

LAPORAN PRAKTIKUM 3

METABOLISME GLUKOSA, UREA, DAN PROTEIN

(TEKNIK SPEKTROFOTOMETRI)

NAMA: 1. IRMA YANTI (NIM: 157008011)
 2. KARIN TIKA FITRIA (NIM: 157008003)
HARI/TANGGAL PRAKTIKUM : KAMIS / 14 APRIL 2016
TEMPAT : LABORATORIUM BIOMEDIK LANTAI 1 &
 LABORATORIUM TERPADU LANTAI 2
 UNIVERSITAS SUMATERA UTARA

BAB I. TUJUAN PERCOBAAN

- 1) Mengerti prinsip–prinsip dasar mengenai teknik spektrofotometri (yaitu prinsip dasar alatnya, kuvet, standard, blanko, serta Hukum Beer-Lambert dll).
- 2) Latihan pembuatan dan penggunaan larutan stok
- 3) Mengumpulkan data kadar glukosa, Protein dan urea darah
- 4) Latihan pembuatan dan interpretasi grafik
- 5) Persiapan untuk praktikum Metabolisme II” di mana akan mendesain dan melakukan percobaan yang berdasarkan teknik-teknik pratikum ini

BAB II. PROSEDUR KERJA

Alat dan bahan yang dibutuhkan

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Tourniquet | 8. Urea |
| 2. Swab alkohol | 9. Kit pemeriksaan urea |
| 3. Tempat pembuangan yg tajam | 10. Alat sentrifus klinik |
| 4. Jarum Spuit 3 cc | 11. Glukosa |
| 5. Tabung Vacutainer berisi EDTA | 12. Kit pemeriksaan glukosa |
| 6. Tempat pembuangan yg kena darah | 13. alat spektrofotometer |
| 7. Pipet Mohr: (1ml & 5ml) | 14. Kuvet |

- | | |
|---|---------------------------|
| 15. Kit pemeriksaan protein | 19. Pipet tetes |
| 16. Waterbath 37°C | 20. Kuvet plastik |
| 17. Tabung reaksi dan rak | 21. Alat spektrofotometer |
| 18. Pipet otomatis 10µl - 100µl; 100 µl - 1000 µl | 22. Spidol/kertas label |

A. PEMERIKSAAN UREA

1. Pembuatan Larutan Stok dan Pengenceran Larutan Urea

Langkah kerja:

- a. Menyiapkan larutan stok yaitu 10 ml larutan urea pada kadar 1 g/L atau 100 mg/dl. Sehingga bubuk urea yang dibutuhkan adalah : 0.01 gr dilarutkan dengan H₂O hingga 10 ml
- b. Menyiapkan 8 tabung reaksi kemudian diberi label: (Stok, F2/Faktor 2; F4/Faktor 4; F8/Faktor 8; F16/Faktor 16; F 32 / Faktor 32; F64/Faktor 64 dan F128/Faktor 128
- c. Mengisi tabung reaksi:
 - 1) Tabung Stok : 2 ml larutan stok
 - 2) Tabung F2 : *double dilution* faktor 2, dengan mengambil 1 ml dari tabung stok ditambah 1 ml H₂O
 - 3) Tabung F4 : *double dilution* faktor 4, dengan mengambil 1 ml dari tabung F2 ditambah 1 ml H₂O
 - 4) Tabung F8 : *double dilution* faktor 8, dengan mengambil 1 ml dari tabung F4 ditambah 1 ml H₂O
 - 5) Tabung F16 : *double dilution* faktor 16, dengan mengambil 1 ml dari tabung F8 ditambah 1 ml H₂O
 - 6) Tabung F32 : *double dilution* faktor 32, dengan mengambil 1 ml dari tabung F16 ditambah 1 ml H₂O
 - 7) Tabung F64 : *double dilution* faktor 64, dengan mengambil 1 ml dari tabung F32 ditambah 1 ml H₂O
 - 8) Tabung F128 : *double dilution* faktor 128, dengan mengambil 1 ml dari tabung F64 ditambah 1 ml H₂O
- d. Menyiapkan 8 buah kuvet yang diisi masing masing 10 µl dari tiap tabung *dilution* yang telah disiapkan sebelumnya

2. Pemeriksaan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Kalibrasi

Langkah kerja Panjang Gelombang Maksimum:

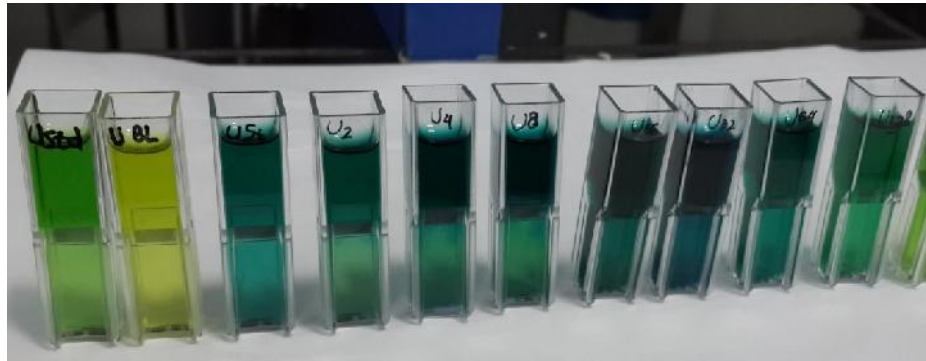
- a. Menyiapkan reagen Urea (*Enzymatic Colorimetric Test for determination of Urea, Berthelot Method*)
 - 1) Reagen terdiri dari botol **R1** (reagent 1: buffer fosfat, natrium salisilat, natrium nitroprusside dan EDTA), **R2** (Reagent 2: buffer fosfat dan natrium hipoklorit), **R3** (enzim Urease) dan botol **standard urea** (isi: 3 ml urea 80 mg/dl atau 13,3 mmol/l yang ekuivalen dengan BUN-Blood Urea Nitrogen dengan kadar 37,28 mg/dl)
 - 2) **R2** dan **standard urea** siap digunakan
 - 3) **R1a** diperoleh dengan mencampurkan R3 dengan R1
 - 4) Karakteristik assay kit: $\lambda=570-600$ nm; jarak optikal=1 cm; suhu 20-25 °C



