

LAPORAN PRAKTIKUM 3
METABOLISME GLUKOSA, UREA, DAN TRIGLISERIDA
(TEKNIK SPEKTROFOTOMETRI)

Nama : Adenin Dian Musrifani (147008020)

Fani Nuryana Manihuruk (147008013)

Tanggal Praktikum : 17 Maret 2015

Waktu Praktikum : 10.00 – 16.00 WIB

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, trigliserida dan urea darah
- iv) Latihan pembuatan dan interpretasi grafik
- v) Persiapan untuk praktikum Metabolisme II” di mana Anda akan mendesain dan melakukan percobaan yang berdasarkan teknik-teknik pratikum ini

Teoritis :

Spektrofotometri

A. **Pengertian Spektrofotometri** merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Cahaya yang dimaksud dapat berupa cahaya visibel, UV dan inframerah, sedangkan materi dapat berupa atom dan molekul namun yang lebih berperan adalah elektron valensi.

B. Komponen Utama Spektrofotometri

1. Sumber Cahaya
2. Pengatur Intensitas
3. Monokromator
4. Kuvet
5. Detektor
6. Penguat (amplifier)

C. **Hukum Lambert-Beer Berdasarkan hukum Lambert-Beer**, rumus yang digunakan untuk menghitung banyaknya cahaya yang dihamburkan:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad \text{atau} \quad \%T = \frac{I_t}{I_0} \times 100\%$$

Dan absorbansi dinyatakan dengan rumus:

$$A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0}$$

Dimana I_0 merupakan intensitas cahaya datang dan I_t atau I_l adalah intensitas cahaya setelah melewati sampel. Rumus yang diturunkan dari Hukum Beer dapat ditulis sebagai:

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ Atau } A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Dimana:

A = Absorbansi a = Tetapan absorbtivitas (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam ppm)

c = Konsentrasi larutan yang diukur

ϵ = Tetapan absorbtivitas molar (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam ppm)

b atau terkadang digunakan l = Tebal larutan (tebal kuvet diperhitungkan juga umumnya 1 cm).

Secara eksperimen hukum Lambert-beer akan terpenuhi apabila peralatan yang digunakan memenuhi kriteria-kriteria berikut:

1. Sinar yang masuk atau sinar yang mengenai sel sampel berupa sinar dengan dengan panjang gelombang tunggal (monokromatis).
2. Penyerapan sinar oleh suatu molekul yang ada di dalam larutan tidak dipengaruhi oleh molekul yang lain yang ada bersama dalam satu larutan.
3. Penyerapan terjadi di dalam volume larutan yang luas penampang (tebal kuvet) yang sama.
4. Penyerapan tidak menghasilkan pemancaran sinar pendafluor. Artinya larutan yang diukur harus benar-benar jernih agar tidak terjadi hamburan cahaya oleh partikel-partikel koloid atau suspensi yang ada di dalam larutan.
5. Konsentrasi analit rendah. Karena apabila konsentrasi tinggi akan mengganggu kelinearan grafik absorbansi versus konsntrasi.

D. Jenis-jenis Spektrofotometri Berdasarkan Sumber Cahaya Yang Digunakan

1. Spektrofotometri Visible (Spektro Vis) Pada spektrofotometri ini yang digunakan sebagai sumber sinar/energi adalah cahaya tampak (visible). Cahaya visible termasuk spektrum elektromagnetik yang dapat ditangkap oleh mata manusia. Panjang gelombang sinar tampak adalah 380 sampai 750 nm. Sehingga semua sinar yang dapat dilihat oleh kita, entah itu putih, merah, biru, hijau, apapun, selama ia dapat dilihat oleh mata, maka sinar tersebut termasuk ke dalam sinar tampak (visible). Sumber sinar tampak yang umumnya dipakai pada spektro visible adalah lampu Tungsten. Tungsten yang dikenal juga dengan nama Wolfram merupakan unsur kimia dengan simbol W dan no atom 74.

Tungsten mempunyai titik didih yang tertinggi (3422 °C) dibanding logam lainnya. karena sifat inilah maka ia digunakan sebagai sumber lampu. Sampel yang dapat dianalisa dengan metode ini hanya sample yang memiliki warna. Hal ini menjadi kelemahan tersendiri dari metode spektrofotometri visible. Oleh karena itu, untuk sample yang tidak memiliki warna harus terlebih dulu dibuat berwarna dengan menggunakan reagent spesifik yang akan menghasilkan senyawa berwarna.

Reagent yang digunakan harus betul-betul spesifik hanya bereaksi dengan analat yang akan dianalisa. Selain itu juga produk senyawa berwarna yang dihasilkan harus benar-benar stabil.

Salah satu contohnya adalah pada analisa kadar protein terlarut (soluble protein). Protein terlarut dalam larutan tidak memiliki warna. Oleh karena itu, larutan ini harus dibuat berwarna agar dapat dianalisa. Reagent yang biasa digunakan adalah reagent Folin. Saat protein terlarut direaksikan dengan Folin dalam suasana sedikit basa, ikatan peptide pada protein akan membentuk senyawa kompleks yang berwarna biru yang dapat dideteksi pada panjang gelombang sekitar 578 nm. Semakin tinggi intensitas warna biru menandakan banyaknya senyawa kompleks yang terbentuk yang berarti semakin besar konsentrasi protein terlarut dalam sample.

