein angiogenetik dan transporter glukosa, guna mengatasi kekurangan O<sub>2</sub> (68,78). Untuk mencapai tujuan adaptasi tersebut, sel memerlukan peran protein HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$* ) (71).

Meskipun telah lama menjadi fokus penelitian, molekul spesifik yang berperan sebagai sensor oksigen dan bagaimana sensor tersebut berinteraksi dengan kanal K<sup>+</sup> masih belum sepenuhnya terungkap (73,76). Teori yang diajukan mengenai mekanisme sensor oksigen adalah bahwa hal itu merupakan akibat dari perubahan kadar ROS (*Reactive Oxygen Species*), yang kemungkinan besar berasal dari mitokondria (khususnya kompleks III), NADH-oksidadase (*redox couples*), dan NADPH-oksidadase yang terdapat di membran sel (73,79).

### **Pengaruh Hipoksia terhadap Jantung**

Jantung mamalia adalah organ yang mutlak membutuhkan oksigen untuk berfungsi. Pada kondisi istirahat, jantung mengonsumsi antara 8 hingga 15 mL O<sub>2</sub> per menit untuk setiap 100 gram jaringannya, dan kebutuhan ini dapat melonjak drastis hingga lebih dari 70 mL O<sub>2</sub> per menit per 100 gram jaringan miokardium saat melakukan aktivitas fisik berat (80). Angka ini jauh melampaui konsumsi oksigen otak yang hanya sekitar 3 mL O<sub>2</sub> per menit per 100 gram jaringan (81). Apabila terjadi hipoksia, otot jantung mamalia tidak mampu menghasilkan energi yang memadai untuk mempertahankan fungsi vital dan kelangsungan hidupnya. Oleh karena itu, pasokan dan ketersediaan oksigen harus selalu seimbang demi memastikan fungsi jantung yang normal (82). Hipoksia pada otot jantung muncul akibat ketidaksesuaian antara ukuran otot jantung dan tuntutan oksigennya. Jika kondisi ini berlanjut dalam jangka waktu lama, hipoksia dapat memicu disfungsi ventrikel, yang seringkali diikuti oleh mekanisme kompensasi berupa hipertrofi dan peregangan dinding ventrikel (83). Hipertrofi ini bisa bersifat menguntungkan (adaptif) atau merugikan (maladaptif) yang berujung pada gagal jantung. Selain itu, hipoksia juga mengganggu metabolisme energi dengan menyebabkan penipisan ATP, yang pada akhirnya meningkatkan beban kerja jantung (84). Berdasarkan hukum Laplace, semakin besar volume ventrikel, semakin tinggi pula konsumsi oksigen per gram jaringan. Dengan demikian, tanpa memandang penyebab utamanya, jantung yang mengalami gagal dan hipertrofi akan memerlukan lebih banyak oksigen dibandingkan jantung yang sehat (85).

Peranan oksigen dalam jantung sangat kompleks, melampaui sekadar kontribusinya dalam produksi energi. Hipoksia berpotensi mengubah ekspresi sekitar 1% dari total gen dalam genom (83). Di dalam jantung, kadar oksigen menjadi penentu utama dalam mengatur ekspresi gen miokardial (86). Apabila kadar oksigen menurun akibat hipoksia, pola ekspresi gen di jantung akan mengalami perubahan yang signifikan. Penyesuaian ekspresi gen ini dengan ketersediaan oksigen terjadi melalui berbagai mekanisme, salah satunya adalah regulasi transkripsi gen oleh *Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha* (HIF-1 $\alpha$ ) (87). Selain itu, hipoksia juga berkontribusi pada peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), molekul yang dapat menyebabkan berbagai kerusakan dan bahkan kematian sel jantung (88).

Penelitian *in vivo* yang dilakukan pada hewan menunjukkan adanya peningkatan ROS, khususnya superoksida, pada jantung yang mengalami hipertrofi (89). Berbagai bukti kuat mengindikasikan bahwa ROS memegang peranan penting dalam berbagai jalur transduksi sinyal yang memicu terjadinya hipertrofi otot jantung (90). Seiring dengan perkembangan gagal jantung, stres oksidatif cenderung meningkat sementara cadangan antioksidan menurun (91). Mekanisme di mana ROS menyebabkan berbagai gangguan pada struktur dan fungsi otot jantung dapat dipahami melalui keterlibatannya dalam memediasi efek Angiotensin II (Ang II) (92,93).

### **Oksidasi Biologi**

Proses oksidasi memegang peranan krusial dalam metabolisme seluruh organisme, dengan berbagai tujuan utama, khususnya dalam reaksi yang menghasilkan energi. Sebagai contoh, oksidasi glukosa menghasilkan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>), air (H<sub>2</sub>O), dan energi (93). Oksidasi dapat terjadi melalui dua mekanisme: secara enzimatik atau non-enzimatik (94). Proses enzimatik berlangsung secara bertahap, melibatkan serangkaian enzim spesifik. Di sisi lain, proses non-enzimatik terjadi secara spontan dan membutuhkan keberadaan logam transisi seperti besi (Fe) dan tembaga (Cu), serta dapat menghasilkan radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) (95). ROS yang terbentuk ini memiliki kemampuan untuk bereaksi dengan makromolekul penting dalam tubuh, termasuk protein, lipid, dan asam nukleat (96). Interaksi radikal bebas dengan protein dapat menghasilkan senyawa karbonil, sementara reaksinya dengan lipid dan asam nukleat berpotensi membentuk dimer timin yang dapat menyebabkan mutasi genetik (97). Kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas ini diduga kuat berkontribusi dalam berbagai proses patologis seperti inflamasi, penuaan dini, dan karsinogenesis (98).