Gambar 1. *Enzymatic Colorimetric Test for determination of Urea, Berthelot Method*

- b. Menyiapkan 1 kuvet blanko yang berisi 10 μ l H₂O dan 8 kuvet yang berisi 8 jenis konsentrasi larutan urea yang telah diencerkan sebelumnya
- c. Mengisi 1000 μ l reagen R1a menggunakan *micropipette* ke dalam 9 kuvet tersebut

- d. Isi kuvet dicampur menggunakan pipet dan diinkubasi pada suhu ruangan (20-25 °C) selama 5 menit
- e. Mengisi 1000 μ l reagen R2 menggunakan *micropipette* ke dalam 9 kuvet tersebut
- f. Isi kuvet dicampur menggunakan pipet dan diinkubasi pada suhu ruangan (20-25 °C) selama 10 menit



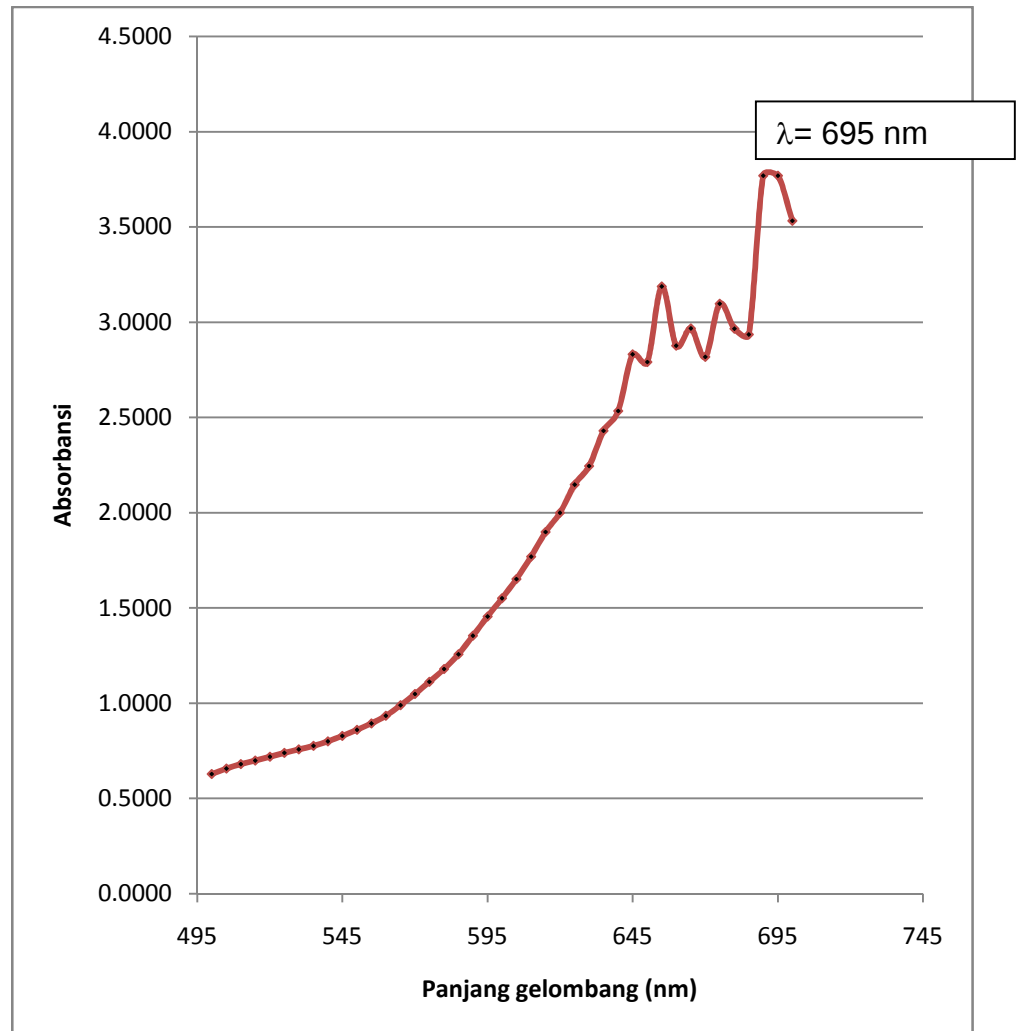
Gambar 2. (ki-ka) kuvet standard kit urea, kuvet blanko, kuvet stok, kuvet F2, kuvet F4, kuvet F8, kuvet F16, kuvet F32, kuvet F64 dan kuvet 128

- g. Pengukuran besar nilai absorbansi pada spektrofotometer untuk setiap standard/sampel dibandingkan dengan kuvet blanko.
- h. Untuk memeriksa panjang gelombang maksimum disiapkan kuvet blanko dan salah satu kuvet hasil dilusi (kuvet yang berisi factor 8; konsentrasi 0,375 gr/l atau 37,5 mg/dl)
- i. Spektrofotometer diatur UV/Vis mulai dengan λ : 500-700 nm dengan kenaikan bertahap sebesar 5 nm dan dicatat besar nilai absorbansinya



