

## **LAPORAN PRAKTIKUM III**

### **PRAKTIKUM METABOLISME GLUKOSA, UREA DAN TRIGLISERIDA**

#### **(TEKNIK SPEKTROFOTOMETRI)**

---

**NAMA : IKA WARAZTUTY DAN IRA ASTUTI**

**PRODI : MAGISTER ILMU BIOMEDIK**

**TGL PRATIKUM : 17 MARET 2015**

#### **TUJUAN PRATIKUM :**

1. Dapat mengerti prinsip-prinsip dasar mengenai teknik spektrofotometri (yaitu prinsip dasar alatnya, kuvet, larutan standar, blanko, serta hukum Beer- Lambert dll)
2. Latihan pembuatan dan penggunaan larutan stok
3. Mengumpulkan data kadar glukosa, trigliserida dan urea darah
4. Latihan pembuatan dan interpretasi grafik
5. Persiapan untuk praktikum metabolisme II dimana akan mendesain dan melakukan percobaan yang berdasarkan teknik-teknik praktikum ini

#### **HASIL PRATIKUM :**

**MEMAHAMI PRINSIP-PRINSIP DASAR MENGENAI TEKNIK SPEKTOFOTOMETRI (YAITU PRINSIP DASAR ALATNYA, KUVET, LARUTAN STANDAR, BLANKO, SERTA HUKUM BEER- LAMBERT DLL)**

Spektrofotometri merupakan suatu metode analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detector Fototube. Dalam analisis cara spektrofotometri terdapat tiga daerah panjang gelombang elektromagnetik yang digunakan, yaitu daerah UV (200-380 nm), daerah Visible (380-700 nm), daerah Inframerah (700-3000 nm).

Prinsip kerja spektrofotometri berdasarkan hukum Lambert-Beer, bila cahaya monokromatik ( $I_0$ ), melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut diserap ( $I_a$ ), sebagian dipantulkan ( $I_r$ ), dan sebagian lagi dipancarkan ( $I_t$ ). Transmittans adalah perbandingan intensitas cahaya yang di transmisikan ketika melewati sampel ( $I_t$ ) dengan intensitas cahaya mula-mula sebelum melewati sampel ( $I_0$ ). Persyaratan hukum Lambert-Beer antara lain : Radiasi yang digunakan harus monokromatik, energi radiasi yang di absorpsi oleh sampel tidak menimbulkan reaksi kimia, sampel (larutan) yang mengabsorpsi harus homogen, tidak terjadi fluoresensi atau phosphoresensi, dan indeks refraksi tidak berpengaruh terhadap konsentrasi, jadi larutan harus pekat (tidak encer).

Beberapa larutan seperti larutan Timbal ( $Pb^{2+}$ ) dalam air tidak berwarna, supaya timbul warna larutan Pb diekstraksi dengan dithizone sehingga berubah menjadi berwarna merah. Larutan berwarna merah akan menyerap radiasi pada daerah hijau. Dalam hal ini larutan Pb menunjukkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515 nm.

Beberapa istilah yang terkait dalam spektrofotometri ini antara lain :

- **Absorbansi** adalah daya radiasi sinar yang diserap oleh larutan baik itu larutan baku maupun blanko
- **Transmittan** adalah daya radiasi sinar yang diteruskan atau yang keluar dari kuvet dan daya radiasi sinar yang masuk ke dalam kuvet.
- **Kuvet** adalah tempat untuk meletakkan larutan, baik larutan blanko maupun larutan baku,
- **Drive cell** adalah tempat untuk meletakkan kuvet.
- **Blanko** berfungsi untuk mengoreksi adanya sinar yang dipantulkan oleh kuvet dan sinar yang diserap oleh substituen lain.

