

LAPORAN PRAKTIKUM
METABOLISME GLUKOSA, UREA, DAN PROTEIN
(TEKNIK SPEKTROFOTOMETRI)

Nama : Dinno Rilando (157008006)
Yuliandriani Wannur (157008004)

Tanggal Praktikum : 14 April 2016

Tujuan Praktikum :

- i) Mengerti prinsip-prinsip dasar mengenai teknik spektrofotometri (yaitu prinsip dasar alatnya, kuvet, standard, blanko, serta Hukum Beer-Lambert dll).
- ii) Latihan pembuatan dan penggunaan larutan stok
- iii) Kumpulkan data kadar glukosa, protein dan urea darah
- iv) Latihan pembuatan dan interpretasi grafik
- v) Persiapan untuk praktikum Metabolisme II' di mana akan mendesain dan melakukan percobaan yang berdasarkan teknik-teknik praktikum ini

Alat dan Bahan :

Tourniquet	swab alkohol	tempat pembuangan yg tajam
Jarum	EDTA	tempat pembuangan yg kena darah
pipet Mohr: (1ml & 5ml)	Urea	Kit pemeriksaan urea
alat sentrifus klinik	Glukosa	Kit pemeriksaan glukosa
alat spektrofotometer	Kuvet	Kit pemeriksaan protein
waterbath 37°C	tabung reaksi dan rak	pipet otomatis 10µl - 100µl
pipet tetes	kuvet plastik	alat spektrofotometer

Protap pemeriksaan glukosa, protein dan urea menggunakan spektrofotometri :

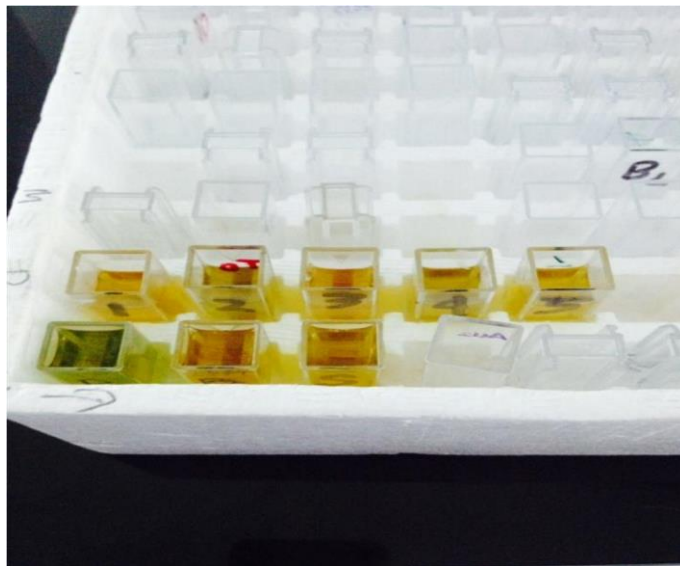
	GLUKOSA	PROTEIN	UREA
volume reagensia kit	1000µl reagensia glukosa	1000µl reagensia	1000µl reagensia A , inkubasi pertama 1000µl reagensia B

volume sampel atau standard	10 μ l	10 μ l	10 μ l
konsentrasi standard	100mg/dl	200mg/dl	40mg/dl
periode dan temperatur inkubasi	10 min @ 37°C	10 min @ 37°C	5 min @ 25°C ** 2X**
periksa pada λ =	500nm	530nm	600nm

Persiapan panjang gelombang max :

a. Urea :

- Untuk melakukan pemeriksaan absorbansi urea menggunakan spektrofotometri harus dibuat terlebih dahulu larutan blanko dan larutan standar urea berdasarkan petunjuknya pada kit urea.
- Siapkan 40 mg/dl standard urea dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan λ : 500-700 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standard dan sampel