Gambar 4. Spektrofotometri merk Thermo Scientific tipe Multiskan Go

- j. Dilihat panjang gelombang yang mana dengan nilai absorbansi maksimum. Diperoleh hasil panjang gelombang=695 nm



Gambar 4. Spektrum panjang gelombang larutan urea. Nilai absorbansi maksimal terjadi pada panjang gelombang 695 nm

Langkah kerja Kalibrasi Larutan standard:

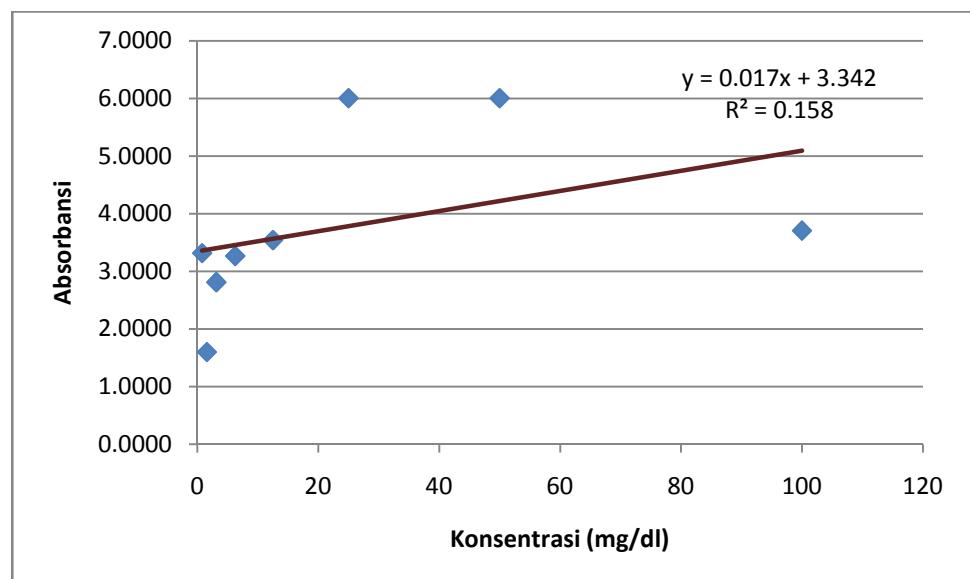
- Pengukuran absorbansi 8 kuvet berisi larutan urea standard dilakukan dibandingkan blanko dengan panjang gelombang 695 nm
- Menghitung konsentrasi yang diperoleh dari pengukuran absorbansi dengan membandingkannya terhadap absorbansi standar urea kit (konsentrasi diketahui 80 mg/dl)

$$C_{\text{sampel}} = \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standard}}} \times 80 \text{ mg/dl}$$

- c. Membuat tabel kalibrasi hasil absorbansi larutan standard urea dan garis korelasi konsentrasi-absorbansi

Tabel 1. Data kalibrasi Larutan Standard Urea

KUVET	Konsentrasi yang diharapkan		Absorbansi	Konsentrasi yang diperoleh	
	mg/dl	M(mmol/l)		mg/dl	M(mmol/l)
Blanko	0	0	0.0002		
Standard (Kit)	80	13.33	1.3330		
Stok	100	16.67	3.7034	222.2596	36.95065
Faktor 2	50	8.33	6	360.09	59.86497
Faktor 4	25	4.17	6	360.09	59.86497
Faktor 8	12.5	2.08	3.5388	212.3811	35.30836
Faktor 16	6.25	1.04	3.2618	195.7569	32.54459
Faktor 32	3.125	0.52	2.8089	168.5761	28.02578
Faktor 64	1.5625	0.26	1.5973	95.86197	15.93705
Faktor 128	0.78125	0.13	3.3115	198.7397	33.04047



Gambar 5. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Urea

Pembahasan:

Urea akan terhidrolisis dengan adanya air dan enzim urease yang terdapat pada campuran reagen R1a membentuk ammonia dan karbondioksida. Dalam reaksi Berthelot modifikasi, ion ammonium akan bereaksi dengan hipoklorit yang terjadi ketika ditambahkan reagen 2 dan salisilat yang merupakan kandungan dari reagen 1 untuk membentuk **pewarnaan hijau**. Perbedaan konsentrasi dari urea akan mempengaruhi kepekatan warna hijau yang diperoleh.

Spektrofotometri merupakan salah satu dari beberapa teknik yang sering dipakai secara rutin di laboratorium biokimia. Pada dasarnya, dengan teknik spektrofotometri kita dapat mengukur jumlah cahaya yang melewati sampel larutan. Jumlah cahaya yang diserap oleh larutan sampel berkaitan dengan konsentrasi unsur tertentu di dalam larutan sampel tersebut. Teknik ini dapat digunakan untuk memonitor perubahan warna (yaitu perubahan pada jumlah cahaya yang diserap) yang kualitatif dan mengukur konsentrasi bahan secara kuantitatif.

Hukum Beer-Lambert, menyatakan absorbansi cahaya berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan bahan/medium. Artinya semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar pula nilai absorbansinya atau semakin banyak cahaya yang diserap.

Pada gambar 5 tampak grafik scattered antara konsentrasi dan absorbansi larutan urea yang membentuk garis korelasi dengan persamaan korelasi $y=0.017x+3.342$. Korelasi bernilai positif yang berarti antara konsentrasi dan absorbansi berbanding lurus.

Hukum Beer hanya dapat dipenuhi jika dalam range (cakupan) konsentrasi hasil kalibrasi berupa garis lurus, namun beberapa nilai absorbansi terdeteksi sangat jauh dari garis korelasinya, mungkin disebabkan oleh beberapa hal seperti, ketidaktepatan praktikan dalam pembuatan larutan stok, atau pada penggunaan pipet sehingga ada kemungkinan larutan yang

berkonsentrasi lebih tinggi masih tersisa di dalam mikropipet yang dapat mempengaruhi konsentrasi di setiap larutan. Butuh ketelitian dan kecermatan yang akurat karena jumlah larutan yang dibutuhkan untuk pemeriksaan dengan spektrofotometer adalah jumlah yang sangat kecil yaitu 10 μ l.