**Gambar 1. Spektrofotometer**



**Gambar 2. Kuvet**



**LATIHAN PEMBUATAN DAN PENGGUNAAN LARUTAN STOK, MENGUMPULKAN DATA KADAR GLUKOSA, TRIGLISERIDA DAN UREA DARAH DAN LATIHAN PEMBUATAN DAN INTERPRETASI GRAFIK**

**A. GLUKOSA**

Siapkan 50 ml larutan glukosa 1,5 g/L (150mg/dl), maka jumlah bubuk glukosa yang dibutuhkan adalah :  $50 \text{ ml}/1000 \text{ ml} \times 1,5 \text{ gr}/1000 \text{ ml} = 0,075 \text{ gr}$

Dari larutan stok tersebut dibuat pengenceran untuk kurva kalibrasi (Standar Kurva) yakni :

10 ml 80 mg/dl standard glukosa	5,34 ml glukosa 150mg/dl + 4,66 ml Aquadest
10 ml 90 mg/dl standard glukosa	6 ml glukosa 150mg/dl + 4 ml Aquadest
10 ml 100 mg/dl standard glukosa	6,67 ml glukosa 150mg/dl + 3,33 ml Aquadest
10 ml 110 mg/dl standard glukosa	7,33 ml glukosa 150mg/dl + 2,67 ml Aquadest
10 ml 120 mg/dl standard glukosa	8 ml glukosa 150mg/dl + 2 ml Aquadest

Kemudian disiapkan Larutan Blanko dan standar yang diisi ke dalam kuvet :

- Larutan Blanko : Terdiri dari Reagen Glucosa 1000  $\mu\text{l}$
- Larutan Standar : Terdiri dari Reagen Glucosa 1000  $\mu\text{l}$  +

Larutan standar 10  $\mu\text{l}$

Kemudian salah satu larutan pengenceran dari Larutan stok (**10 ml 100 mg/dl standard glukosa**) di periksa dengan spektrofotometer untuk menilai panjang gelombang maksimum yang akan digunakan untuk mengukur nilai absorban dari sampel.

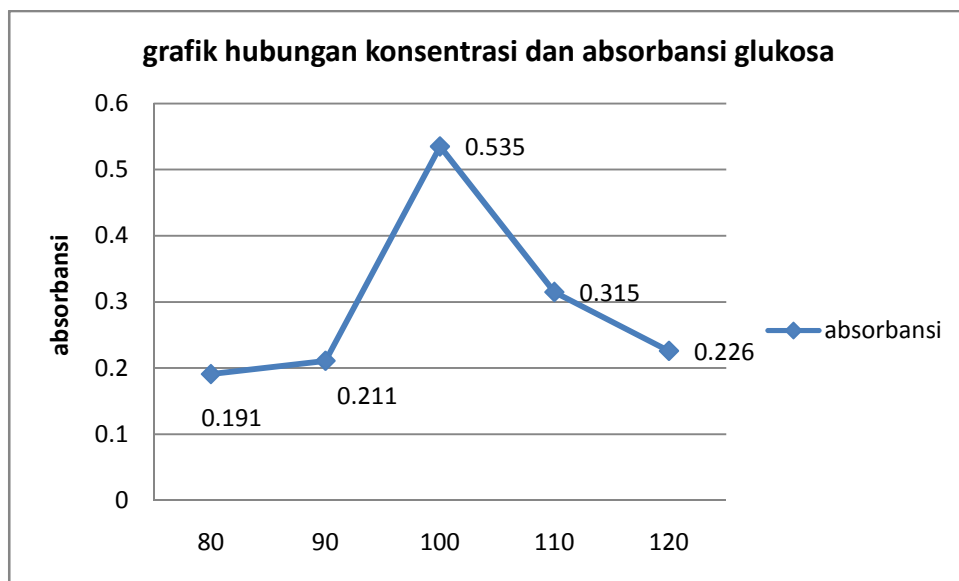
Dari hasil pengukuran spektrofotometer diperoleh panjang gelombang maksimum :

$$\lambda = 479 \text{ nm}$$

Data untuk kurva kalibrasi :

