

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

Nama : Mesrida Simarmata (147008011)

Islah Wahyuni (14700824)

Tanggal Praktikum : 17 Maret 2015

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 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 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 λ =	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 :

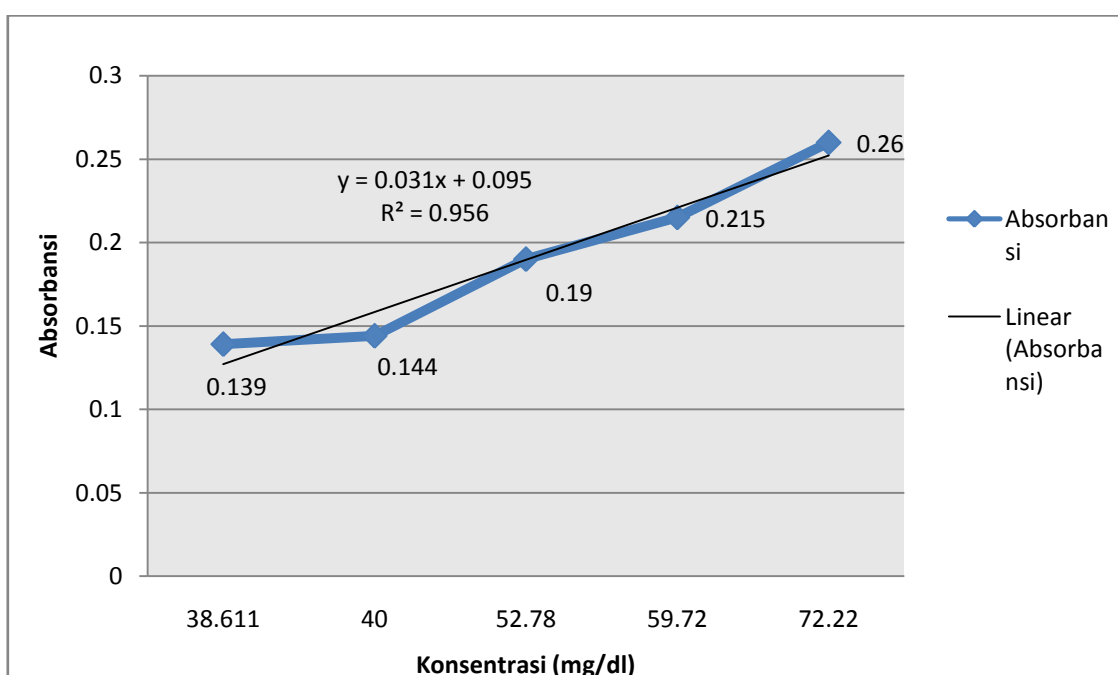
Tabel 1a : Urea – data kalibrasi larutan standar urea

Konsentrasi yang diinginkan [mg/dl]	Absorbansi	Konsentrasi yang didapat [mg/dl]
20	0,139	38,611
30	0,260	72,22
40	0,144	40
50	0,215	59,72
60	0,190	52,78
Blanko	0	0

Tabel 1b : Data kalibrasi Larutan sampel urea

Jenis Sampel Urea	Absorbansi	Konsentrasi yang didapat [mg/dl]
Serum Plasma	0,311	86,39

Kurva 1a.Urea – data kalibrasi larutan standar urea



Pembahasan :

Menurut teori hukum lambert beer konsentrasi larutan dan absorbansi berbanding lurus dari hasil grafik didapat nilai absorbansi dan konsentrasi larutan hampir berbanding lurus maka hasil praktikum hampir sesuai dengan teori hukum lambert beer. Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu $Y = 0,031x + 0,095$ dengan nilai $R^2 = 0,956$ ini menandakan bahwa hubungan absorbansi dengan konsentrasi larutan sangat kuat

Untuk mencari konsentrasi yang didapat pada larutan standar digunakan rumus :

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

Dimana : C = konsentrasi larutan

A = Absorbansi

Pada praktikum ini, 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.