2. Spektrofotometri Ultraviolet (UV) Berbeda dengan spektrofotometri visible, pada spektrofotometri UV berdasarkan interaksi sample dengan sinar UV. Sinar UV memiliki panjang gelombang 190-380nm. Sebagai sumber sinar dapat digunakan lampu deuterium. Deuterium disebut juga heavy hidrogen. Dia merupakan isotop hidrogen yang stabil yang terdapat berlimpah di laut dan daratan. Inti atom deuterium mempunyai satu proton dan satu neutron, sementara hidrogen hanya memiliki satu proton dan tidak memiliki neutron. Nama deuterium diambil dari bahasa Yunani, deuterios, yang berarti 'dua', mengacu pada intinya yang memiliki dua partikel

Karena sinar UV tidak dapat dideteksi oleh mata kita, maka senyawa yang dapat menyerap sinar ini terkadang merupakan senyawa yang tidak memiliki warna. Bening dan transparan. Oleh karena itu, sample tidak berwarna tidak perlu dibuat berwarna dengan penambahan reagent tertentu. Bahkan sample dapat langsung dianalisa meskipun tanpa preparasi. Namun perlu diingat, sample keruh tetap harus dibuat jernih dengan filtrasi atau centrifugasi. Prinsip dasar pada spektrofotometri adalah sample harus jernih dan larut sempurna. Tidak ada partikel koloid apalagi suspensi. Sebagai contoh pada analisa protein terlarut (soluble protein). Jika menggunakan spektrofotometri visible, sample terlebih dulu dibuat berwarna dengan reagent Folin, maka bila menggunakan spektrofotometri UV, sample dapat langsung dianalisa. Ikatan peptide pada protein terlarut akan menyerap sinar UV pada panjang gelombang sekitar 280 nm. Sehingga semakin banyak sinar yang diserap sample (Absorbansi tinggi), maka konsentrasi protein terlarut semakin besar. Spektrofotometri UV memang lebih simple dan mudah dibanding spektrofotometri visible, terutama pada bagian preparasi sample. Namun harus hati-hati juga, karena banyak kemungkinan terjadi interferensi dari senyawa lain selain analat yang juga menyerap pada panjang gelombang UV. Hal ini berpotensi menimbulkan bias pada hasil analisa.

3. Spektrofotometri UV-VIS Spektrofotometri ini merupakan gabungan antara spektrofotometri UV dan Visible. Menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Meskipun untuk alat yang lebih canggih sudah menggunakan hanya satu sumber sinar sebagai sumber UV dan Vis, yaitu photodiode yang dilengkapi dengan monokromator. Untuk sistem spektrofotometri, UV-Vis paling banyak tersedia dan paling populer digunakan. Kemudahan metode ini adalah dapat digunakan baik untuk sample berwarna juga untuk sample tak berwarna.
4. Spektrofotometri Infra Red (IR) Dari namanya sudah bisa dimengerti bahwa spektrofotometri ini berdasar pada penyerapan panjang gelombang infra merah. Cahaya infra merah terbagi menjadi infra merah dekat, pertengahan, dan jauh. Infra merah pada spektrofotometri adalah infra merah jauh dan pertengahan yang mempunyai panjang gelombang 2.5-1000 μ m. Pada spektro IR meskipun bisa digunakan untuk analisa kuantitatif, namun biasanya lebih kepada

analisa kualitatif. Umumnya spektro IR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa, terutama senyawa organik. Setiap serapan pada panjang gelombang tertentu menggambarkan adanya suatu gugus fungsi spesifik.

Hasil analisa biasanya berupa signal kromatogram hubungan intensitas IR terhadap panjang gelombang. Untuk identifikasi, signal sample akan dibandingkan dengan signal standard. Perlu juga diketahui bahwa sample untuk metode ini harus dalam bentuk murni. Karena bila tidak, gangguan dari gugus fungsi kontaminan akan mengganggu signal kurva yang diperoleh. Terdapat juga satu jenis spektrofotometri IR lainnya yang berdasar pada penyerapan sinar IR pendek. Spektrofotometri ini di sebut Near Infrared Spectropgotometry (NIR). Aplikasi NIR banyak digunakan pada industri pakan dan pangan guna analisa bahan baku yang bersifat rutin dan cepat.

Dari 4 jenis spektrofotometri ini (UV, Vis, UV-Vis dan Ir) memiliki prinsip kerja yang sama yaitu “adanya interaksi antara materi dengan cahaya yang memiliki panjang gelombang tertentu”. Perbedaannya terletak pada panjang gelombang yang digunakan.

E. Fungsi Masing-masing Alat

1. Sumber sinar polikromatis berfungsi sebagai sumber sinar polikromatis dengan berbagai macam rentang panjang gelombang.
Untuk spektrofotometer:
 - a. UV menggunakan lampu deuterium atau disebut juga heavi hidrogen
 - b. VIS menggunakan lampu tungsten yang sering disebut lampu wolfram
 - c. UV-VIS menggunakan photodiode yang telah dilengkapi monokromator.
 - d. Infra merah, lampu pada panjang gelombang IR.
2. Monokromator berfungsi sebagai penyeleksi panjang gelombang yaitu mengubah cahaya yang berasal dari sumber sinar polikromatis menjadi cahaya monokromatis. Jenis monokromator yang saat ini banyak digunakan adalah gratting atau lensa prisma dan filter optik. Jika digunakan gratting maka cahaya akan dirubah menjadi spektrum cahaya. Sedangkan filter optik berupa lensa berwarna sehingga cahaya yang diteruskan sesuai dengan warna lensa yang dikenai cahaya. Ada banyak lensa warna dalam satu alat yang digunakan sesuai dengan jenis pemeriksaan.
3. Sel sampel berfungsi sebagai tempat meletakkan sampel.
 - a. UV, VIS dan UV-VIS menggunakan kuvet sebagai tempat sampel. Kuvet biasanya terbuat dari kuarsa atau gelas, namun kuvet dari kuarsa yang terbuat dari silika memiliki kualitas yang lebih baik. Hal ini disebabkan yang terbuat dari kaca dan plastik dapat menyerap UV sehingga penggunaannya hanya pada spektrofotometer sinar tampak (VIS). Cuvet biasanya berbentuk persegi panjang dengan lebar 1 cm.
 - b. IR, untuk sampel cair dan padat (dalam bentuk pasta) biasanya dioleskan pada dua lempeng natrium klorida. Untuk sampel dalam bentuk larutan dimasukan ke dalam sel natrium klorida. Sel ini akan dipecahkan untuk mengambil kembali larutan yang dianalisis, jika sampel yang dimiliki sangat sedikit dan harganya mahal.
4. Detektor berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Syarat-syarat sebuah detektor :
 - a. Kepekaan yang tinggi
 - b. Perbandingan isyarat atau signal dengan bising tinggi
 - c. Respon konstan pada berbagai panjang gelombang