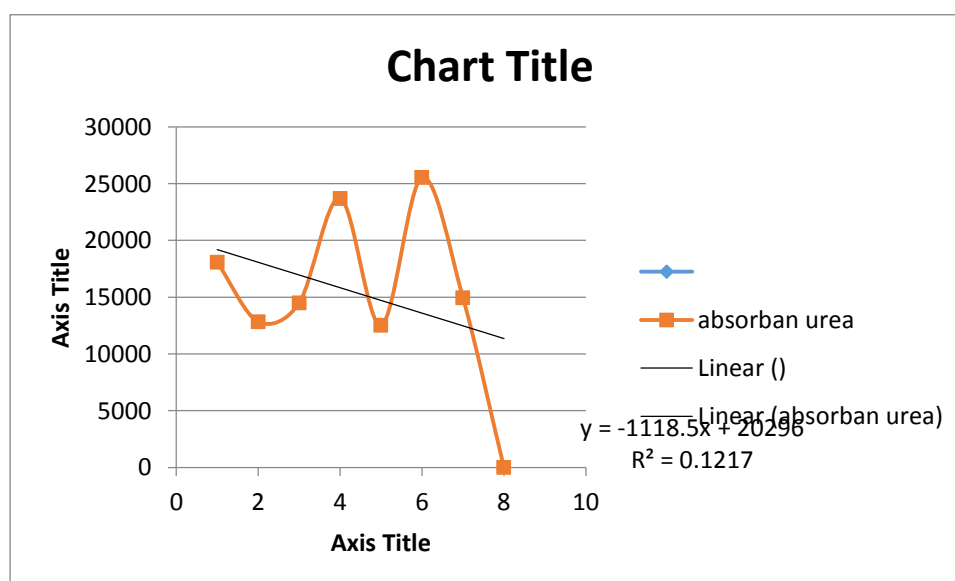


Gambar 1. larutan urea pada kuvet yang berisi larutan standar, larutan sampel dan blanko

Didapatkan panjang gelombang maksimal larutan standar urea menggunakan spektrofotometri yaitu $\lambda = 640 \text{ nm}$. Dengan menggunakan panjang gelombang diatas dilakukan pemeriksaan absorbansi pada setiap larutan standar urea yang telah dibuat. Dan diperoleh datanya pada tabel dibawah ini

Urea – data absorbansi larutan standar urea

Tabung	Konsentrasi yang didapat [mg/dl]	Absorbansi
Stok	100	0,0542
Faktor 2	50	2,349
Faktor 4	25	1,585
Faktor 8	12,5	2,466
Faktor 16	6,25	6
Faktor 32	3,125	6
Faktor 64	1,562	6
Faktor 128	0,781	3,764
Blank	0	0,0003



Pembahasan :

Absorbansi standar yang digunakan adalah absorbansi larutan **Blank yaitu 0,144**. Larutan 40ml dijadikan patokan karena memiliki **panjang gelombang maksimal**.

Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu **$Y = 22.883x + 1245.8$** dengan nilai

$R^2 = 0,0019$. Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi tidak linear dan hasil yang diperoleh tidak akurat.

Untuk mengetahui apakah suatu unsur memenuhi Hukum Beer atau tidak maka perlu ditentukan grafik kalibrasi absorbansi vs konsentrasi. Hukum Beer hanya dapat dipenuhi jika dalam range (cakupan) konsentrasi hasil kalibrasi berupa garis lurus, jadi kita hanya bekerja pada linear range. Seringkali sampel yang dianalisa akan memiliki absorbansi yang lebih tinggi dari pada larutan standar. Jika kita berasumsi bahwa kalibrasi tetap linier pada konsentrasi yang lebih tinggi. Hukum Beer menyatakan absorbansi cahaya berbanding lurus dengan dengan konsentrasi dan ketebalan bahan/medium. Semakin pekat konsentrasi sebuah senyawa maka semakin banyak cahaya yang akan diserap.