Kesimpulan :

1. Larutan standar urea diatas hampir memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi hampir 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.
3. Semakin tinggi nilai absorbansi, semakin tinggi pula nilai konsentrasi larutan

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
 $V_2 = (V_1 \times C_1) / C_2 = (80 \times 10) / 150 = 5,33 \text{ ml}$
Jadi, dibutuhkan 5,33ml larutan stok urea + 4,67ml aquades
2. Siapkan 90 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
 $V_2 = (V_1 \times C_1) / C_2 = (90 \times 10) / 150 = 6 \text{ ml}$
Jadi, dibutuhkan 6ml larutan stok urea + 4ml aquades

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

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

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

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

$$V_2 = (V_1 \times C_1) / C_2 = (110 \times 10) / 150 = 7,33 \text{ ml}$$

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

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

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

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

Persiapan panjang gelombang max :

Glukosa :

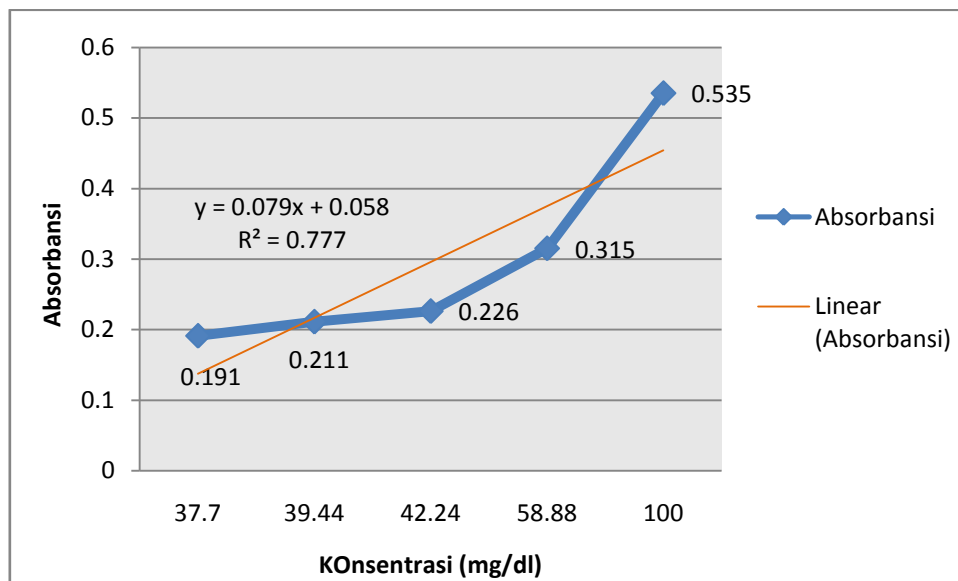
- Siapkan 100 mg/dl standard glukosa dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan λ : 400-600 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standard dan sampel

Didapatkan panjang gelombang maksimal menggunakan larutan standar glukosa 100 ml yaitu $\lambda = 479,0 \text{ nm}$. Dengan panjang gelombang yang didapat tersebut 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	Konsentrasi yang didapat [mg/dl]
80	0,191	35,70
90	0,211	39,44
100	0,535	100
110	0,315	58,88
120	0,226	42,24
Blanko	0	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, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu. Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu **$Y = 0,079x + 0,058$** dengan nilai **$R^2 = 0,777$** . Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi hampir linear dan hasil yang diperoleh memiliki hubungan yang hampir kuat

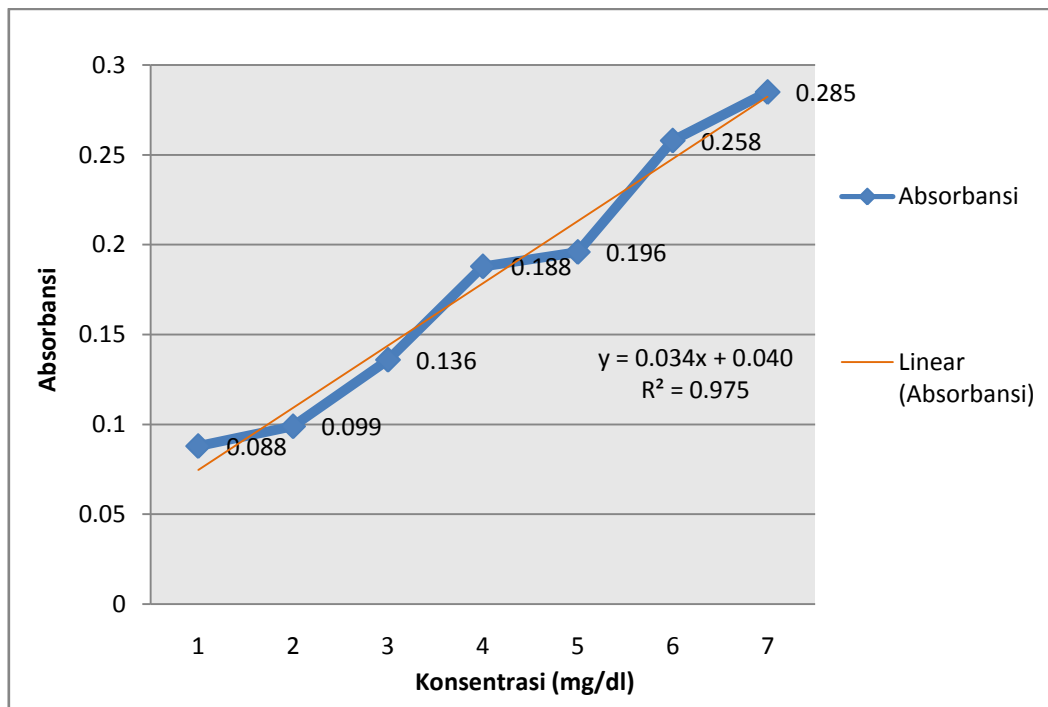
Kesimpulan :