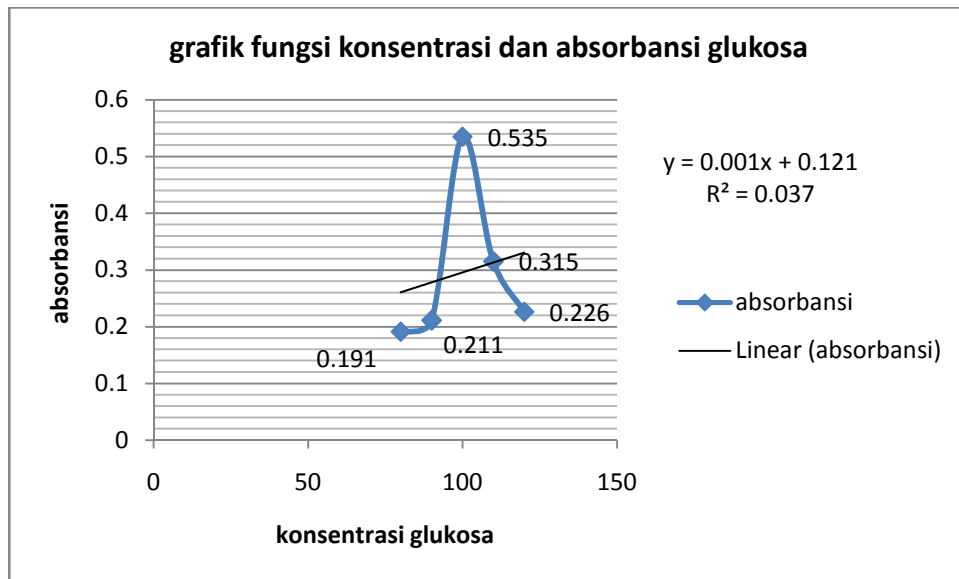
Konsentrasi [mg/dl]	Absorbansi
80	0,191
90	0,211
100	0,535
110	0,315
120	0,226

Dari data diatas dapat digambarkan dalam grafik sebagai berikut :



Keterangan grafik :

- Sumbu x adalah konsentrasi glukosa dalam mg/dl
- Sumbu y adalah absorbansi larutan glukosa



Untuk mendapatkan konsentrasi larutan digunakan rumus :  $y = ax + b$

$y$  = nilai absorbansi larutan standar,  $x$  = konsentrasi larutan (mg/dL)

berdasarkan kurva kalibrasi standar glukosa, dapat dihitung konsentrasi glukosa dengan menggunakan rumus  $y = ax + b$ , sehingga diperoleh konsentrasi sebagai berikut :

Konsentrasi [mg/dl]	Absorbansi	Konsentrasi berdasarkan kurva kalibrasi standard glukosa (mg/dl)
80	0,191	70
90	0,211	90
100	0,535	414
110	0,315	194
120	0,226	105

Kesimpulan dari grafik :

1. Grafik pemeriksaan Absorbansi konsentrasi glukosa menunjukkan hasil yang tidak sesuai dengan hukum *Beer-Lambert*  $A = \epsilon dc$ . Nilai absorbansi yang didapatkan tidak berbanding lurus dengan konsentrasi glukosa yang diperiksa, terlihat pada beberapa titik konsentrasi tidak berbanding lurus dengan  $A$ . Nilai absorbansi yang tidak linear ini disebabkan kurang homogenya larutan pada kuvet yang mempengaruhi konsentrasi larutan.

2. 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, selain itu waktu persiapan sampel di cuvet dengan pengukuran absorbansi di spektrofotometer juga lama yang mengakibatkan larutan kurang homogen. Kesalahan juga dapat terjadi pada saat pengkalibrasian spektrofotometer yang digunakan
3. Nilai  $R = 0,037$  menunjukkan bahwa pengukuran konsentrasi dengan cara kalibrasi tidak cukup baik dilakukan pada praktikum ini.

Dengan menggunakan panjang gelombang maksimum  $\lambda = 500 \text{ nm}$  diukurlah sampel glukosa.