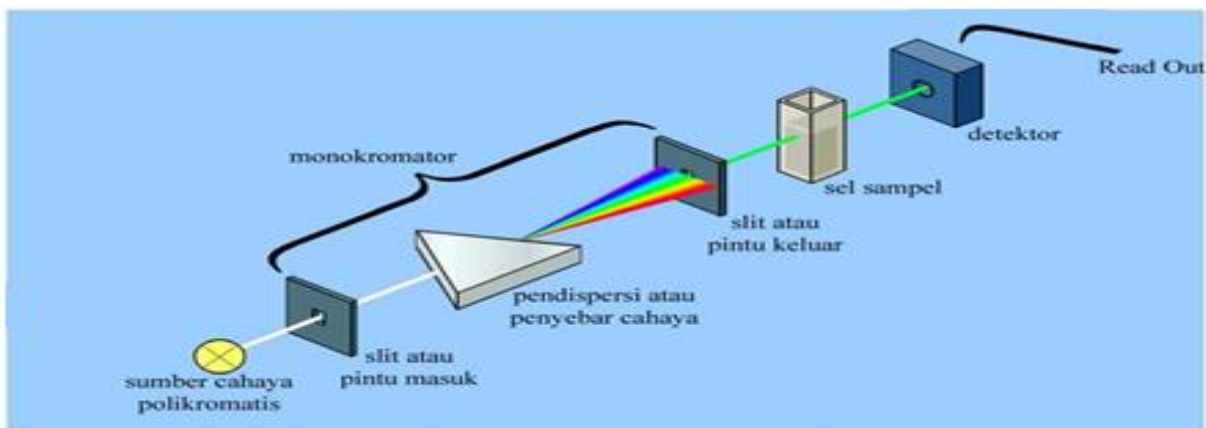
- d. Waktu respon cepat dan signal minimum tanpa radiasi
- e. Signal listrik yang dihasilkan harus sebanding dengan tenaga radiasi

Macam-macam detektor:

- a. Detektor foto (Photo detector)
 - b. Photocell, misalnya CdS
 - c. Phototube
 - d. Hantaran foto
 - e. Dioda foto
 - f. Detektor panas
5. Read out merupakan suatu sistem baca yang menangkap besarnya isyarat listrik yang berasal dari detektor.

F. Cara Kerja

1. Sumber cahaya polikromatis masuk ke dalam monokromator (disini terjadi penyebaran cahaya)
2. Dari monokromator kemudian keluar menuju ke sel sampel, pada sel sampel ini terjadi proses penyerapan cahaya oleh zat yang ada dalam sel sampel (dimana cahaya yang masuk lebih terang dibandingkan cahaya setelah keluar)
3. Selanjutnya cahaya ditangkap oleh detektor dan mengubahnya menjadi arus listrik



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 trigliserida
waterbath 37°C	tabung reaksi dan rak	pipet otomatis 10µl - 100µl
pipet tetes	kuvet plastik	alat spektrofotometer

Cara Kerja :

- **Siapkan larutan stok urea dan larutan stok glukosa**
 - a. **Larutan stok urea**
Siapkan 10mL larutan urea pada kadar 1,0 g/L (atau 100mg/dL)

Jumlah bubuk urea yang dibutuhkan = $10 \times 1/1000$
 = 0,01 gram urea yang dibutuhkan

b. Larutan stok glukosa

Siapkan 50mL larutan glukosa 1,5 g/L (150 mg/dL)

Jumlah bubuk glukosa yang dibutuhkan = $50 \times 1,5/1000$
 = 0,075 gram glukosa yang dibutuhkan

Pengenceran untuk kurva kalibrasi (Standard Curve) dari larutan stok urea 100mg/dl tersebut:

a. UREA :

1. Siapkan 20 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (20 \times 10) / 100 \\ &= 2 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 2ml larutan stok urea + 8ml aquades

2. Siapkan 30 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (30 \times 10) / 100 \\ &= 3 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 3ml larutan stok urea + 7ml aquades

3. Siapkan 40 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (40 \times 10) / 100 \\ &= 4 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 4ml larutan stok urea + 6ml aquades

4. Siapkan 50 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (50 \times 10) / 100 \\ &= 5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 5ml larutan stok urea + 5ml aquades

5. Siapkan 60 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (60 \times 10) / 100 \\ &= 6 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 6ml larutan stok urea + 4ml aquades

Protap pemeriksaan glukosa, protein dan urea menggunakan spektrofotometri :

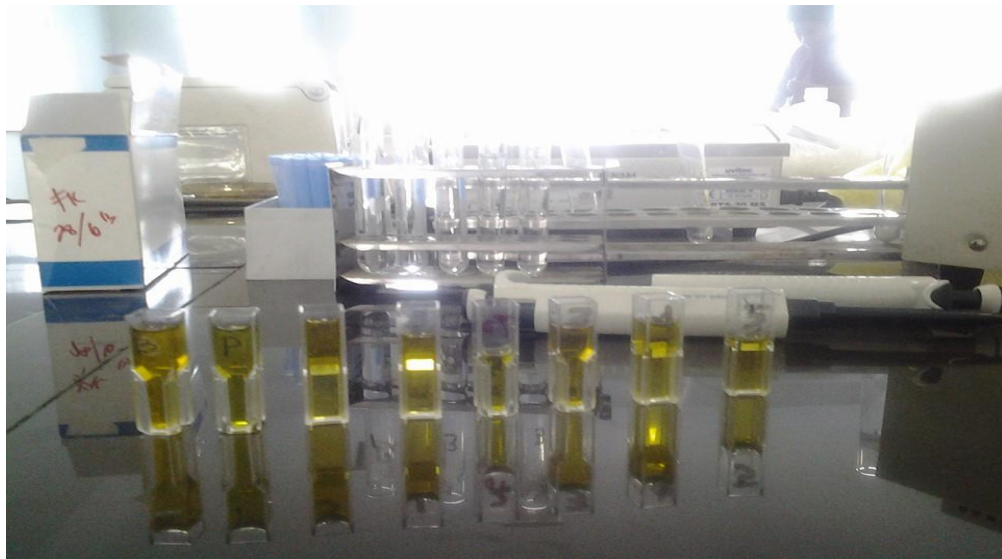
	GLUKOSA	PROTEIN	UREA
volume reagensia kit	1000µl reagensia glukosa	1000µl reagensia	1000µl reagensia A , inkubasi pertama 1000µl reagensia B
volume sampel atau standard	10µl	10µl	10µl
konsentrasi standard	100mg/dl	200mg/dl	40mg/dl