1. Larutan standar glukosa diatas hampir memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi hampir berupa garis lurus.
2. Ketidak sesuaian larutan standar dengan hukum lambret-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 gukosa diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang di dapat dan larutan yang diinginkan. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti kesalahan dalam perhitungan pengenceran, kesalahan dalam mencampurkan larutan standar dengan reagen dari kit juga tidak meratanya pengadukan larutan sehingga belum homogeny.

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	0,136	25,42
4	37.5	0,088	16,45
8	18.75	0,285	53,27
16	9.375	0,258	48,22
32	4,687	0,188	35,14
64	2.343	0,196	36,64
128	1.17	0,099	18,50

Kurva 2b. Hasil pengukuran larutan sampel pengenceran glukosa *double dilution*



Pembahasan :

Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu $Y = 0,034x + 0,040$ dengan nilai $R^2 = 0,975$. Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi hampir linear dan hasil yang diperoleh hampir sempurna. Nilai absorbansi yang hampir linear ini disebabkan kurang homogennya larutan pada kuvet yang mempengaruhi konsentrasi larutan. Volume larutan glukosa yang dibutuhkan sangat sedikit yaitu 10 μ l sehingga kemungkinan pada saat memasukkan ke dalam tabung reaksi larutan tidak seluruhnya bercampur dengan reagen, selain itu waktu persiapan sampel di kuvet dengan pengukuran absorbansi di spektrofotometer juga lama yang mengakibatkan larutan kurang homogen.

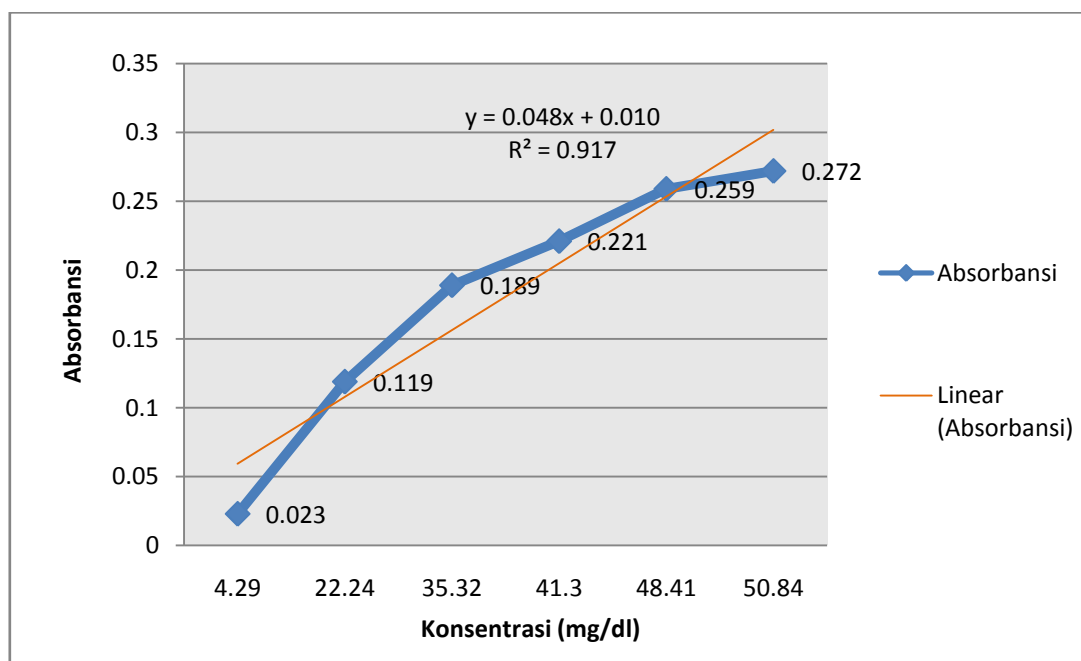
Kesimpulan :

1. Larutan sampel glukosa diatas hampir memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi hampir berupa garis lurus. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi larutan tidak disertai dengan peningkatan absorbansi.
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 sampel glukosa diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dan larutan yang diprediksi.