Untuk menanggulangi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas, tubuh dilengkapi dengan sistem pertahanan yang kompleks, yaitu antioksidan, yang bekerja

secara enzimatik dan non-enzimatik (99). Contoh antioksidan yang bersifat enzimatik antara lain adalah superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (100). Sementara itu, antioksidan non-enzimatik mencakup senyawa-senyawa seperti vitamin C, vitamin E, glutathion,  $\beta$ -karoten, flavonoid, dan banyak lagi (101,102).

### **Malondialdehid (MDA)**

Radikal hidroksil memiliki potensi besar untuk menginisiasi peroksidasi lipid, terutama pada membran plasma dan organel seluler yang kaya akan asam lemak tidak jenuh (103,104). Proses ini diawali ketika radikal hidroksil bereaksi dengan atom hidrogen pada rantai hidrokarbon asam lemak, menghasilkan pembentukan radikal berpusat karbon (*carbon-centered radical*) (105). Jika molekul oksigen hadir, radikal ini dapat berlanjut membentuk radikal peroksi (-C-O-O\*), yang kemudian dapat berinteraksi dengan hydrogen dari molekul asam lemak lain, melanjutkan rantai reaksi (106). Akumulasi radikal bebas lipid dan peroksida lipid ini secara luas diakui sebagai penanda penting dari kerusakan seluler yang dipicu oleh spesies oksigen reaktif (107). Seperti yang telah dijelaskan, asam lemak tidak jenuh yang terdapat pada membrane sel adalah target utama peroksidasi lipid, yang selanjutnya mengalami degradasi menghasilkan produk akhir seperti malondialdehid (MDA) (108). MDA, dengan rumus kimia  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ , merupakan senyawa organik yang dapat ditemukan dalam darah dan urin, sehingga sering digunakan sebagai indikator adanya kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas (109).

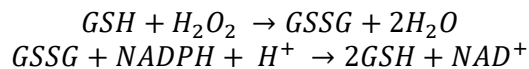
Sebagai *biomarker* yang mengindikasikan kerusakan membran sel, MDA secara rutin diukur menggunakan pereaksi asam tiobarbiturat (TBA), sebuah metode yang dasar pengembangannya dilakukan oleh Wilbur pada tahun 1994 (109,110). Metode ini kemudian mengalami modifikasi lebih lanjut oleh Wills pada tahun 1996, yang mengarah pada pengenalnya sebagai uji TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) (110). Uji TBARS saat ini menjadi salah satu pendekatan yang paling mapan dan paling sering diterapkan untuk mengevaluasi proses peroksidasi lipid asam lemak tidak jenuh (111,112). Kemampuan uji TBARS dalam menilai tingkat stres oksidatif didasarkan pada reaksi spesifik antara asam tiobarbiturat dengan malondialdehid (MDA) yang dihasilkan dari proses kerusakan oksidatif (113,114).

### **Glutathion (GSH)**

Glutathion (GSH) adalah antioksidan penting yang bersifat non-enzimatik, tersusun dari tripeptida yang terdiri atas L-glutamat, L-sistein, dan glisin. Senyawa ini utamanya disintesis di dalam sel hati (115). Proses sintesis glutathion berlangsung melalui dua tahapan kunci. Tahap pertama melibatkan kondensasi glutamat dan sistein yang dikatalisis oleh enzim  $\gamma$ -glutamilsistein sintase, membentuk ikatan peptida

antara kedua asam amino tersebut (116). Pada tahap kedua, enzim GSH sintase berperan dalam menggabungkan  $\gamma$ -glutamilsistein dengan glisin, sehingga menghasilkan molekul GSH lengkap (117). Pada langkah ini, terbentuk ikatan peptida antara sistein dan glisin. Setiap tahapan sintesis ini memerlukan energi dalam bentuk ATP, yang digunakan untuk mengaktifkan gugus karboksil (113).

Glutation dapat eksis dalam dua bentuk interkonvertibel: bentuk tereduksi (GSH) dan bentuk teroksidasi (GSSG) (118). Bentuk GSSG dapat diregenerasi kembali menjadi GSH melalui aktivitas enzim glutation reduktase, yang membutuhkan koenzim NADPH sebagai donor elektron. NADPH ini umumnya berasal dari jalur *HMP shunt* (jalur *hexose monophosphate shunt*) (119). GSH dapat mendetoksifikasi hydrogen peroksida dan peroksida organik lainnya melalui reaksi sebagai berikut:

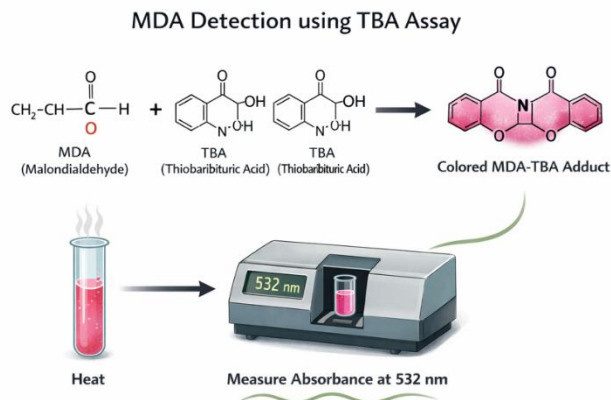


## Macam Percobaan

### 1. Penentuan Konsentrasi MDA

**Tujuan Praktikum:** Menetapkan kadar peroksida dalam darah.

**Prinsip Dasar:** Asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA) dapat mengalami proses peroksidasi menjadi peroksida lipid yang kemudian mengalami dekomposisi menjadi malondialdehid (MDA). MDA bila direaksikan dengan asam tiobarbiturat (*thiobarbituric acid*, TBA) akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 532 nm. Jumlah MDA yang terbentuk dapat menggambarkan proses peroksidasi lipid.