periode dan temperatur inkubasi	10 min @ 37°C	10 min @ 37°C	5 min @ 25°C ** 2X**
periksa pada $\lambda =$	500nm	530nm	600nm

Persiapan panjang gelombang max :

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



Gambar 2. Spektrofotometri

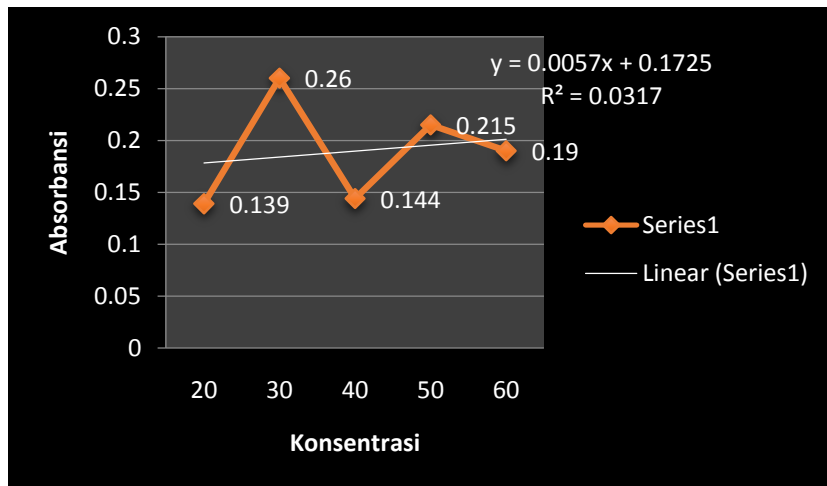
Didapatkan panjang gelombang maksimal larutan standar urea 40ml menggunakan spektrofotometri yaitu $\lambda = 689,5 \text{ nm}$

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

Tabel 1a : Urea – data kalibrasi larutan standar urea

Konsentrasi yang diinginkan [mg/dl]	Absorbansi
20	0.139
30	0.26
40	0.144
50	0.215
60	0.19

Kurva 1a. Urea – data kalibrasi larutan standar urea



Pembahasan :

Untuk mengetahui apakah unsure memenuhi hokum beer atau tidak maka perlu ditentukan grafik kalibrasi absorbansi vs konsentrasi. Hokum lambert beer hanya dapat dipenuhi jika cakupan konsentrasi hasil kalibrasi berupa garis lurus, jadi hanya focus pada linier rangenya. Biasanya sampel yang dianalisa akan memiliki absorbansi yang lebih tinggi dari larutan standar hokum beer menyatakan absorbansi cahaya yang berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan bahan, semakin pekat konsentrasi semakin banyak cahaya yang diserap.

Dengan konsentrasi larutan standar yang digunakan adalah 40 ml/dl dan absorbansi larutan standar yang dipakai adalah absorbansi larutan yaitu 0,144, maka larutan standar 40 ml dijadikan sebagai acuan dengan memiliki panjang gelombang maksimal

Hukum Lambert Beer menyatakan konsentrasi larutan dan absorbansi berbanding lurus dari hasil grafik. Maka didapatkan nilai absorbansi dan konsentrasi larutan yang berbanding lurus dengan grafik meningkat sedikit maka

Pada tabel diatas diketahui konsentrasi larutan standar yang digunakan adalah 40 mg/ dl dan absorbansi standar yang digunakan adalah absorbansi larutan 40ml yaitu **0,144**. Larutan 40ml dijadikan patokan karena memiliki panjang gelombang maksimal.

Berdasarkan grafik diatas diperoleh persamaan regresi $Y = 0,0057x + 0,1725$

$R^2 = 0,0317$ yang artinya hubungan antara konsentrasi larutan dengan absorbansi hubungan sangat lemah, grafik kalibrasi tidak linear dan yang yang didapatkan tidak akurat.

Kesimpulan :

- Berdasarkan data diatas diketahui bahwa Larutan standar urea diatas belum memenuhi hukum Lambert beer secara sempurna karena hasil kalibrasi hampir atau tidak berupa berupa garis lurus.
- Dalam pembuatan sebuah larutan harus teliti dan berhati-hati sehingga sesuai dengan hasil konsentrasi yang diinginkan. Hal itu dapat dibuktikan dengan Sprektrofotometri.
- Pada grafik tidak dihasilkan garis lurus yang sempurna kemungkinan disebabkan oleh kesalahan praktikan saat melakukan pembuatan larutan.