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

Pengenceran	Faktor	Konsentrasi yang diprediksi (mg/dl)	Absorbansi	Konsentrasi yang didapat (mg/dl)
0,1X	10	15	0,259	48,41
0,01X	100	1,5	0,221	41,30
0,001X	1000	0,15	0,023	4,29
0,3X	30	5	0,119	22,24
0,03X	300	0,5	0,272	50,84
0,003X	3000	0,05	0,189	35,32

Kurva 2c. Hasil pengukuran larutan sampel pengenceran glukosa desimal dilution



Pembahasan :

Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu $Y = -0,048x + 0,010$ dengan nilai $R^2 = 0,917$. Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi linear dan hasil yang diperoleh hubungan yang kuat.

Kesimpulan :

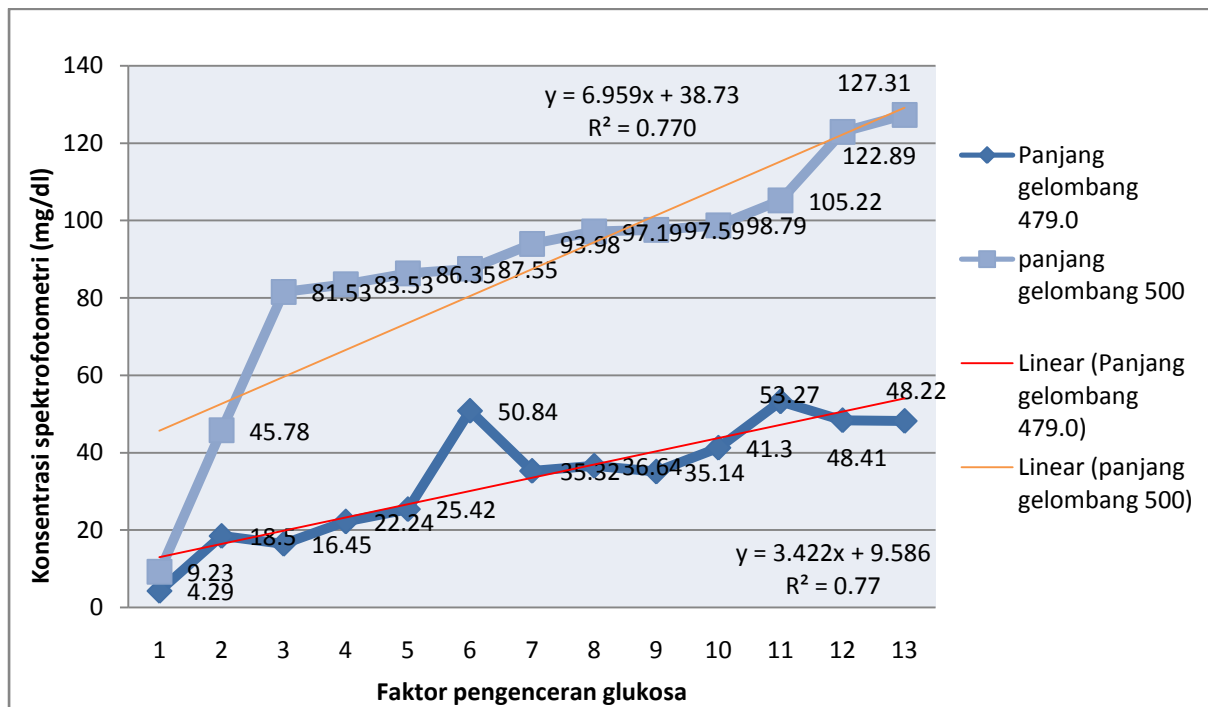
1. Larutan sampel glukosa diatas hampir memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi hampir berupa garis lurus. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi larutan disertai dengan peningkatan absorbansi.
2. Ketidak sesuaian larutan standar dengan hukum lambert-beer dikarenakan oleh beberapa 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 sampel glukosa diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang diidapat dan larutan yang diprediksi.