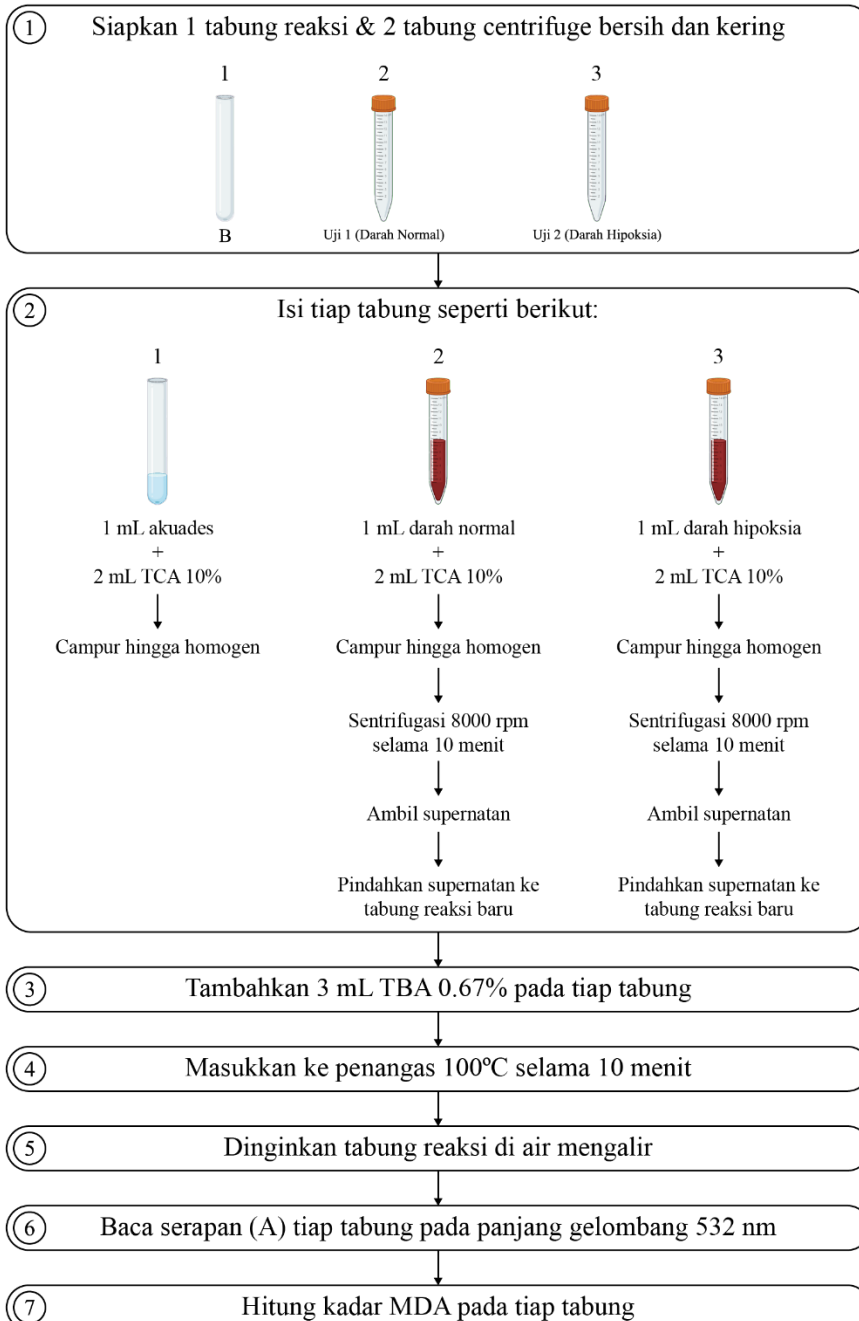


**Gambar 19** Deteksi MDA dengan menggunakan TBA  
(Sumber: Ilustrasi oleh AI, diadaptasi dari (120))

### Alat dan Bahan:

- i. Alat: Tabung reaksi, kuvet, dan spektrofotometer
- ii. Bahan: Hemolisat darah, asam trikloroasetat (TCA) 10%, larutan TBA 0.67%, dan akuades

### Cara Kerja:



## Hasil dan Pembahasan

Perhitungan:

$$\text{Kadar MDA} = A/\varepsilon$$

$$(\varepsilon = 153.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$$

## DAFTAR PUSTAKA

1. Vyhnal CR, Mahoney EHR, Lin Y, Radpour R, Wadsworth H. Pigment Synthesis and Analysis of Color in Art: An Example of Applied Science for High School and College Chemistry Students. *J Chem Educ.* 2020 May 12;97(5):1272–82. doi:10.1021/acs.jchemed.9b01093
2. Yuan L, Weng X, Zhou M, Zhang Q, Deng L. Structural and Visible-Near Infrared Optical Properties of Cr-Doped TiO<sub>2</sub> for Colored Cool Pigments. *Nanoscale Res Lett.* 2017 Dec 17;12(1):597. doi:10.1186/s11671-017-2365-5
3. Kurdi A, Alhussaini W, Alawaji A, Alhudathi A, Alharbi R, Binsaleh F, et al. Comparative performance of liquid chromatography and spectrophotometry in determining metformin hydrochloride within pharmaceutical formulations. *Heliyon.* 2024 Jun;10(12):e32551. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e32551
4. Maliyakal J, Patel M. Green chemistry approaches in the analytical validation of fosravuconazole using UV spectrophotometry and HPLC. *Green Analytical Chemistry.* 2025 Mar;12:100215. doi:10.1016/j.greeac.2025.100215
5. Kögler AC, Kherdjemil Y, Bender K, Rabinowitz A, Marco-Ferreres R, Furlong EEM. Extremely rapid and reversible optogenetic perturbation of nuclear proteins in living embryos. *Dev Cell.* 2021 Aug;56(16):2348–2363.e8. doi:10.1016/j.devcel.2021.07.011
6. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative Biology of Exercise. *Cell.* 2014 Nov;159(4):738–49. doi:10.1016/j.cell.2014.10.029
7. Doig AJ. Frozen, but no accident – why the 20 standard amino acids were selected. *FEBS J.* 2017 May 13;284(9):1296–305. doi:10.1111/febs.13982
8. Arakawa T, Timasheff SN. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry.* 1984 Dec 1;23(25):5912–23. doi:10.1021/bi00320a004
9. Sinha N, Chowdhury S, Sarkar RR. Molecular basis of drug resistance in smoothed receptor: An *in silico* study of protein resistivity and specificity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 2020 Mar 16;88(3):514–26. doi:10.1002/prot.25830
10. Wang G, Dunbrack RL. PISCES: a protein sequence culling server. *Bioinformatics.* 2003 Aug 12;19(12):1589–91. doi:10.1093/bioinformatics/btg224
11. Issue information. *Protein Science.* 2020 Jan 20;29(1):1–4. doi:10.1002/pro.3649

12. Nick Pace C, Martin Scholtz J. A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophys J*. 1998 Jul;75(1):422–7. doi:10.1016/S0006-3495(98)77529-0
13. Chen LC, Chen KX, Huang X ying, Lou J, Li JY, Deng SP. Vesicles from the self-assembly of the ultra-small fatty acids with amino acids under aqueous conditions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 Jan;173:69–76. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.007
14. Zhao J, Wen X, Xu H, Wen Y, Lu H, Meng X. Salting-out and salting-in of protein: A novel approach toward fabrication of hierarchical porous carbon for energy storage application. *J Alloys Compd*. 2019 Jun;788:397–406. doi:10.1016/j.jallcom.2019.02.252
15. Xue B, Liu Y, Sun W, Liang Y, Yin P. The spatiotemporal studies of the salt-hardening effect of the coacervates of nano-ions for aqueous super-ionic electrolytes with enhanced electrochemical stability. *J Colloid Interface Sci*. 2025 Oct;696:137898. doi:10.1016/j.jcis.2025.137898
16. Duong-Ly KC, Gabelli SB. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. In. 2014. p. 85–94. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0
17. Wingfield P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Curr Protoc Protein Sci*. 1998 Sep 15;13(1). doi:10.1002/0471140864.psa03fs13
18. Matulis D. Selective Precipitation of Proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2016 Feb 2;83(1). doi:10.1002/0471140864.ps0405s83
19. Coen CJ, Blanch HW, Prausnitz JM. Salting out of aqueous proteins: Phase equilibria and intermolecular potentials. *AIChE Journal*. 1995 Apr 17;41(4):996–1004. doi:10.1002/aic.690410430
20. Dahal YR, Schmit JD. Ion Specificity and Nonmonotonic Protein Solubility from Salt Entropy. *Biophys J*. 2018 Jan;114(1):76–87. doi:10.1016/j.bpj.2017.10.040
21. Xu HN, Liu Y, Zhang L. Salting-out and salting-in: competitive effects of salt on the aggregation behavior of soy protein particles and their emulsifying properties. *Soft Matter*. 2015;11(29):5926–32. doi:10.1039/C5SM00954E
22. Kleemann C, Zink J, Selmer I, Smirnova I, Kulozik U. Effect of Ethanol on the Textural Properties of Whey Protein and Egg White Protein Hydrogels during Water-Ethanol

Solvent Exchange. *Molecules*. 2020 Sep 25;25(19):4417. doi:10.3390/molecules25194417

23. van Koningsveld GA, Gruppen H, de Jongh HHJ, Wijngaards G, van Boekel MAJS, Walstra P, et al. Effects of Ethanol on Structure and Solubility of Potato Proteins and the Effects of Its Presence during the Preparation of a Protein Isolate. *J Agric Food Chem*. 2002 May 8;50(10):2947–56. doi:10.1021/jf011202x
24. Nikolaidis A, Moschakis T. On the reversibility of ethanol-induced whey protein denaturation. *Food Hydrocoll*. 2018 Nov;84:389–95. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.05.051
25. Nikolaidis A, Andreadis M, Moschakis T. Effect of heat, pH, ultrasonication and ethanol on the denaturation of whey protein isolate using a newly developed approach in the analysis of difference-UV spectra. *Food Chem*. 2017 Oct;232:425–33. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.022
26. Aguilar-Acosta L, Serna-Saldivar S, Rodríguez-Rodríguez J, Escalante-Aburto A, Chuck-Hernández C. Effect of Ultrasound Application on Protein Yield and Fate of Alkaloids during Lupin Alkaline Extraction Process. *Biomolecules*. 2020 Feb 13;10(2):292. doi:10.3390/biom10020292
27. Hao R, Adoligbe C, Jiang B, Zhao X, Gui L, Qu K, et al. An Optimized Trichloroacetic Acid/Acetone Precipitation Method for Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analysis of Qinchuan Cattle Longissimus Dorsi Muscle Containing High Proportion of Marbling. *PLoS One*. 2015 Apr 20;10(4):e0124723. doi:10.1371/journal.pone.0124723
28. Fernández Macedo SA, Cueva Rossel E, Fernández Tapia SB, Jimenez Agüero J. Sulfosalicylic acid to detect proteins in urine of pregnant women. *MethodsX*. 2023;10:102101. doi:10.1016/j.mex.2023.102101
29. Robison ATR, Sturrock GR, Zaengle-Barone JM, Wiebelhaus N, Dharani A, Williams IG, et al. Analysis of copper-induced protein precipitation across the *E. coli* proteome. *Metallomics*. 2023 Jan 10;15(1). doi:10.1093/mtomcs/mfac098
30. Rodzik A, Pomastowski P, Sagandykova GN, Buszewski B. Interactions of Whey Proteins with Metal Ions. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 20;21(6):2156. doi:10.3390/ijms21062156