Tabel 1b : Data kalibrasi Larutan sampel urea

Jenis Sampel Urea	Absorbansi	Konsentrasi yang didapat
-------------------	------------	--------------------------

		[mg/dl]
Serum Plasma	0,311	27.80

Caranya: $y = ax + b$

$$X = (y - b) / a$$

$$0,311 = 0,005x + 0,172$$

$$X = (0,311 - 0,172) / 0,005$$

$$= 27,8 \text{ mg/dl}$$

Tabel 1c : Perhitungan konsentrasi larutan urea berdasarkan rumus kit

Jenis Sampel Urea	Absorbansi Sampel	Absorbansi standar	Konsentrasi yang didapat [mg/dl]
Serum Plasma	0,167	0,105	127,24

Caranya:

absorban sampel/ absorban standar pada gelombang 600 nm X konsentrasi standar kit

$$0,167 / 0,105 \times 80 = 127,24 \text{ mg/dl}$$

Kesimpulan:

1. Pada konsentrasi urea yang diperiksa kepada mahasiswa (yunita), ada perbedaan hasil yaitu lebih tinggi menggunakan rumus kit yaitu 127,24 mg/dl walaupun termasuk dalam kategori tinggi padahal mahasiswa (yunita) maka ini menunjukkan ketidak sesuaiandengan hukum lambert beer dikarenakan oleh beberapa factor kesalahan dalam membuat larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik dan hasilnya tidak homogeny karena walaupun hasilnya menunjukkan mahasiswa tidak memiliki gejala klinis uremia, ini terjadi kemungkinan ada kesalahan dalam perhitungan cairan dan mencampurkan / pembuatan larutan dan kuvet sehingga hasil tidak homogeny.

Pengenceran untuk kurva kalibrasi (Standard Curve) dari larutan stok glukosa 150mg/dl

b. GLUKOSA :

1. Siapkan 80 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (80 \times 10) / 150 \\ &= 5,33 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 5,33ml larutan stok urea + 4,67ml aquades

2. Siapkan 90 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (90 \times 10) / 150 \\ &= 6 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 6ml larutan stok urea + 4ml aquades

3. Siapkan 100 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (100 \times 10) / 150 \\ &= 6,67 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 6,67ml larutan stok urea + 3,33ml aquades

4. Siapkan 110 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (110 \times 10) / 150 \end{aligned}$$

$$= 7,33 \text{ ml}$$

Jadi, dibutuhkan 7,33ml larutan stok urea + 2,67ml aquades

5. Siapkan 120 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O

$$\begin{aligned} V_2 &= (V_1 \times C_1) / C_2 \\ &= (120 \times 10) / 150 \\ &= 8 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 8ml larutan stok urea + 2ml aquades

Persiapan panjang gelombang max :

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

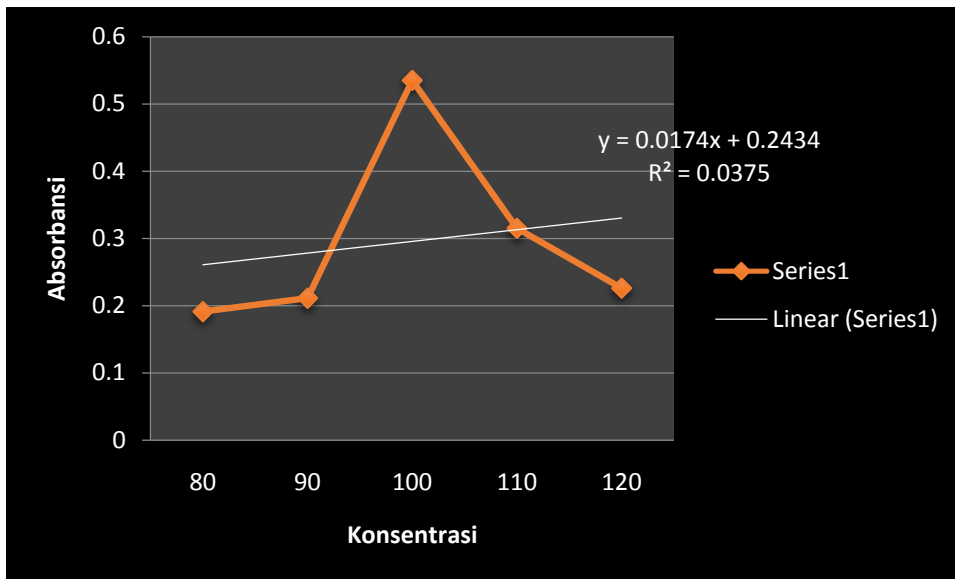
Didapatkan panjang gelombang maksimal menggunakan larutan standar glukosa 100 ml yaitu $\lambda = 479,0 \text{ nm}$

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

Tabel 2a. Data hasil kalibrasi larutan standar glukosa

Konsentrasi yang diinginkan [mg/dl]	Absorbansi
80	0.191
90	0.211
100	0.535
110	0.315
120	0.226
Blanko	0

Kurva 2a. Data hasil kalibrasi larutan standar glukosa



Pembahasan :

Konsentrasi larutan standar yang digunakan adalah 100 mg/ dl dan absorbansi standar yang digunakan adalah absorbansi larutan 100ml yaitu 0,535. Larutan 100ml dijadikan patokan karena memiliki panjang gelombang maksimal. Panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal yang dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu.

Berdasarkan grafik diatas diperoleh persamaan regresi yaitu $Y = 0,0174x + 0,2434$, $R^2 = 0,0375$ yang artinya hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi tidak linear dan hasil tidak akurat. Hal ini menunjukkan hasil yang tidak sesuai dengan hukum *Beer-Lambert* $A = \epsilon dc$. Nilai absorbansi yang didapatkan berbanding lurus dengan konsentrasi glukosa yang diperiksa, terlihat pada beberapa titik konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi yang tidak diikuti oleh peningkatan konsentrasi.

Kesimpulan :

1. Berdasarkan data diatas diketahui Larutan standar glukosa hampir memenuhi hukum *Beer-Lambert* A karena hasil kalibrasi hampir berupa garis lurus. Hubungan konsentrasi dan absorbansi lemah karena R^2 jauh dari nilai = 1
2. Hasil yang didapat tidak berupa garis lurus yang sempurna pada larutan standar berdasarkan hukum *Beer-Lambert* A 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 kuvet.larutan glukosa tidak sesuai dengan larutan yang didapat karena kesalahan dalam perhitungan pengenceran, pencampuran tidak merata sehingga belum homogen
3. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan bahwa data yang diperoleh semakin akurat dan praktikan dalam melakukan praktikum lebih teliti.
4. Maka dari grafik diperoleh persamaan regresi linier yang bias digunakan untuk mengukur konsentrasi larutan, tetapi tidak bias dijadikan patokan karena hasil yang didapat konsentrsi negative menunjukkana bahwa konsentrasi sampel < 0 .

