

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 = $10 \times \frac{1}{1000}$

= 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 standar urea dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan λ : 500-700 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standar dan sampel



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



Gambar 2. Spektrofotometri

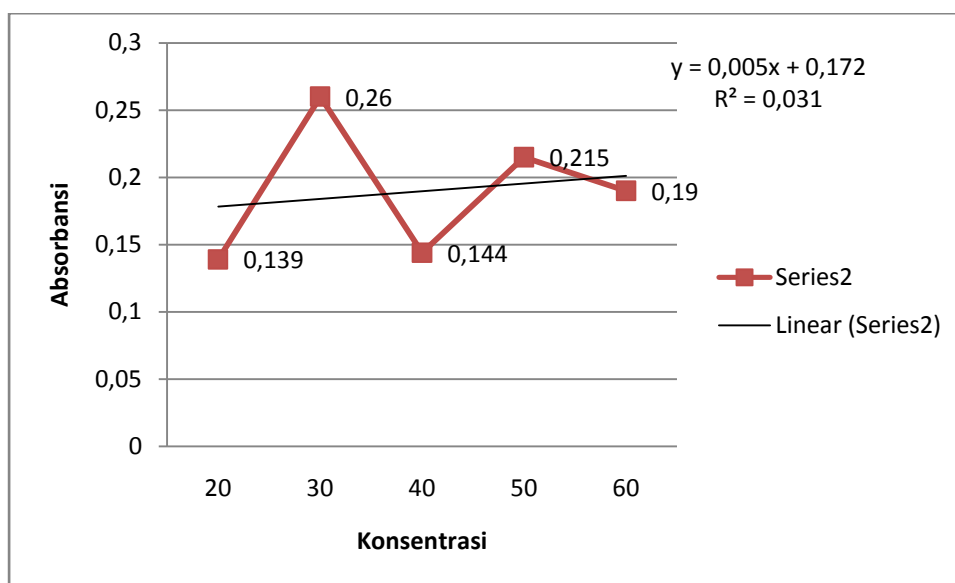
Didapatkan panjang gelombang maksimal larutan standar urea 40ml menggunakan spektrofotometri yaitu $\lambda = 689,5 \text{ nm}$

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

Tabel1a : Urea – data kalibrasi larutan standar urea

Konsentrasi yang diinginkan [mg/dl]	Absorbansi
20	0,139
30	0,260
40	0,144
50	0,215
60	0,190
Blanko	0

Kurva 1a.Urea – data kalibrasi larutan standar urea



Pembahasan :

1. Menurut teori hukum lambert beer konsentrasi larutan dan absorbansi berbanding lurus dari hasil grafik. Didapat nilai absorbansi dan konsentrasi larutan berbanding lurus menaik sedikit maka hasil praktikum sesuai dengan teori hukum lambert beer walaupun ada sebagian yang tidak mengikuti hukum lambert beer karena grafik jikjak contohnya nilai absorbansi pada konsentrasi 30. Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu $Y = 0,005x + 0,172$ dengan nilai $R^2 = 0,031$ ini menandakan bahwa hubungan absorbansi dengan konsentrasi larutan sangat lemah

2. 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 belum memenuhi hukum lambert beer secara sempurna 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. Sebaiknya semakin tinggi nilai absorbansi, semakin tinggi pula nilai konsentrasi larutan tapi dalam kurva didapati ada absorbansi yang tinggi lalu turun kembali sedangkan konsentrasi bertambah tinggi.

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 terhadap mahasiswa yang bernama yunita, ada perbedaan hasil yaitu lebih tinggi menggunakan rumus kit yaitu 127,24 mg/dl walaupun ini termasuk dalam kategori tinggi padahal mahasiswa tersebut tidak menunjukkan gejala klinis uremia, ini terjadi kemungkinan ada kesalahan dalam pembuatan larutan dan kuvet.