Kesimpulan

- Walaupun setiap titik nilai konsentrasi terhadap absorbansi pada 8 kuvet pengenceran *double dilution* stok 100 mg/dl tidak membentuk garis lurus, namun garis korelasi yang terbentuk menunjukkan korelasi yang positif atau berbanding lurus antara konsentrasi dengan absorbansi
- Semakin tinggi konsentrasi semakin besar nilai absorbansinya
- Dibutuhkan ketelitian dan kecermatan dalam pembuatan larutan, pengenceran, penggunaan mikropipet, pencampuran larutan dan pencampuran sampel/standard urea dengan reagen agar terbentuk larutan yang homogeny sehingga pada saat pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer nilai yang diperoleh lebih akurat.

3. Pemeriksaan Urea Darah

Langkah kerja:

- a. Mengambil @~ 1 ml darah pada kedua praktikan menggunakan tourniquet dan spuit dan kemudian dimasukkan ke dalam vacuntainer yang berisi EDTA.



Gambar 6. a. Vacutainer tube, tabung vakum untuk menyimpan darah yang sudah berisi EDTA sebelumnya; b. alat Sentrifuge

- b. Kemudian 2 buah sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan sedang (nomor 4) selama 5 menit
- c. Setelah terpisah antara plasma dan sel darah merah, maka menggunakan *micropipette* diambil plasma darah sebanyak 10 μ l
- d. Mengisi 1000 μ l reagen R1a menggunakan *micropipette* ke dalam 2 kuvet tersebut
- e. Isi kuvet dicampur menggunakan pipet dan diinkubasi pada suhu ruangan (20-25 °C) selama 5 menit
- f. Mengisi 1000 μ l reagen R2 menggunakan *micropipette* ke dalam 2 kuvet tersebut
- g. Isi kuvet dicampur menggunakan pipet dan diinkubasi pada suhu ruangan (20-25 °C) selama 10 menit
- h. Pengukuran absorbansi 2 kuvet berisi larutan sampel dilakukan dibandingkan blanko dengan panjang gelombang 695 nm
- i. Menghitung konsentrasi dengan membandingkan dengan absorbansi dan konsentrasi standard kit urea

$$C_{\text{sampel}} = \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standard}}} \times 80 \text{ mg/dl}$$

- j. Dibuat tabel hasil absorbansi



Gambar 7. (ki-ka) kuvet standard kuvet blanko, kuvet sampel irma dan kuvet sampel karin

Tabel 2. Data pemeriksaan kadar urea sampel darah

Kuvet	Konsentrasi			Nilai normal	
	mg/dl	M(mmol/l)	Absorbansi	mg/ dl	mmol/l
Blanko	0	0	0.0002	10-50	1.7-8.3
Standard Kit Urea	80	13.33	1.3330		
Irma	39.65	6.59	0.66		
Karin	50.03	8.32	0.83		

Pembahasan

Ureum berasal dari penguraian protein, terutama yang berasal dari makanan. Hampir seluruh ureum dibentuk di dalam hati, dari metabolisme protein (asam amino). Urea berdifusi bebas masuk ke dalam cairan intra sel dan ekstrasel. Zat ini dipekatkan dalam urin untuk diekskresikan. Pada keseimbangan nitrogen yang stabil, sekitar 25 gram urea diekskresikan setiap hari. Kadar dalam darah mencerminkan keseimbangan antara produksi dan ekskresi urea.

Pada orang sehat yang makanannya banyak mengandung protein, ureum biasanya berada di atas rentang normal. Kadar rendah biasanya tidak dianggap abnormal karena mencerminkan rendahnya protein dalam makanan atau ekspansi volume plasma. Namun, bila kadarnya sangat rendah bisa mengindikasikan penyakit hati berat. Kadar urea bertambah dengan bertambahnya usia, juga walaupun tanpa penyakit ginjal.

BUN atau *Blood Urea Nitrogen* adalah pengukuran konsentrasi nitrogen dalam darah yang hadir dalam bentuk urea. Kadar BUN setara dengan $0,466 \times$ kadar urea.

Tes BUN berguna untuk membantu mengesampingkan gejala yang menyerupai penyakit ginjal. Tes darah ini juga dapat dilakukan untuk memantau fungsi ginjal sebelum memulai terapi obat jangka panjang. Sebuah tanda penting dari tingkat urea tinggi dalam aliran darah adalah terjadinya pengurangan output urin.

Kesimpulan

- Kadar urea dalam plasma darah yang diperiksa pada kedua sampel diperoleh hasil yaitu Irma sebesar 39,65 mg/dl plasma darah, kadar ini berada dalam batas normal. Sementara pada sampel darah Karin yaitu kadar urea sebesar 50, 03 berada pada batas maksimum kadar normal urea dalam darah

B. PEMERIKSAAN GLUKOSA

1. Pembuatan Larutan Stok dan Pengenceran Larutan Glukosa

Langkah kerja:

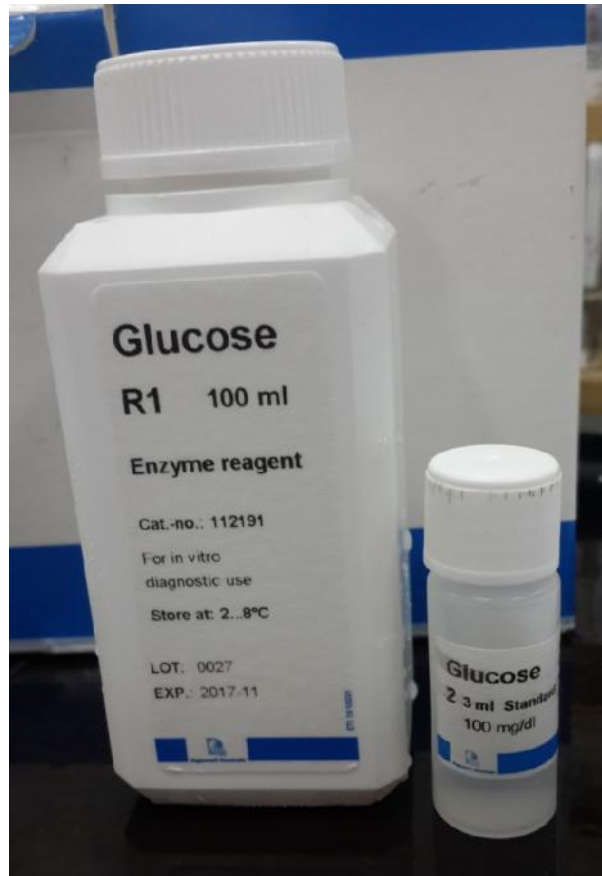
- a. Menyiapkan larutan stok yaitu 50 ml larutan glukosa pada kadar 1,5 g/L atau 150 mg/dl. Sehingga bubuk glukosa yang dibutuhkan adalah : 0.075 gr dilarutkan dengan H₂O hingga 50 ml
- b. Menyiapkan 8 tabung reaksi kemudian diberi label: (Stok, F2/Faktor 2; F4/Faktor 4; F8/Faktor 8; F16/Faktor 16; F 32 / Faktor 32; F64/Faktor 64 dan F128/Faktor 128
- c. Mengisi tabung reaksi:
 - 1) Tabung Stok : 2 ml larutan stok
 - 2) Tabung F2 : *double dilution* faktor 2, dengan mengambil 1 ml dari tabung stok ditambah 1 ml H₂O

- 3) Tabung F4 : *double dilution* faktor 4, dengan mengambil 1 ml dari tabung F2 ditambah 1 ml H₂O
 - 4) Tabung F8 : *double dilution* faktor 8, dengan mengambil 1 ml dari tabung F4 ditambah 1 ml H₂O
 - 5) Tabung F16 : *double dilution* faktor 16, dengan mengambil 1 ml dari tabung F8 ditambah 1 ml H₂O
 - 6) Tabung F32 : *double dilution* faktor 32, dengan mengambil 1 ml dari tabung F16 ditambah 1 ml H₂O
 - 7) Tabung F64 : *double dilution* faktor 64, dengan mengambil 1 ml dari tabung F32 ditambah 1 ml H₂O
 - 8) Tabung F128 : *double dilution* faktor 128, dengan mengambil 1 ml dari tabung F64 ditambah 1 ml H₂O
- d. Menyiapkan 8 buah kuvet yang diisi masing masing 10 µl dari tiap tabung *dilution* yang telah disiapkan sebelumnya

4. Pemeriksaan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Kalibrasi

Langkah kerja Panjang Gelombang Maksimum:

- a. Menyiapkan reagen Glukosa (*Enzymatic Colorimetric Test for determination of Glucose in Serum without deproteinization*)
 - 1) Reagen terdiri dari botol **R1** (buffer fosfat, 4-Aminophenazone, phenol, glucose oxidation, peroxidase, Mutarotase, Stabiliser) dan **standard glukosa**(isi: 3 ml glukosa 100 mg/dl atau 5,55 mmol/l)
 - 2) **R1** dan **standard glukosa** siap digunakan
 - 3) Karakteristik assay kit: λ =500 nm; jarak optikal=1 cm; suhu 20-25 °C



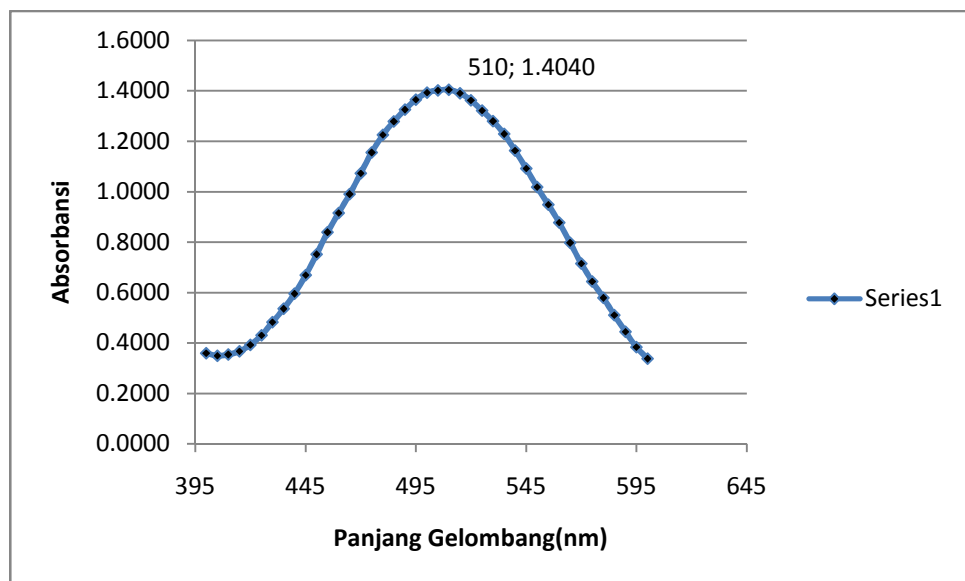
Gambar 8. Enzymatic Colorimetric Test for determination of Glucose in Serum without deproteinization