31. Nirmalraj PN, Rossell MD, Dachraoui W, Thompson D, Mayer M. *In Situ* Observation of Chemically Induced Protein Denaturation at Solvated Interfaces. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2023 Oct 18;15(41):48015–26. doi:10.1021/acsami.3c10510
32. Agarwal PK, Bernard DN, Bafna K, Doucet N. Enzyme Dynamics: Looking Beyond a Single Structure. *ChemCatChem*. 2020 Oct 6;12(19):4704–20. doi:10.1002/cctc.202000665
33. Schwartz SD. Protein Dynamics and Enzymatic Catalysis. *J Phys Chem B*. 2023 Mar 30;127(12):2649–60. doi:10.1021/acs.jpccb.3c00477
34. McDonald AG, Tipton KF. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *FEBS J*. 2023 May 3;290(9):2214–31. doi:10.1111/febs.16274
35. Pi N, Leary JA. Determination of enzyme/substrate specificity constants using a multiple substrate ESI-MS assay. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2004 Feb 1;15(2):233–43. doi:10.1016/j.jasms.2003.10.009
36. Bhunia B, Basak B, Mandal T, Bhattacharya P, Dey A. Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70kDa). *Int J Biol Macromol*. 2013 Mar;54:1–8. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.11.024
37. Madhumathi M, Cheerla S, Saravanabhavan S, Thanikaivelan P, Rao JR, Chandra Babu NK, et al. Factors influencing activity of enzymes and their kinetics. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007 Mar;136(3):265–78. doi:10.1007/s12010-007-9025-7
38. Caspi R, Dreher K, Karp PD. The challenge of constructing, classifying, and representing metabolic pathways. *FEMS Microbiol Lett*. 2013 Aug;345(2):85–93. doi:10.1111/1574-6968.12194
39. M. A. Basher AR, McLaughlin RJ, Hallam SJ. Metabolic pathway inference using multi-label classification with rich pathway features. *PLoS Comput Biol*. 2020 Oct 1;16(10):e1008174. doi:10.1371/journal.pcbi.1008174
40. Kierans SJ, Taylor CT. Glycolysis: A multifaceted metabolic pathway and signaling hub. *Journal of Biological Chemistry*. 2024 Nov;300(11):107906. doi:10.1016/j.jbc.2024.107906
41. Zhang L, Li Y li, Hu J hua, Liu Z ying. Overexpression of enzymes in glycolysis and energy metabolic pathways to enhance coenzyme Q10 production in *Rhodobacter*

sphaeroides VK-2-3. *Front Microbiol.* 2022 Aug 12;13. doi:10.3389/fmicb.2022.931470

42. López-Soldado I, Bertini A, Adrover A, Duran J, Guinovart JJ. Maintenance of liver glycogen during long-term fasting preserves energy state in mice. *FEBS Lett.* 2020 Jun 21;594(11):1698–710. doi:10.1002/1873-3468.13770
43. Soon GST, Torbenson M. The Liver and Glycogen: In Sickness and in Health. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 24;24(7):6133. doi:10.3390/ijms24076133
44. Sarris D, Papanikolaou S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Eng Life Sci.* 2016 May 4;16(4):307–29. doi:10.1002/elsc.201400199
45. Kumar V, Gill KD. To Determine the Blood Glucose Levels by Folin and Wu Method. In: *Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide.* Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 61–2. doi:10.1007/978-981-10-8186-6\_14
46. Cornish-Bowden A. One hundred years of Michaelis–Menten kinetics. *Perspect Sci (Neth).* 2015 Mar;4:3–9. doi:10.1016/j.pisc.2014.12.002
47. Schnell S. Validity of the Michaelis–Menten equation – steady-state or reactant stationary assumption: that is the question. *FEBS J.* 2014 Jan 18;281(2):464–72. doi:10.1111/febs.12564
48. Talli I, Marchioro L, Zaninotto M, Cosma C, Pangrazzi E, Artusi C, et al. Measurement of AST and ALT with Pyridoxal-5'-Phosphate according to IFCC: A decades-long gap seems to be filled. *Clinica Chimica Acta.* 2025 Mar;569:120158. doi:10.1016/j.cca.2025.120158
49. Washington IM, Van Hoosier G. Clinical Biochemistry and Hematology. In: *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.* Elsevier; 2012. p. 57–116. doi:10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1
50. Bridges CC, Krasnikov BF, Joshee L, Pinto JT, Hallen A, Li J, et al. New insights into the metabolism of organomercury compounds: Mercury-containing cysteine S-conjugates are substrates of human glutamine transaminase K and potent inactivators of cystathionine  $\gamma$ -lyase. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Jan;517(1):20–9. doi:10.1016/j.abb.2011.11.002