Dari grafik diatas dapat kita lihat bahwa konsentrasi larutan tidak berbanding lurus dengan absorbansinya, terdapat konsentrasi larutan yang tinggi namun absorbansinya rendah sehingga didapatkan grafik yang naik turun karena data yang diperoleh tidak linear.

Kesimpulan :

- Larutan standar urea diatas tidak memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi tidak berupa garis lurus.
- Ketidak sesuaian larutan standar dengan hukum lambert-beer dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya kesalahan dalam membuat larutan, larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen.
- Dalam pembuatan sebuah larutan, harus dilakukan secara teliti dan berhati-hati agar hasil konsentrasi yang diinginkan bisa sesuai dengan konsentrasi yang didapat. Kesesuaian konsentrasi ini dapat dibuktikan dengan spektrofotometri.

- Pada larutan standar urea diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dan larutan yang diprediksi. Hal ini disebabkan oleh beberapa factor seperti kesalahan dalam perhitungan pancairan, kesalahan dalam mencampurkan larutan standar dengan reagen dari kit juga tidak meratanya pengadukan larutan sehingga belum homogen.

Persiapan panjang gelombang max :

b. Glukosa :

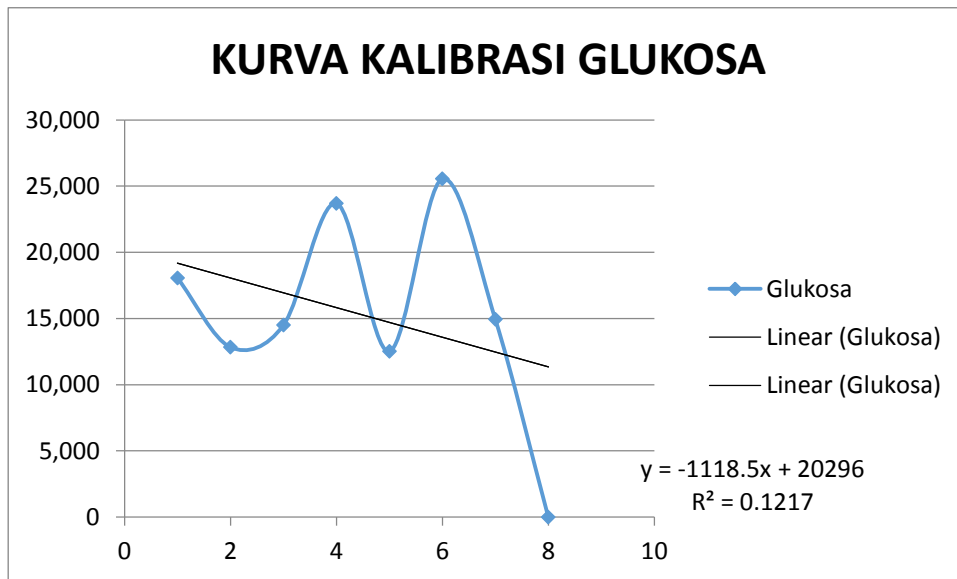
- Siapkan 100 mg/dl standard glukosa dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan λ : 400-600 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standard dan sampel

Didapatkan panjang gelombang maksimal menggunakan larutan standar glukosa 100 ml yaitu $\lambda = 510 \text{ nm}$

Dengan menggunakan panjang gelombang diatas dilakukan pemeriksaan absorbansi pada setiap larutan standar urea yang telah dibuat. Dan diperoleh datanya pada tabel dibawah ini :

Data hasil kalibrasi larutan standar glukosa

Faktor	Konsentrasi yang didapat [mg/dl]	Absorbansi
Stok	100	1,8063
Faktor 2	50	1,2837
Faktor 4	25	1,4494
Faktor 8	12,5	2,3701
Faktor 16	6,25	1,2520
Faktor 32	3,125	2,5543
Faktor 64	1,562	1,4942
Faktor 128	0,781	0,7311
Blank	0	-0,0001