- b. Menyiapkan 1 kuvet blanko yang berisi 10 μ l H₂O dan 8 kuvet yang berisi 8 jenis konsentrasi larutan glukosa yang telah diencerkan sebelumnya
 - c. Mengisi 1000 μ l reagen R1 menggunakan *micropipette* ke dalam 9 kuvet tersebut
 - d. Isi kuvet dicampur menggunakan pipet dan diinkubasi pada suhu ruangan (20-25 °C) selama 10 menit



Gambar 9. (ki-ka) kuvet blanko, kuvet standard kit glukosa, kuvet stok, kuvet F2, kuvet F4, kuvet F8, kuvet F16, kuvet F32, kuvet F64 dan kuvet 128

- e. Pengukuran besar nilai absorbansi pada spektrofotometer untuk setiap standard/sampel dibandingkan dengan kuvet blanko.
- f. Untuk memeriksa panjang gelombang maksimum disiapkan kuvet blanko dan salah satu kuvet hasil dilusi (kuvet yang berisi faktor 8; konsentrasi 0,1875 gr/l atau 18,75 mg/dl)
- g. Spektrofotometer diatur UV/Vis mulai dengan λ : 400-600 nm dengan kenaikan bertahap sebesar 5 nm dan dicatat besar nilai absorbansinya
- h. Dilihat panjang gelombang yang mana dengan nilai absorbansi maksimum. Diperoleh hasil panjang gelombang=510 nm



Gambar 10. Spektrum panjang gelombang larutan glukosa. Nilai absorbansi maksimal terjadi pada panjang gelombang 510 nm

Langkah kerja Kalibrasi Larutan standard:

- a. Pengukuran absorbansi 8 kuvet berisi larutan urea standard dilakukan dibandingkan blanko dengan panjang gelombang 510 nm
- b. Menghitung konsentrasi yang diperoleh dari pengukuran absorbansi dengan membandingkannya terhadap absorbansi

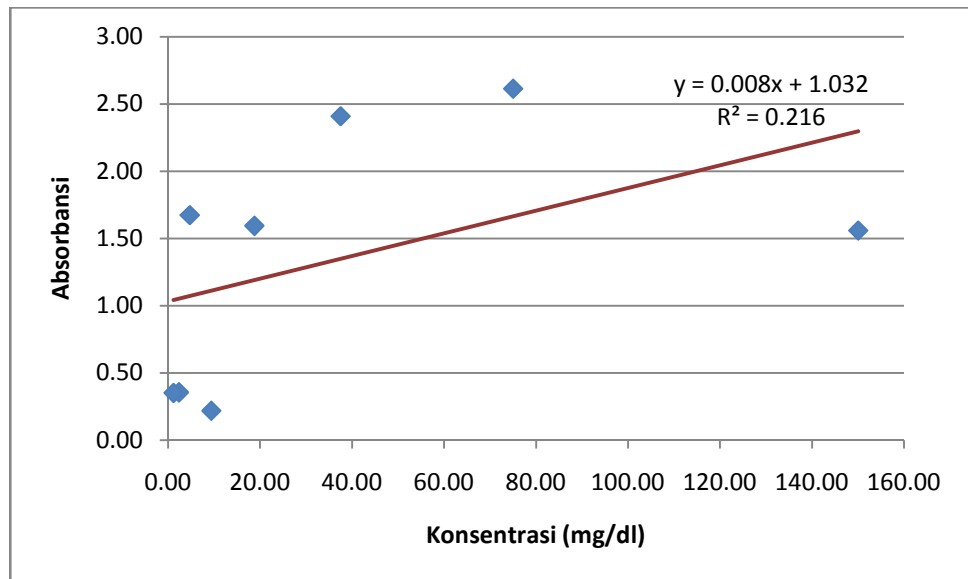
standar glukosa kit (konsentrasi diketahui 100 mg/dl atau 5,55 mmol/l)

$$C_{\text{sampel}} = \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standard}}} \times 100 \text{ mg/dl}$$

- c. Membuat tabel kalibrasi hasil absorbansi larutan standard urea dan garis korelasi konsentrasi-absorbansi

Tabel 3. Data kalibrasi Larutan Standard Glukosa

KUVET	Konsentrasi yang diharapkan		Absorbansi	Konsentrasi yang diperoleh	
	mg/dl	M(mmol/l)		mg/dl	M(mmol/l)
Blanko	0	0	0.0000		
Standard Kit	100	5.55	0.5978		
Stok	150.00	8.33	1.5593	260.84	14.48
Faktor 2	75.00	4.17	2.6139	437.25	24.27
Faktor 4	37.50	2.08	2.4094	403.04	22.37
Faktor 8	18.75	1.04	1.5942	266.68	14.80
Faktor 16	9.38	0.52	0.2188	36.60	2.03
Faktor 32	4.69	0.26	1.6735	279.94	15.54
Faktor 64	2.34	0.13	0.3552	59.42	3.30
Faktor 128	1.17	0.07	0.3512	58.75	3.26



Gambar 11. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Glukosa

Pembahasan:

Glukosa diperoleh setelah terjadi reaksi oksidasi enzimatik dengan hadirnya glukosa oksidase. Hydrogen peroksida kemudian akan bereaksi di bawah katalis peroksidase dengan fenol dan 4-Aminophenazone untuk menghasilkan pewarnaan merah-ungu quinoneimine sebagai indikator adanya glukosa dalam larutan.