Tabel 2b. Data Hasil pengukuran kalibrasi pengukuran larutan sampel pengenceran glukosa *double dilution* (Konsentrasi stok glukosa 150 mg/dl)

Faktor	Konsentrasi yang diprediksi (mg/dl)	Absorbansi	Konsentrasi yang didapat (mg/dl)
2	75	0,215	86,35
4	37.5	0,203	81,53
8	18.75	0,262	105,22
16	9.375	0,317	127,31
32	4,687	0,243	97,59
64	2.343	0,242	97,19
128	1.17	0,114	45,78

Pembahasan :

Berdasarkan table diatas maka diketahui bahwa konsentrasi larutan sampel glukosa yang diprediksi dengan konsentrasi yang didapat dari hasil spektrofotometri berbeda. dengan panjang gelombang $\lambda = 500 \text{ nm}$. Adanya perbedaan ini disebabkan karena keasalahan pada pembuatan larutan, volume larutan glukosa yang dibutuhkan sangat sedikit yaitu $10\mu\text{l}$ sehingga kemungkinan pada saat memasukkan ke dalam tabung reaksi larutan tidak seluruhnya bercampur dengan reagen, waktu dalam persiapan sampel di cuvet dengan pengukuran absorbansi di spektrofotometri memakan waktu lama sehingga menyebabkan larutan kurang homogeny. Kesalahan juga dapat terjadi pada saat pengkalibrasian spektrofotometri yang digunakan.

Kesimpulan :

1. Larutan sampel glukosa tidak sesuai dengan hukum *Beer-Lambert* A karena hasil kalibrasi menunjukkan ketidak sesuaian larutan yang diadapat dengan larutan yang diprediksi. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi larutan tidak disertai dengan peningkatan absorbansi.
2. Ketidakesuaian diatas karena adanya beberapa factor misalnya karena kesalahan dalam pembuatan larutan, atau larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen, adanya serapan oleh pelarut dan kuvet.

Tabel 2c. Data hasil pengukuran kalibrasi larutan sampel pengenceran glukosa *Glukosa decimal dilution* (Konsentrasi stok glukosa 150 mg/dl)

Pengenceran	Faktor	Konsentrasi yang diprediksi	Absorbansi	Konsentrasi yang didapat
-------------	--------	-----------------------------	------------	--------------------------

		(mg/dl)		(mg/dl)
0,1X	10	15	0,208	83,53
0,01X	100	1,5	0,306	122,89
0,001X	1000	0,15	0,218	87,55
0,3X	30	5	0,246	98,79
0,03X	300	0,5	0,234	93,93
0,003X	3000	0,05	0,023	9,24

Pembahasan :

Berdasarkan tabel diatas diketahui bahwa konsentrasi larutan sampel glukosa yang diprediksi dengan konsentrasi yang didapat dari hasil spektrofotometri berbeda. Panjang gelombang yang digunakan untuk pemeriksaan larutan sampel glukosa sesuai dengan kit yaitu $\lambda = 500 \text{ nm}$. Perbedaan ini bias disebabkan karena kesalahan pada pembuatan larutan, volume larutan glukosa yang dibutuhkan sangat sedikit yaitu $10\mu\text{l}$ sehingga kemungkinan pada saat pengisian larutan ke tabung reaksi, larutan tidak seluruhnya bercampur dengan reagen, waktu persiapan sampel di cuvet dengan pengukuran absorbansi di spektrofotometri memakan waktu lama yang mengakibatkan larutan kurang homogeny.

Kesimpulan :

1. Larutan sampel glukosa tidak sesuai dengan hukum *Beer-Lambert* A karena hasil kalibrasi menunjukkan ketidak sesuaian larutan yang didapat dengan larutan yang diprediksi. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi larutan tidak disertai dengan peningkatan absorbansi.
2. Ketidakesuaian diatas karena adanya beberapa factor misalnya karena kesalahan dalam pembuatan larutan, atau larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen, adanya serapan oleh pelarut dan kuvet.

Tabel 3. Perbandingan Konsentrasi sampel Glukosa yang dihitung pada grafik kalibrasi dan yang dihitung dengan rumus pada reagensia test kit

Pemeriksaan Sampel pengenceran Glukosa	Konsentrasi pada grafik kalibrasi (mg/dl)	Konsentrasi pada reagensia test kit
0,1X	3,589	122,89
0,01X	0,149	98,79

0,001X	-12,66	9,23
0,3X	-2,3	83,53
0,03X	-1,45	87,55
0,003X	-0,54	93,98
Faktor 2	-1,632	86,35
Faktor 4	-2,321	81,53
Faktor 8	0,106	105,22
Faktor 16	4,22	127,31
Faktor 32	-0,022	97,59
Faktor 64	0,08	97,19
Faktor 128	-5,571	45,78

Pembahasan :

Menghitung konsentrasi sampel glukosa dengan rumus persamaan regresi linier pada grafik kalibrasi menggunakan panjang gelombang maksimal larutan 100mg/dl yaitu $\lambda = 479,0$ nm sedangkan dengan menggunakan rumus regensia pada test kit menggunakan panjang gelombang $\lambda = 500$ nm.

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

Dimana : C : konsentrasi larutan

A : Absorbansi

Dari tabel dan kedua grafik diatas dapat kita ketahui bahwa terdapat perbedaan konsentrasi sampel yang didapat menggunakan grafik kalibrasi dan menggunakan rumus pada reagensia test kit. Namun hasil konsentrasi yang didapat menggunakan regensia test kit lebih akurat dibandingkan menggunakan kurva kalibrasi. Perbedaan konsentrasi ini bisa disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya kesalahan pada perhitungan pengenceran, kesalahan dalam melakukan pengenceran, kesalahan dalam mencampurkan larutan dengan aquades, kesalahan dalam mencampurkan reagensia pada kit. Kesalahan-kesalahan ini menyebabkan konsentrasi yang diprediksi berbeda dengan konsentrasi yang didapat, terjadi perbedaan antara konsentrasi berdasarkan kurva kalibrasi dengan berdasarkan rumus pada reagensia test kit. Namun hasil yang paling akurat didapatkan berdasarkan rumus menggunakan reagensia test kit.