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

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 :

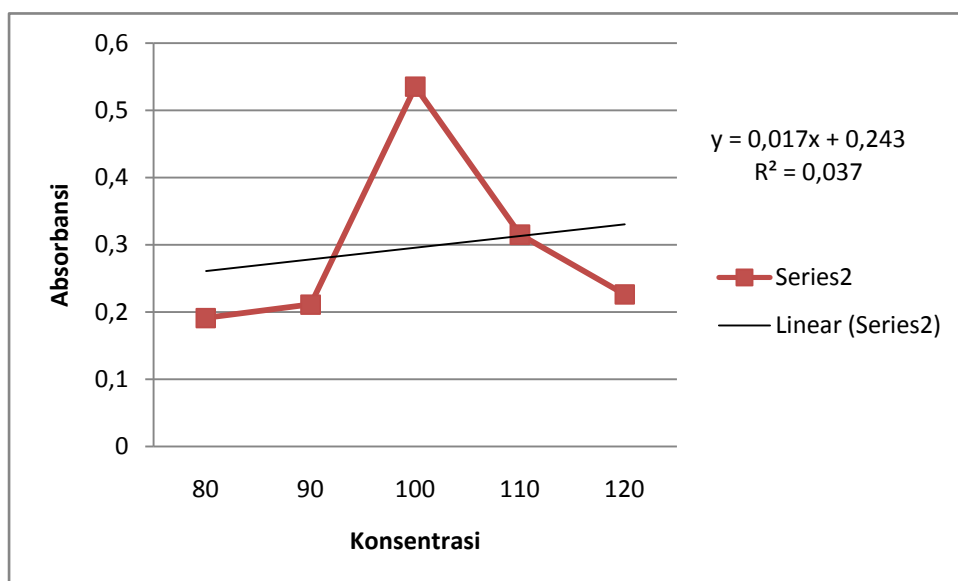
- Siapkan 100 mg/dl standard glukosa dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan λ : 400-600 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standard dan sampel

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
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 :

1. 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**.
2. 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 $y = 0,017x +$

0,243 dengan nilai $R^2 = 0,037$. Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi jauh dari 1 dan hasil yang diperoleh memiliki hubungan yang lemah

Kesimpulan :

1. Larutan standar glukosa diatas hampir memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi hampir berupa garis lurus menaik sedikit namun sebagian karena absorbansi konsentrasi 100 dan 120 terlalu naik dan turun. Hubungan konsentrasi dan absorbansi lemah karena R^2 jauh dari nilai 1.
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 di dapat dan larutan yang diinginkan. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti 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	-6,294
4	37.5	0,088	-9,118
8	18.75	0,285	2,471
16	9.375	0,258	0,882
32	4,687	0,188	-3,235
64	2.343	0,196	-2.765
128	1.17	0,099	-8.471

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	0,941
0,01X	100	1,5	0,221	-1,294
0,001X	1000	0,15	0,023	-12,941
0,3X	30	5	0,119	-7,294
0,03X	300	0,5	0,272	1,706
0,003X	3000	0,05	0,189	-3,177

Tabel 3a. 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 = Konsentarsi
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: $y = ax + b$

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

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

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

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

Untuk mencari urea berdasarkan rumus kit:

Caranya:

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

Tabel 3b. Perbandingan konsentrasi pada kalibrasi panjang gelombang 479 nm dengan konsentrasi pada regensia kit dengan panjang gelombang 500 nm dan abs standart 0,249

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	0,941	0,306	122,98
0,01X	0,221	-1,294	0,246	98,79
0,001X	0,023	-12,941	0,023	9,20
0,3X	0,119	-7.294	0,208	83,50
0,03X	0,272	1,706	0,218	87,60
0,003X	0,189	-3,177	0,234	94
Faktor 2	0,136	-6,294	0,215	86,30
Faktor 4	0,088	-9,118	0,203	81,53
Faktor 8	0,285	2,471	0,262	105,20
Faktor 16	0,258	0,882	0,317	127,30
Faktor 32	0,188	-3,235	0,243	97,60
Faktor 64	0,196	-2.765	0,242	97,20
Faktor 128	0,099	-8.471	0,114	45,80

Pembahasan:

1. Terdapat perbedaan nilai konsentrasi pada larutan pada larutan yang dihitung dengan kurva kalibrasi dengan larutan standart 100 ml pada panjang gelombang 479 nm dengan konsentrasi larutan berdasarkan rumus kit dengan panjang gelombang 500 nm.
2. Semua konsentrasi yang dihitung berdasarkan rumus kit lebih tinggi dibanding konsentrasi berdasarkan rumus kurva kalibrasi
3. Perbedaan konsentrasi bisa terjadi karena panjang gelombang yang beda dan ada faktor kebersihan dari kuvet, ataupun pengenceran yang menggunakan mikropipet yang kurang akurat/ tepat.

Tabel 4 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	-	-

Pembahasan:**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 < 200mg/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 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 $150 - 199\text{ mg/dL}$;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, CO_2 , 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.