51. Zeng Y, Wang B, Cheng J, Ren C, Guo J, Liu R, et al. A miniaturized liver function detection system with machine learning enhancing strategy. *Biosens Bioelectron.* 2025 Nov;287:117667. doi:10.1016/j.bios.2025.117667
52. Bagchi B. Water surrounding lipid bilayers: its role as a lubricant. In: *Water in Biological and Chemical Processes.* Cambridge University Press; 2013. p. 177–86. doi:10.1017/CBO9781139583947.015
53. Lee AG. Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2003 May;1612(1):1–40. doi:10.1016/S0005-2736(03)00056-7
54. Goodhead LK, MacMillan FM. Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Adv Physiol Educ.* 2017 Jun 1;41(2):298–305. doi:10.1152/advan.00083.2016
55. Nunomura W, Gascard P, Takakuwa Y. Insights into the Function of the Unstructured N-Terminal Domain of Proteins 4.1R and 4.1G in Erythropoiesis. *Int J Cell Biol.* 2011;2011:1–13. doi:10.1155/2011/943272
56. Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. In. 2020. p. 345–82. doi:10.1007/978-3-030-41769-7\_14
57. Garcia-Casal MN, Pasricha S, Sharma AJ, Peña-Rosas JP. Use and interpretation of hemoglobin concentrations for assessing anemia status in individuals and populations: results from a WHO technical meeting. *Ann N Y Acad Sci.* 2019 Aug 21;1450(1):5–14. doi:10.1111/nyas.14090
58. Lecomte JTJ. Hemoglobin: Some (Dis)Assembly Required. *Biophys J.* 2020 Mar;118(6):1235–7. doi:10.1016/j.bpj.2019.12.041
59. Perutz MF. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature.* 1970 Nov;228(5273):726–34. doi:10.1038/228726a0
60. PERUTZ MF. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature.* 1970 Nov;228(5273):726–34. doi:10.1038/228726a0
61. Westphal M, Weber TP, Meyer J, von Kegler S, Van Aken H, Booke M. Affinity of carbon monoxide to hemoglobin increases at low oxygen fractions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jul;295(4):975–7. doi:10.1016/S0006-291X(02)00781-7

62. van Kampen EJ, Zijlstra WG. Spectrophotometry of Hemoglobin and Hemoglobin Derivatives. In. 1983. p. 199–257. doi:10.1016/S0065-2423(08)60401-1
63. Iolascon A, Bianchi P, Andolfo I, Russo R, Barcellini W, Fermo E, et al. Recommendations for diagnosis and treatment of methemoglobinemia. *Am J Hematol.* 2021 Dec 23;96(12):1666–78. doi:10.1002/ajh.26340
64. Ranzenigo A, Cordero FM, Cacciarini M, Nielsen MB. ortho-Substituted 2-Phenyldihydroazulene Photoswitches: Enhancing the Lifetime of the Photoisomer by ortho-Aryl Interactions. *Molecules.* 2021 Oct 26;26(21):6462. doi:10.3390/molecules26216462
65. Peter A, Berneman ZN, Cools N. Cellular respiration in dendritic cells: Exploring oxygen-dependent pathways for potential therapeutic interventions. *Free Radic Biol Med.* 2025 Feb;227:536–56. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2024.12.014
66. Baigorri F, Russell JA. OXYGEN DELIVERY IN CRITICAL ILLNESS. *Crit Care Clin.* 1996 Oct;12(4):971–94. doi:10.1016/S0749-0704(05)70287-6
67. Beckers C, Pruschy M, Vetrugno I. Tumor hypoxia and radiotherapy: A major driver of resistance even for novel radiotherapy modalities. *Semin Cancer Biol.* 2024 Jan;98:19–30. doi:10.1016/j.semcancer.2023.11.006
68. Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell.* 2012 Feb;148(3):399–408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021
69. Mo J, Chen Y, Lai KP, Zhang Z, Seemann F, Liu W. Hypoxia to the skeletal systems of teleost: Impacts, mechanisms, and health implications. *J Environ Manage.* 2025 Sep;391:126530. doi:10.1016/j.jenvman.2025.126530
70. Huang S, Jiang X, Chen Q, Hu Z, Wang F, Zhao Y, et al. Jujube polysaccharides mitigated anemia in rats with chronic kidney disease: Regulation of short chain fatty acids release and erythropoietin production. *J Funct Foods.* 2021 Nov;86:104673. doi:10.1016/j.jff.2021.104673
71. Aranda JF, Madrigal-Matute J, Rotllan N, Fernández-Hernando C. MicroRNA modulation of lipid metabolism and oxidative stress in cardiometabolic diseases. *Free Radic Biol Med.* 2013 Sep;64:31–9. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.014