Tabel 3. 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	36,82 mg/dl	0,225	90,36 mg/dl
Urea (yunita)	0,311	86,38 mg/dl	0,167	127,23 mg/dl

Pemeriksaan Sampel pengenceran Glukosa	Absorbansi pada grafik kalibrasi	Konsentrasi pada grafik kalibrasi (mg/dl)	Absorbansi pada rumus reagensia test kit	Konsentrasi pada reagensia test kit (mg/dl)
0,1X	0,259	48,41	0,306	122,89
0,01X	0,221	41,30	0,246	98,79
0,001X	0,023	4,29	0,023	9,23
0,3X	0,119	22,24	0,208	83,53
0,03X	0,272	50,84	0,218	87,55
0,003X	0,189	35,32	0,234	93,98
Faktor 2	0,136	25,42	0,215	86,35
Faktor 4	0,088	16,45	0,203	81,53
Faktor 8	0,285	53,27	0,262	105,22
Faktor 16	0,258	48,22	0,317	127,31
Faktor 32	0,188	35,14	0,243	97,59
Faktor 64	0,196	36,64	0,242	97,19
Faktor 128	0,099	18,50	0,114	45,78

Kurva 3a. Hasil pengukuran konsentrasi-absorbansi larutan sampel glukosa menggunakan panjang gelombang $\lambda = 479$ nm pada kalibrasi



Kurva 3b. Hasil pengukuran konsentrasi-absorbansi larutan sampel glukosa menggunakan panjang gelombang $\lambda = 500$ nm sesuai rumus pada reagensia test kit

Pembahasan :

Pada grafik pengukuran konsentrasi-absorbansi larutan sampel glukosa menggunakan panjang gelombang $\lambda = 479$ nm pada kalibrasi didapat grafik dengan persamaan regresi yaitu $Y = 3,422x + 9,586$ dengan nilai $R^2 = 0,77$. Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi hampir linear dan hasil yang diperoleh hampir sempurna.

Pada grafik pengukuran konsentrasi-absorbansi larutan sampel glukosa menggunakan panjang gelombang $\lambda = 500$ nm pada reagensia test kit didapat grafik dengan persamaan regresi yaitu $Y = 6,959x + 38,73$ dengan nilai $R^2 = 0,770$. Hal ini menunjukkan grafik kalibrasi hampir linear dan hasil yang diperoleh yaitu hubungan konsentrasi larutan dengan absorbansi adalah kuat

Grafik pemeriksaan Absorbansi konsentrasi glukosa menunjukkan hasil yang hampir sesuai dengan hukum *Beer-Lambert* $A = \epsilon dc$. Nilai absorbansi yang didapatkan hampir berbanding lurus dengan konsentrasi glukosa yang diperiksa, terlihat pada beberapa titik

konsentrasi hampir berbanding lurus dengan A 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 hampir memenuhi hukum lambert beer karena hampir memenuhi garis lurus (linear). Hal ini bermakna bahwa peningkatan konsentrasi disertai dengan peningkatan absorbansi larutan.

Tabel 5 Hasil pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea plasma mahasiswa

detail ² mhs (berapa lama sejak makan; rata-rata apa yg dimakan; jenis kelamin; umur)	GLUKOSA		TRIGLISERIDA		UREA	
	A	kadar	A	kadar	A	kadar
1. Yunita Wannur azah Jenis kelamin : perempuan Usia : 28 tahun Makanan : makan ifumie Waktu : 1jam 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 min 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.Selanjutnya aktivitas ptialin dari air liur dihambat oleh zat asam yang disekresikan oleh lambung.Hal ini dikarenakan ptialin merupakan enzim amilase yang tidak aktif saat PH medium turun di bawah 4,0.

TRIGLISERIDA

Kadar trigliserida yang diperoleh dari hasil pengukuran sampel darah berkisar antara 63-83 mg/dl. Hal ini masih dalam batas normal karena masih $< 150\text{mg/dl}$. 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 $< 150\text{ mg/dL}$;Batas tinggi 150 – 199 mg/dL ;Tinggi $\geq 200\text{ mg/dL}$).

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 kedalam 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. Setiap kondisi yang mengganggu penghapusan urea oleh ginjal dapat menyebabkan uremia, penumpukan urea dan limbah nitrogen lainnya dalam darah yang bisa berakibat fatal. Untuk membalikkan kondisi, baik penyebab gagal ginjal harus dihapus dengan menjalani dialisis darah untuk menghapus kotoran dari darah.

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.