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 diperoleh mendekati angka 1 yang menunjukkan bahwa data yang diperoleh semakin akurat dan praktikan yang melakukan percobaan lebih teliti.
5. Dari grafik diperoleh persamaan regresi linier yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi larutan yang didapat, namun tidak bias dijadikan sebagai patokan karena hasil yang diperoleh konsentrasi negative yang menunjukkan bahwa sampel < 0 .

Tabel 4. Perbandingan Konsentrasi sampel Glukosa dan Urea yang dihitung pada grafik kalibrasi dan yang dihitung dengan rumus pada reagensia test kit

Pemeriksaan Sampel serum plasma	Absorbansi pada grafik kalibrasi	Konsentrasi pada grafik kalibrasi	Absorbansi pada rumus reagensia test kit	Konsentrasi pada reagensia test kit
Glukosa (kirana)	0,197	-2.706	0,225	90,36 mg/dl
Urea (yunita)	0,311	27,8 mm/dl	0,167	127,24 mg/dl

Untuk mencari konsentrasi glukosa berdasarkan grafik kalibrasi:

$$Y = ax + b \quad 0,197 = 0,017x + 0,243$$

$$X = \frac{y-b}{a} \quad x = \frac{0,197-0,243}{0,017} = -2,706 \text{ mg/dl}$$

Dimana : Y= Absorbansi
a = Slope
x = Konsentrasi
b= intercept

Untuk mencari konsentrasi glukosa berdasarkan rumus kit
Absorbansi sampel/ absorbansi standar X konsentrasi standar
 $0,225/0,249 \times 100 = 90,36 \text{ mg/dl}$

Untuk mencari urea berdasarkan kurva kalibrasi:

Caranya: $y = ax + b$
 $X = \frac{y-b}{a}$
 $0,311 = 0,005x + 0,172$
 $X = \frac{0,311-0,172}{0,005}$
 $= 27,8 \text{ mg/dl}$

Untuk mencari urea berdasarkan rumus kit:

Caranya:

absorban sampel/ absorban standar pada gelombang 600 nm X konsentrasi standar kit
 $0,167/0,105 \times 80 = 127,24 \text{ mg/dl}$

Absorbansi pada masing-masing mahasiswa berbeda, hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan jenis makanan yang dimakan, jarak waktu antara saat makan dengan saat pengambilan sampel.

Tabel 5 Hasil pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea plasma mahasiswa

detail ² mhs (berapa lama sejak makan; rata-rata apa yg dimakan; jenis kelaminan; umur)	GLUKOSA		TRIGLISERIDA		UREA	
	A	kadar	A	kadar	A	kadar
1. Yunita Wannur azah Jenis kelamin : perempuan Usia : 28 tahun Makanan : makan ifumie Waktu : 1 jam sebelum pemeriksaan	-	-	0,241	63,42 mg/dl	0,167	127,23 mg/dl
2. Kirana patrolina Jenis kelamin : perempuan Usia : 32 tahun Makanan : makan nasi putih dengan ikan teri sambal+susu anlene Waktu : 3 jam sebelum pemeriksaan	0,225	90,36 mg/dl	0,313	82,37 mg/dl	-	-

GLUKOSA

Dari data diatas kadar glukosa Kirana Patrolina 90,36 mg/dl. Hal ini masih dalam batas normal karena kadar glukosa darah 2 jam setelah makan adalah $< 200\text{mg/dl}$. Ketika makanan dikunyah, makanan akan bercampur dengan air liur yang mengandung enzim ptialin (suatu α amilase yang disekresikan oleh kelenjar parotis di dalam mulut). Enzim ini menghidrolisis pati (salah satu polisakarida) menjadi maltosa dan gugus glukosa kecil yang terdiri dari tiga sampai sembilan molekul glukosa. makanan berada di mulut hanya dalam waktu yang singkat dan mungkin tidak lebih dari 3-5% dari pati yang telah dihidrolisis pada saat makanan ditelan.

Sekalipun makanan tidak berada cukup lama dalam mulut untuk dipecah oleh ptialin menjadi maltosa, tetapi kerja ptialin dapat berlangsung terus menerus selama satu jam setelah makanan memasuki lambung, yaitu sampai isi lambung bercampur dengan zat yang disekresikan oleh lambung. Kemudian aktivitas ptyalin dari air liur dihambat oleh zat asam yang disekresikan oleh

lambung, dikarenakan ptyalin merupakan enzim amylase yang tidak aktif saat PH medium turun di bawah 4,0. sehingga untuk mencapai hati tempat glukosa dirubah menjadi glucagon yang memerlukan waktu lebih lama, makanan dari lambung harus melewati usus lalu dialirkan oleh darah ke hati. Selain itu kadar glukosa dipengaruhi oleh pola makan seseorang begitu juga aktifitas dalam kesehariannya. Adapun kesalahan lain yang mungkin menyebabkan perbedaan hasil adalah proses pembuatan larutan menyatukan kedalam cuvet dan juga dipengaruhi oleh homogenisasi dari larutan.

Perpindahan Glukosa Lewat Membran Sel

Molekul glukosa setelah berada pada cairan jaringan (inter seluler) tidak serta merta dapat melewati membran sel yang bersifat selektif permeabel bagi glukosa. Glukosa dapat masuk ke dalam sitoplasma melalui mekanisme difusi fasilitasi dengan menggunakan bantuan (difasilitasi) oleh protein karier yang dirangsang oleh hormon insulin (kemampuannya 10 kali lipat bila dibanding tanpa ada insulin). Sedangkan disakarida tidak dapat masuk ke dalam sel.