Pembahasan :

Panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu. Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu $Y = 0,119x + 2,0296$ dengan nilai

$R^2 = 0,1217$. Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi tidak linear dan hasil yang diperoleh tidak akurat. Dari grafik diperoleh persamaan regresi linear yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi larutan yang didapat

Grafik pemeriksaan Absorbansi konsentrasi glukosa menunjukkan hasil yang tidak sesuai dengan hukum *Beer-Lambert* $A = \epsilon dc$. Nilai absorbansi yang didapatkan tidak berbanding lurus dengan konsentrasi glukosa yang diperiksa, terlihat pada beberapa titik konsentrasi tidak berbanding lurus dengan absorbansi. Seharusnya ketika konsentrasi sebuah larutan semakin besar maka absorbansinya juga akan semakin besar.

Kesimpulan ;

1. Larutan standar glukosa diatas tidak memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi tidak berupa garis lurus.

2. Ketidak sesuaian larutan standar dengan hukum lambert-beer dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya kesalahan dalam membuat larutan, larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen, adanya serapan oleh pelarut dan oleh kuvet.
3. Pada larutan standar glukosa diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dan larutan yang diinginkan. Hal ini disebabkan oleh beberapa factor seperti kesalahan dalam perhitungan pengenceran, kesalahan dalam mencampurkan larutan standar dengan reagen dari kit juga tidak meratanya pengadukan larutan sehingga belum homogen.
4. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan bahwa data yang diperoleh semakin akurat dan praktikan yang melakukan percobaan lebih teliti.
5. Dari grafik diperoleh persamaan regresi linear yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi larutan yang didapat, tetapi tidak dapat dijadikan acuan karena dari hasil diperoleh konsentrasi yang negatif yang menunjukkan bahwa konsentrasi sampel lebih kecil dari 0.

$$C \text{ sampel} = (A \text{ sampel} / A \text{ standar}) \times C \text{ standar}$$

Dimana : C = konsentrasi larutan

A = Absorbansi .

Kesimpulan :

1. Terdapat perbedaan grafik antara konsentrasi sampel yang didapat menggunakan grafik kalibrasi dan menggunakan rumus pada reagensia test kit.
2. Hasil konsentrasi yang didapat menggunakan rumus pada reagensia test kit cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan grafik kalibrasi.
3. Konsentrasi sampel yang didapat menggunakan grafik kalibrasi dan menggunakan rumus pada reagensia test kit keduanya tidak memenuhi hukum lambert beer karena tidak memenuhi garis lurus (linear). Hal ini bermakna bahwa peningkatan konsentrasi tidak disertai dengan peningkatan absorbansi larutan.
4. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan bahwa data yang diperoleh semakin akurat dan praktikan yang melakukan percobaan lebih teliti.
5. Dari grafik diperoleh persamaan regresi linear yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi larutan yang didapat, tetapi tidak dijadikan acuan karena dari hasil

diperoleh konsentrasi yang negatif yang menunjukkan bahwa konsentrasi sampel lebih kecil dari 0.

PROTEIN

- Pemeriksaan protein plasma tidak menggunakan kurva kalibrasi, gunakan larutan standart yang terdapat di dalam Protein Tes Kit
- Panjang gelombang maksimum pada pemeriksaan protein plasma tidak dilakukan, gunakan panjang gelombang yang terdapat di dalam Protein Tes Kit yaitu dengan λ : 540 nm

Nama	Urea	Glukosa	Protein
Dinno	0,5932	0,4771	1,261
Yuli	0,4675	0,3325	1,177

Saran :

1. Penjelasan prosedur kerja bagi praktikan agar lebih memahami dan mampu melakukan percobaan secara mandiri.
2. Penggunaan alat yang tepat seperti pada pengenceran lebih baik dengan mikropipet bukan pipet mohr biar lebih akurat hasilnya.