Dengan menggunakan Spektrofotometri kita dapat mengukur jumlah cahaya yang melewati sampel larutan. Jumlah cahaya yang diserap oleh larutan sampel berkaitan dengan konsentrasi unsur tertentu di dalam larutan sampel tersebut. Teknik ini dapat digunakan untuk memonitor perubahan warna (yaitu perubahan pada jumlah cahaya yang diserap) yang kualitatif dan mengukur konsentrasi bahan secara kuantitatif.

Hukum Beer-Lambert, menyatakan absorbansi cahaya berbanding lurus dengan dengan konsentrasi dan ketebalan bahan/medium. Artinya semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar pula nilai absorbansinya atau semakin banyak cahaya yang diserap.

Pada gambar 5 tampak grafik scattered antara konsentrasi dan absorbansi larutan glukosa yang membentuk garis korelasi dengan persamaan korelasi $y = 0.008x + 1.032$ $R^2 = 0.216$. Korelasi bernilai positif yang berarti antara konsentrasi dan absorbansi berbanding lurus.

Sama seperti pemeriksaan kurva kalibrasi urea, beberapa nilai absorbansi glukosa terdeteksi sangat jauh dari garis korelasinya, mungkin disebabkan oleh beberapa hal seperti, ketidakteitian praktikan dalam pembuatan larutan stok, atau pada penggunaan pipet sehingga ada kemungkinan larutan yang berkonsentrasi lebih tinggi masih tersisa di dalam mikropipet yang dapat mempengaruhi konsentrasi di setiap larutan. Butuh ketelitian dan kecermatan yang akurat karena jumlah larutan yang dibutuhkan untuk pemeriksaan dengan spektrofotometer adalah jumlah yang sangat kecil yaitu 10 μ l.

Kesimpulan

- Walaupun setiap titik nilai konsentrasi terhadap absorbansi pada 8 kuvet pengenceran *double dilution* stok 150 mg/dl tidak membentuk garis lurus, namun garis korelasi yang terbentuk menunjukkan korelasi yang positif atau berbanding lurus antara konsentrasi dengan absorbansi
- Semakin tinggi konsentrasi semakin besar nilai absorbansinya
- Dibutuhkan ketelitian dan kecermatan dalam pembuatan larutan, pengenceran, penggunaan mikropipet, pencampuran larutan dan pencampuran sampel/standard urea dengan reagen agar terbentuk larutan yang homogen sehingga pada saat pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer nilai yang diperoleh lebih akurat.

5. Pemeriksaan Glukosa Darah

Langkah kerja:

- k. Mengambil sebanyak 10 µl plasma darah dari tiap sampel menggunakan *micropipette* dan dimasukkan ke dalam kuvet
- l. Mengisi 1000 µl reagen R1 menggunakan *micropipette* ke dalam 2 kuvet tersebut
- m. Isi kuvet dicampur menggunakan pipet dan diinkubasi pada suhu ruangan (20-25 °C) selama 10 menit
- n. Pengukuran absorbansi 2 kuvet berisi larutan sampel dilakukan dibandingkan blanko dengan panjang gelombang 510 nm
- o. Menghitung konsentrasi dengan membandingkan dengan absorbansi dan konsentrasi standard kit glukosa

$$C_{\text{sampel}} = \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standard}}} \times 100 \text{ mg/dl}$$

- p. Dibuat tabel hasil absorbansi



Gambar 12. (ki-ka) kuvet blanko, kuvet standard , kuvet sampel irma dan kuvet sampel karin

Tabel 4. Data pemeriksaan kadar glukosa sampel darah

Kuvet	Konsentrasi			Nilai normal	
	mg/dl	M(mmol/l)	Absorbansi	mg/ dl	mmol/l
Blanko	0	0	0.00	75-115	4.2-6.4
Standard Kit Glukosa	100	5.56	0.60		
Irma	93.26	5.18	0.56		
Karin	102.26	5.68	0.61		

Pembahasan

Konsentrasi gula darah, atau tingkat glukosa serum, diatur dengan ketat di dalam tubuh. Glukosa yang dialirkan melalui darah adalah sumber utama energi untuk sel-sel tubuh.

Glukosa (kadar gula darah), suatu gula monosakarida, karbohidrat terpenting yang digunakan sebagai sumber tenaga utama dalam tubuh. Glukosa merupakan prekursor untuk sintesis semua karbohidrat lain di dalam tubuh seperti glikogen, ribose dan deoxiribose dalam asam nukleat, galaktosa dalam laktosa susu, dalam glikolipid, dan dalam glikoprotein dan proteoglikan

Kesimpulan

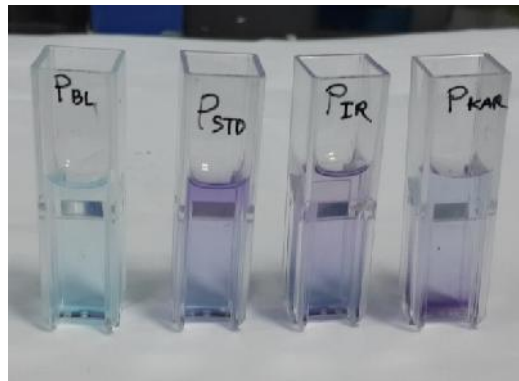
- Kadar glukosa dalam plasma darah yang diperiksa pada kedua sampel diperoleh hasil yaitu Irma sebesar 93,26 mg/dl plasma darah, sementara pada sampel darah Karin yaitu kadar glukosa sebesar 102,26 mg/dl. Kedua sampel berada pada batas normal kadar gula darah yang tertera pada kit reagen glukosa.