Glukosa dalam darah masuk lewat vena porta hepatica kemudian masuk ke sel hati. Selanjutnya glukosa diubah menjadi glikogen (glikogenesis). Sebaliknya, jika tubuh kekurangan glukosa, maka glikogen akan segera diubah lagi menjadi glukosa (glikogenolisis). Hal ini dapat terjadi di hati karena hati memiliki kedua enzim yang berperan dalam katabolisme maupun anabolisme karbohidrat. Glukagon berperan merangsang proses glikogenolisis dan glukoneogenesis. Insulin berperan untuk meningkatkan sintesis glikogen. Makanan yang banyak mengandung KH akan merangsang sekresi insulin dan mencegah sekresi glukagon. Insulin berfungsi mempermudah dan mempercepat masuknya glukosa ke dalam sel dengan meningkatkan afinitas molekul karier glukosa. Glukosa setelah berada di dalam sel, oleh insulin akan disimpan atau disintesis menjadi glikogen baik di hati, otot, atau jaringan lain.

TRIGLISERIDA

Bedasarkan hasil pengamatan yang ditunjukkan pada table diatas didapatkan adanya perbedaan kadar trigliserida dalam plasma darah pada masing-masing praktikan yaitu TGS1 (Yunita ; 158,55 mg/dL) dan TGS2 (Kirana ; 205.92 mg/dL). Perbedaan konsentrasi tersebut dapat disebabkan oleh adanya perbedaan usia, perbedaan jarak makan dengan waktu pemeriksaan serta jenis makanan yang dimakan oleh setiap praktikan.

Interpretasi kadar trigliserida normal berkisar < 150mg/dL sedangkan kadar trigliserida suspect resiko arterosklerosis menurut kit berkisar > 150mg/dL. Sedangkan untuk penderita berkisar \geq 200mg/dL. Bila dibandingkan dengan kadar standar pada kit kedua praktikan sudah masuk dalam suspect arterosklerosis

Unsur lemak dalam makanan yang memiliki peranan penting dalam proses fisiologis adalah : trigliserida, fosfolipid dan kolesterol. Trigliserida tersusun atas asam lemak (free fatty acid) dan gliserol. Kolesterol kebanyakan berasal dari kolesterol hewan, sedangkan kolesterol dari tumbuhan sukar diserap usus. Kolesterol dalam makanan (hewani) terutama berasal dari otak, kuning telur, hati, dan lemak hewan lainnya.

Kadar trigliserida yang diperoleh dari hasil pengukuran sampel darah berkisar antara 63-83 mg/dl. Hal ini masih dalam batas normal karena masih < 150mg/dl. Makanan yang dikonsumsi akan masuk ke dalam tubuh untuk diolah dalam sistem pencernaan. Dalam proses tersebut, makanan yang mengandung lemak dan kolesterol akan diurai secara alami menjadi trigliserida, kolesterol, asam lemak bebas, dan fosfolipid. Senyawa-senyawa di atas akan didistribusikan ke seluruh tubuh melalui sistem peredaran darah untuk memenuhi kebutuhan tubuh. Karena sifatnya yang sukar larut dalam cairan seperti darah, kolesterol beke sama dengan protein membentuk partikel yang bernama lipoprotein. Dalam bentuk inilah kolesterol dan lemak yang ada disalurkan ke seluruh tubuh. Trigliserid adalah salah satu bentuk lemak yang diserap oleh usus setelah mengalami hidrolisis.

Interpretasi hasil pemeriksaan laboratorium terhadap trigliserid (Normal < 150 mg/dL ;Batas tinggi 150 – 199 mg/dL ;Tinggi \geq 200 mg/dL).

UREA

Kadar urea yang diperoleh adalah 127,23 mg/dl. Dari data nilai ini bisa dikatakan terlalu tinggi ataupun tidak normal. Data yang salah bisa disebabkan kesalahan dalam pencampuran larutan ke dalam kuvet. Urea (juga dikenal sebagai karbamid) merupakan produk limbah dari banyak organisme hidup, dan merupakan komponen organik utama urin manusia. Hal ini karena pada akhir rantai reaksi yang memecah asam amino yang membentuk protein. Asam amino dimetabolisme dan diubah dalam hati menjadi amonia, CO₂, air dan energi. Tapi amonia merupakan racun bagi sel-sel, sehingga harus dikeluarkan dari tubuh. Seorang dewasa biasanya mengeluarkannya sekitar 20-40 gram urea per hari.

Urea merupakan hasil deaminasi oksidatif asam amino. Deaminasi oksidatif adalah proses pemecahan (hidrolisis) asam amino menjadi asam keto dan ammonia (NH₄⁺). Deaminasi menghasilkan 2 senyawa penting yaitu senyawa nitrogen dan nonnitrogen.

1. Senyawa nonnitrogen yang mengandung gugus C, H, dan O selanjutnya diubah menjadi asetil Co-A untuk sumber energi melalui jalur siklus Krebs atau disimpan dalam bentuk glikogen.
2. Senyawa nitrogen dikeluarkan lewat urin setelah diubah lebih dahulu menjadi ureum

Setiap kondisi yang mengganggu penghapusan urea oleh ginjal dapat menyebabkan uremia, penumpukan urea dan limbah nitrogen lainnya dalam darah yang bisa berakibat fatal, maka untuk membalikkan kondisi ini, baik itu penyebab gagal ginjal harus dibersihkan dengan menjalani dialysis darah untuk membersihkan segala yang menyebabkan darah menjadi kotor.

Saran :

1. Memberikan penjelasan prosedur kerja bagi praktikan agar lebih mudah dipahami dan mampu melakukan percobaan secara mandiri.
2. Pemahaman mengenai alat spektrofotometer yang akan digunakan akan sangat mendukung untuk mengetahui proses praktikum
3. Penggunaan alat yang harus tepat dalam setiap melakukan praktikum.
4. Membagi kelompok kerja karena jumlah mahasiswa terlalu banyak menyulitkan efisiensi penggunaan alat misalnya pipet otomatis 1000 μ l.