72. Zheng X, Han C, Yang Y, Zhang W. Inhibition of ER stress mitigates hypobaric hypoxia-induced retinal damage: a simulated high-altitude study. *Neuroscience*. 2025 Aug;580:181–93. doi:10.1016/j.neuroscience.2025.06.044
73. Peers C, Wyatt CN, Evans AM. Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010 Dec;174(3):292–8. doi:10.1016/j.resp.2010.08.010
74. Gonzalez C, Agapito MT, Rocher A, Gomez-Niño A, Rigual R, Castañeda J, et al. A revisit to O<sub>2</sub> sensing and transduction in the carotid body chemoreceptors in the context of reactive oxygen species biology. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010 Dec;174(3):317–30. doi:10.1016/j.resp.2010.09.002
75. Chan PYS, Lee LY, Davenport PW. Neural mechanisms of respiratory interoception. *Autonomic Neuroscience*. 2024 Jun;253:103181. doi:10.1016/j.autneu.2024.103181
76. López-Barneo J, Pardal R, Ortega-Sáenz P. Cellular Mechanism of Oxygen Sensing. *Annu Rev Physiol*. 2001 Mar;63(1):259–87. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.259
77. Chen X, Feng G, Shao L, Lin X, He X, Yang Y, et al. Maintaining high levels of HIF-1 $\alpha$  protects osteoarthritis cartilage by activating autophagy. *Tissue Cell*. 2025 Oct;96:103027. doi:10.1016/j.tice.2025.103027
78. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993 May;90(9):4304–8. doi:10.1073/pnas.90.9.4304
79. Zu Y, Wu C, Li F, Yao H, Xia Y, Zhang R, et al. The NAMPT enzyme employs a switch that directly senses AMP/ATP and regulates cellular responses to energy stress. *Mol Cell*. 2025 Jun;85(12):2271–2286.e6. doi:10.1016/j.molcel.2025.05.022
80. Neubauer S. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *New England Journal of Medicine*. 2007 Mar 15;356(11):1140–51. doi:10.1056/NEJMra063052
81. Attwell D, Laughlin SB. An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2001 Oct 1;21(10):1133–45. doi:10.1097/00004647-200110000-00001
82. Shukla VH, Dave KR, Katyare SS. Effect of catecholamine depletion on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria; use of reserpine. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 2000 Aug;127(1):79–90. doi:10.1016/S0742-8413(00)00134-1

83. Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*. 2012 Feb;148(3):399–408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021
84. Li A, Wang X, Yang R, Zhang J, Jiang X. Therapeutic potential and mechanisms of traditional Chinese medicine in regulating energy metabolism imbalance in heart failure. *Chin Herb Med*. 2025 Jul. doi:10.1016/j.chmed.2025.07.002
85. Gao S, Li D, Qiao B, Gong Y, Xu X, Wang Y, et al. Association of elevated levels of soluble transferrin receptor with left ventricular remodeling and mortality in patients with heart failure: Evidence from observational and genetic investigations. *Int J Cardiol*. 2025 Jun;428:133133. doi:10.1016/j.ijcard.2025.133133
86. Chen L, Jiang D, Kou W, Xu Y. MicroRNA-130 as a critical modulator of cardiac remodeling: interplay between autophagic flux and ferroptotic pathways in acute myocardial infarction. *Mol Cell Probes*. 2025 Feb;83:102037. doi:10.1016/j.mcp.2025.102037
87. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol Cell*. 2008 May;30(4):393–402. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.009
88. Nath A, Ghosh S, Bandyopadhyay D. Role of melatonin in mitigation of insulin resistance and ensuing diabetic cardiomyopathy. *Life Sci*. 2024 Oct;355:122993. doi:10.1016/j.lfs.2024.122993
89. Spyropoulos F, Michel T. D-Amino acid oxidase-derived chemogenetic oxidative stress: Unraveling the multi-omic responses to in vivo redox stress. *Curr Opin Chem Biol*. 2024 Apr;79:102438. doi:10.1016/j.cbpa.2024.102438
90. Byrne NJ, Koentges C, Khan E, Pfeil K, Sandulescu R, Bakshi S, et al. Sirtuin 4 accelerates heart failure development by enhancing reactive oxygen species-mediated profibrotic transcriptional signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology Plus*. 2025 Jun;12:100299. doi:10.1016/j.jmccpl.2025.100299
91. Aggarwal S, Gross C, Fineman JR, Black SM. Oxidative Stress and the Development of Endothelial Dysfunction in Congenital Heart Disease With Increased Pulmonary Blood Flow: Lessons From the Neonatal Lamb. *Trends Cardiovasc Med*. 2010 Oct;20(7):238–46. doi:10.1016/j.tcm.2011.11.010

92. Blacks J, Najjar R, Simecka C, Mu S, Feresin R. Effects of Raspberry on Angiotensin II-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Fibrosis in the Heart of Mice. *Curr Dev Nutr.* 2020 Jun;4:nzaa045\_003. doi:10.1093/cdn/nzaa045\_003
93. Wang H, Chen L, Mao Z, Liu S, Huang R, He R, et al. Boosting Energy Deprivation via Synchronous Interventions of Oxidative Phosphorylation and Glycolysis for Cancer Therapy with 1,8-Naphthyridine-Piperazine-Dithiocarbamate Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes. *J Med Chem.* 2025 May 22;68(10):10203–15. doi:10.1021/acs.jmedchem.5c00384
94. Halliwell B. Commentary for “Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts.” *Arch Biochem Biophys.* 2022 Mar;718:109151. doi:10.1016/j.abb.2022.109151
95. Kwon HY, Jung Y, Jeon H, Han HS. Investigation into recent advanced strategies of reactive oxygen species-mediated therapy based on Prussian blue: Conceptualization and prospect. *Bioact Mater.* 2025 Jun;48:71–99. doi:10.1016/j.bioactmat.2025.01.023
96. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul 15;21(7):363–83. doi:10.1038/s41580-020-0230-3
97. Zhang C di, Jiang L hong, Zhou X, He Y ping, Liu Y, Zhou D ming, et al. Synergistic antitumor efficacy of rMV-Hu191 and Olaparib in pancreatic cancer by generating oxidative DNA damage and ROS-dependent apoptosis. *Transl Oncol.* 2024 Jan;39:101812. doi:10.1016/j.tranon.2023.101812
98. Bandaru M, Sultana OF, Islam MA, Rainier A, Reddy PH. Rlip76 in ageing and Alzheimer’s disease: Focus on oxidative stress and mitochondrial mechanisms. *Ageing Res Rev.* 2025 Jan;103:102600. doi:10.1016/j.arr.2024.102600
99. Singh S. Antioxidant nanozymes as next-generation therapeutics to free radical-mediated inflammatory diseases: A comprehensive review. *Int J Biol Macromol.* 2024 Mar;260:129374. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.129374
100. Steglich M, Larrieux N, Zeida A, Dalla Rizza J, Salvatore SR, Bonilla M, et al. Human glutathione transferases catalyze the reaction between glutathione and nitrooleic acid. *Journal of Biological Chemistry.* 2025 Apr;301(4):108362. doi:10.1016/j.jbc.2025.108362

101. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jul;43(1):4–15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024
102. Morsy HM, Zaky MY, Yassin NYS, Khalifa AYZ. Nanoparticle-based flavonoid therapeutics: Pioneering biomedical applications in antioxidants, cancer treatment, cardiovascular health, neuroprotection, and cosmeceuticals. *Int J Pharm.* 2025 Feb;670:125135. doi:10.1016/j.ijpharm.2024.125135
103. Gartzke LP, de Boer TH, Wolfswinkel SSM, Wink SE, Kalashnik R, van Buiten A, et al. Iron chelation prior to static cold storage decreases lipid peroxidation and improves gluconeogenesis during NMP in isolated porcine kidneys. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2025 Aug;189:118343. doi:10.1016/j.biopha.2025.118343
104. Dai JZ, Hsu WJ, Lin MH, Shueng PW, Lee CC, Yang CC, et al. YAP-mediated DDX3X confers resistance to ferroptosis in breast cancer cells by reducing lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 2025 May;232:330–9. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2025.03.019
105. Barata-Vallejo S, Rosario Torviso M del, Postigo A. Unlocking Tellurium-Centered Radicals: From Intermediates in Total Organic Syntheses to Stable Organotellurides and Catalysts. *Asian J Org Chem.* 2025 Jul. doi:10.1002/ajoc.202500492
106. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul 15;21(7):363–83. doi:10.1038/s41580-020-0230-3
107. Rubio-Senent F, Bermúdez-Oria A, Rodríguez-Gutiérrez G, Lama-Muñoz A, Fernández-Bolaños J. Structural and antioxidant properties of hydroxytyrosol-pectin conjugates: Comparative analysis of adsorption and free radical methods and their impact on in vitro gastrointestinal process. *Food Hydrocoll.* 2025 May;162:110954. doi:10.1016/j.foodhyd.2024.110954
108. Martinez M, Cuker A, Mills A, Lightfoot R, Fan Y, Wilson Tang WH, et al. Nitrated fibrinogen is a biomarker of oxidative stress in venous thromboembolism. *Free Radic Biol Med.* 2012 Jul;53(2):230–6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.004
109. Bencivenga D, Arcadio F, Piccirillo A, Annunziata M, Della Ragione F, Cennamo N, et al. Plasmonic optical fiber biosensor development for point-of-care detection of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2023 Apr;199:177–88. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.02.020

110. Plastaras JP, Guengerich FP, Nebert DW, Marnett LJ. Xenobiotic-metabolizing Cytochromes P450 Convert Prostaglandin Endoperoxide to Hydroxyheptadecatrienoic Acid and the Mutagen, Malondialdehyde. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Apr;275(16):11784–90. doi:10.1074/jbc.275.16.11784
111. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990 Jan;9(6):515–40. doi:10.1016/0891-5849(90)90131-2
112. Kose B, Erkanlı S, Koçak A, Guzel C, Luidar T, Dias IHK, et al. Exploring oxysterols and protein carbonylation in cervicovaginal secretions as biomarkers for cervical cancer development. *Advances in Redox Research*. 2024 Dec;13:100111. doi:10.1016/j.arres.2024.100111
113. Zeng S, Zhou X, Feng L, Wu P, Liu Y, Ma Y, et al. Glutathione mitigates hypoxia stress-induced liver injury in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by alleviating mitochondrial dysfunction and autophagy. *Aquaculture*. 2025 Jun;604:742489. doi:10.1016/j.aquaculture.2025.742489
114. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb;30(1–2):1–12. doi:10.1016/j.mam.2008.08.006
115. Chen J, Matye D, Dai Clayton Y, Du Y, Nazmul Hasan M, Gu L, et al. Deletion of hepatocyte cysteine dioxygenase type 1, a bile acid repressed gene, enhances glutathione synthesis and ameliorates acetaminophen hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 2024 Apr;222:116103. doi:10.1016/j.bcp.2024.116103
116. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*. 1988 Nov;263(33):17205–8. doi:10.1016/S0021-9258(19)77815-6
117. Lin H, Wang L, Jiang X, Wang J. Glutathione dynamics in subcellular compartments and implications for drug development. *Curr Opin Chem Biol*. 2024 Aug;81:102505. doi:10.1016/j.cbpa.2024.102505
118. Yu GB, Tian J, Chen RN, Liu HL, Wen BW, Wei JP, et al. Glutathione-dependent redox homeostasis is critical for chlorothalonil detoxification in tomato leaves. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2023 Dec;268:115732. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.115732
119. Fu A, van Rooyen L, Evans L, Armstrong N, Avizonis D, Kin T, et al. Glucose metabolism and pyruvate carboxylase enhance glutathione synthesis and restrict oxidative stress

in pancreatic islets. Cell Rep. 2021 Nov;37(8):110037.  
doi:10.1016/j.celrep.2021.110037

120. Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. Journal of Visualized Experiments. 2020 May 12;(159). doi:10.3791/61122