B. PEMERIKSAAN PROTEIN DARAH

Langkah kerja:

- a. Menyiapkan reagen Protein (*Diagnostic Reagent for quantitative determination of total protein in serum or plasma on photometric system*)
 - 1) Reagen terdiri dari botol **R1** (Natrium hidroksida, kalium natrium tartrat); **R2**(natrium hidroksida, kalium natrium tartrat, kalium iodide dan tembaga sulfat) dan **standard protein**(isi: protein 5 g/dl atau 5000 mg/dl)
 - 2) **R1** dan **standard glukosa** siap digunakan
 - 3) Karakteristik assay kit: $\lambda=540$ nm; jarak optikal=1 cm; suhu 20-25 °C
- b. Menyiapkan 1 kuvet blanko yang berisi 20 μ l H₂O, 1 kuvet berisi 20 μ l standard kit protein dan 2 kuvet yang berisi 20 μ l sampel plasma darah
- c. Mengisi 1000 μ l reagen R1 menggunakan *micropipette* ke dalam 4 kuvet tersebut

- d. Isi kuvet dicampur menggunakan pipet dan diinkubasi pada suhu ruangan (20-25 °C) selama 1-5 menit



Gambar 13. (ki-ka) kuvet blanko, kuvet standard kit protein, kuvet sampel darah Irma dan sampel darah Karin

- q. Mengisi 250 µl reagen R2 menggunakan *micropipette* ke dalam 4 kuvet tersebut
- r. Isi kuvet dicampur menggunakan pipet dan diinkubasi pada suhu ruangan (20-25 °C) selama 5 menit
- s. Pengukuran absorbansi 2 kuvet berisi larutan sampel dilakukan dibandingkan blanko dan standard kit protein dengan panjang gelombang 540 nm
- t. Menghitung konsentrasi dengan membandingkan dengan absorbansi dan konsentrasi standard kit protein (diketahui konsentrasi 5 g/dl)

$$C_{\text{sampel}} = \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standard}}} \times 5 \text{ g/dl}$$

- u. Dibuat tabel hasil absorbansi

Tabel 4. Data pemeriksaan kadar protein sampel darah

Kuvet	Konsentrasi	Absorbansi	Nilai normal dewasa
	g/dl		g/ dl
Blanko	0	0.0004	6.6-8.8
Standard Kit Protein	5	0.2733	
Irma	6.33	0.3461	
Karin	5.02	0.2743	

Pembahasan

Protein merupakan golongan besar senyawa organik yang dijumpai dalam semua makhluk hidup. Protein terdiri dari karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen, dan kebanyakan juga mengandung sulfur. Protein plasma mencapai 7% plasma dan merupakan satu-satunya unsur pokok plasma yang tidak dapat menembus membran kapilar untuk mencapai sel. Ada 3 jenis protein plasma yang utama: albumin, globulin, dan fibrinogen. Albumin adalah protein yang paling banyak dalam darah, mengatur keseimbangan cairan tubuh. Globulin berperan sebagai proteksi sementara Fibrinogen berperan dalam proses pembekuan darah.

Protein sangat besar fungsinya di dalam tubuh. Protein diperlukan untuk membentuk struktur sel, karena setiap saat tubuh manusia berganti selnya, sebagai pelindung tubuh (proteksi), dengan cara membentuk antibody, sebagai Biokatalisator dalam bentuk enzim serta sebagai regulator (pengendali), contohnya dari jenis hormone.

Pada pemeriksaan kadar protein darah sampel diperoleh hasil yaitu Irma 6,3 g/dl dan Karin, 5, 02 gr/dl. Keduanya berada di bawah ambang batas normal.

Jika tubuh kekurangan protein maka dapat mengakibatkan lamanya masa penyembuhan jika terjadi sakit, karena fungsi protein, Reaksi biokimia dalam tubuh akan berjalan lebih lambat, Terganggunya keseimbangan cairan, karena salah satu tugas dari protein adalah mengikat air, karena air itu mengandung nitrogen yang seimbang.

Protein dalam sampel yang dicampur dengan reagent akan membentuk kompleks berwarna biru-ungu dengan ion tembaga pada larutan alkali. Absorbansi warnanya proporsional dengan konsentrasi.

Kesimpulan

- Hasil pemeriksaan kadar protein dengan membandingkan absorbansi sampel, standard dan blanko diperoleh hasil yaitu Irma 6,3 g/dl dan Karin, 5, 02 gr/dl. Keduanya berada di bawah ambang batas normal.
- Pegukuran total protein darah merupakan uji yang sangat penting dalam mendeteksi berbeagai kelainan.
- Konsentrasi protein yang rendah dapat dideteksi adanya defek pada sintesa protein di hati atau kehilangan protein pada pasien dengan fungsi ginjal yang terganggu, malabsorbsi usus atau defisiensi nutrisi. Kadar protein meningkat pada kondisi inflamasi, sirosis hati dan dehidrasi

Saran

- Perlu adanya semacam kuliah pendahuluan mengenai teori dasar praktikum, atau setidaknya dasar-dasar persiapan pembuatan larutan, konsentrasi dll agar praktikan tidak salah dalam mempersiapkan larutan yang digunakan
- Perlu evaluasi mengenai laporan yang telah dibuat oleh praktikan, bila ada yang salah, perlu kiranya mendapat arahan dan bimbingan agar praktikan memahami letak kesalahannya dan dapat memperbaikinya. Serta walaupun bila sudah benar setidaknya praktikan mengetahui bahwa laporan yang dibuat telah sesuai dengan apa yang diharapkan
- Untuk praktikan yang akan melakukan praktikum ini di lain kesempatan, perhatikan kecermatan dalam penggunaan mikropipet. Gunakan pada konsentrasi yang terendah dahulu baru beranjak ke konsentrasi yang lebih tinggi agar hasil pipetting tidak terkontaminasi larutan sebelumnya
- Fasilitas air sangat krusial dibutuhkan di laboratorium untuk membersihkan alat alat