Sampel glukosa yang digunakan berasal dari serum darah dan pengenceran glukosa

- Sampel serum darah  
 $\sim 1 \text{ ml}$  darah diambil ke dalam wadah yang berisi EDTA. Menggunakan alat sentrifugasi klinik untuk memisahkan sel-sel darah dari plasma. Akan diperoleh  $\pm 500\mu\text{l}$  plasma tapi hanya  $10\mu\text{l}$  dibutuhkan untuk pemeriksaan glukosa, protein dan urea.
- Pengenceran glukosa 5%

Pengenceran	Perhitungan
0,1X	1 ml larutan glukosa 5% + 9 ml aquadest
0,01X	1ml larutan 0,1X + 9 ml Aquadest
0,001X	1ml larutan 0,01X + 9 ml Aquadest
0,3X	3 ml larutan glukosa 5% + 7ml aquadest
0,03X	3 ml larutan 0,3X + 7 ml aquadest
0,003X	3 ml larutan 0,03X + 7 ml aquadest
Faktor 2	1 ml larutan glukosa 5% + 1ml Aquadest
Faktor 4	1 ml larutan glukosa 5% + 3 ml Aquadest 3ml
Faktor 8	1 ml larutan glukosa 5% + 7 ml Aquadest
Faktor 16	1 ml larutan glukosa 5% + 15 ml Aquadest

Faktor 32	1 ml larutan glukosa 5% + 31 ml Aquadest
Faktor 64	1 ml larutan glukosa 5% + 63 ml Aquadest
Faktor 128	1 ml larutan glukosa 5% + 127ml Aquadest

Sampel tersebut diukur kadarnya dengan Spektrofotometri dengan panjang gelombang  $\lambda = 500 \text{ nm}$  sehingga diperoleh hasil sebagai berikut :

No	SAMPEL	ABSORB AN (ABS)	KONSENTRASI DENGAN RUMUS PADA KIT REGENSIA ( mg/dl )	KONSENTRASI PREDIKSI ( mg/dl )
1	Sampel serum darah	0,225	90,36	-
2	Pengenceran 0,1X	0,306	122,89	15
3	Pengenceran 0,01X	0,246	98,79	1,5
4	Pengenceran 0,001X	0,023	9,23	0,15
5	Pengenceran 0,3X	0,208	83,53	45
6	Pengenceran 0,03X	0,218	87,55	4,5
7	Pengenceran 0,003X	0,234	93,97	0,45
8	Pengenceran Faktor 2	0,215	86,34	75
9	Pengenceran Faktor 4	0,203	81,52	37,5
10	Pengenceran Faktor 8	0,262	105,22	18,75
11	Pengenceran Faktor 16	0,317	130,45	9,375
12	Pengenceran Faktor 32	0,243	97,59	4,687
13	Pengenceran Faktor 64	0,242	97,18	2,343
14	Pengenceran Faktor 128	0,114	45,78	1,171

Dari hasil pengukuran serapan dari beberapa sampel glukosa yang diencerkan, dapat dihitung konsentrasi glukosa dengan menggunakan rumus reagensia kit, yaitu:

**Konsentrasi glukosa (mg/dl) = Absorbansi sampel X Konsentrasi standard (mg/dl)**

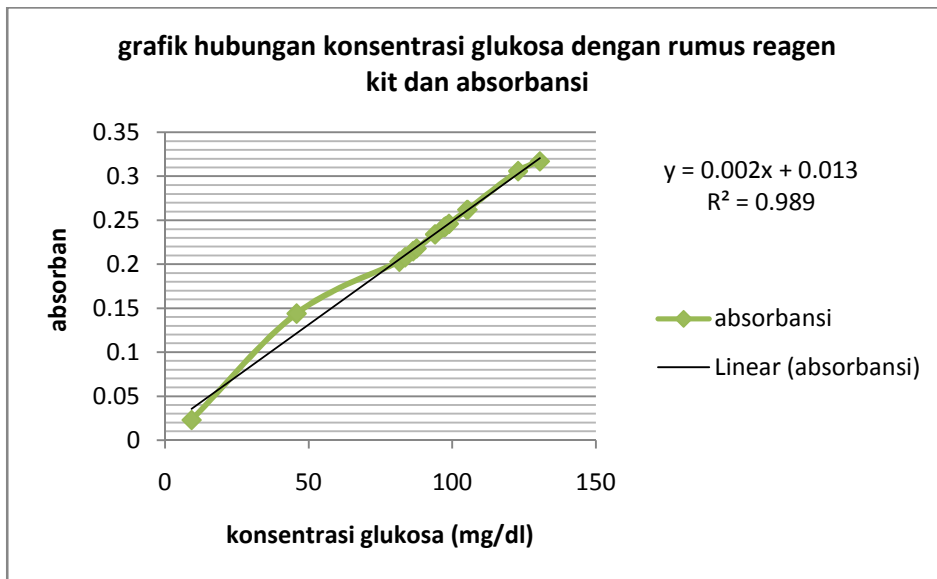
**Absorbansi standard**

Dengan konsentrasi standard yang digunakan adalah larutan glukosa stok dengan konsentrasi glukosa 100 mg/dl, dan panjang gelombang  $\lambda = 500 \text{ nm}$ .

Konsentrasi prediksi dihitung dengan menggunakan larutan glukosa stok 150 mg/dl yang diencerkan dengan beberapa konsentrasi pengenceran.

Dari tabel hasil pengamatan, didapatkan :

1. Perbedaan konsentrasi glukosa sampel yang dihitung dengan reagensia kit dibandingkan dengan konsentrasi glukosa sampel yang diprediksi sangat jauh, artinya konsentrasi glukosa yang di periksa menggunakan spektrofotometri jauh lebih besar daripada konsentrasi glukosa yang dihitung manual. Hal ini disebabkan larutan yang diperiksa dalam kuvet tidak tercampur merata.
2. Konsentrasi glukosa dengan pengenceran 0,003x lebih besar daripada konsentrasi glukosa dengan pengenceran 0,03x, hal ini disebabkan kesalahan dalam pengenceran larutan.
3. Konsentrasi glukosa pada pengenceran 32x dan konsentrasi glukosa pada pengenceran 64x menunjukkan sedikit perbedaan, yang seharusnya konsentrasi glukosa dengan pengenceran 64x adalah  $\frac{1}{2}$  dari konsentrasi glukosa pada pengenceran 32x. Hal ini disebabkan kesalahan dalam membuat pengenceran atau saat pengukuran dengan spektrofotometer.



Dari grafik diatas apabila dibandingkan dengan grafik kurva konsentrasi glukosa dengan kalibrasi, maka disimpulkan :

Mencari konsentrasi glukosa menggunakan rumus dari reagensia kit, nilai R = 0,989, menunjukkan ketepatan yang lebih baik daripada mencari konsentrasi glukosa menggunakan cara kalibrasi ( R = 0,037 )

**B. UREA**

Larutan stok urea : siapkan 10 ml larutan urea pada kadar 1,0 g/L atau 100mg/dl maka jumlah bubuk urea yang dibutuhkan adalah :  $10/1000 = 0,01$  gr

Dari larutan stok tersebut dibuat pengenceran untuk kurva kalibrasi (Standar Kurve) yakni:

10 ml 20 mg/dl standard urea	2 ml urea 100mg/dl + 8 ml Aquadest
10 ml 30 mg/dl standard urea	3 ml urea 100mg/dl + 7 ml Aquadest
10 ml 40 mg/dl standard urea	4 ml urea 100mg/dl + 6 ml Aquadest
10 ml 50 mg/dl standard urea	5 ml urea 100mg/dl + 5 ml Aquadest
10 ml 60 mg/dl standard urea	6 ml urea 100mg/dl + 4 ml Aquadest

Kemudian disiapkan Larutan Blanko dan standar yang diisi ke dalam kuvet :

- Larutan Blanko : Terdiri dari Reagen Urea 1000  $\mu$ l
- Larutan Standar :Terdiri dari Reagen Urea 1000  $\mu$ l +

Larutan standar 10  $\mu$ l

Kemudian salah satu larutan pengenceran dari Larutan stok (**10 ml 40 mg/dl standard Urea**) di periksa dengan spektrofotometer untuk menilai panjang gelombang maksimum yang akan dipakai untuk mengukur nilai absorban dari sampel

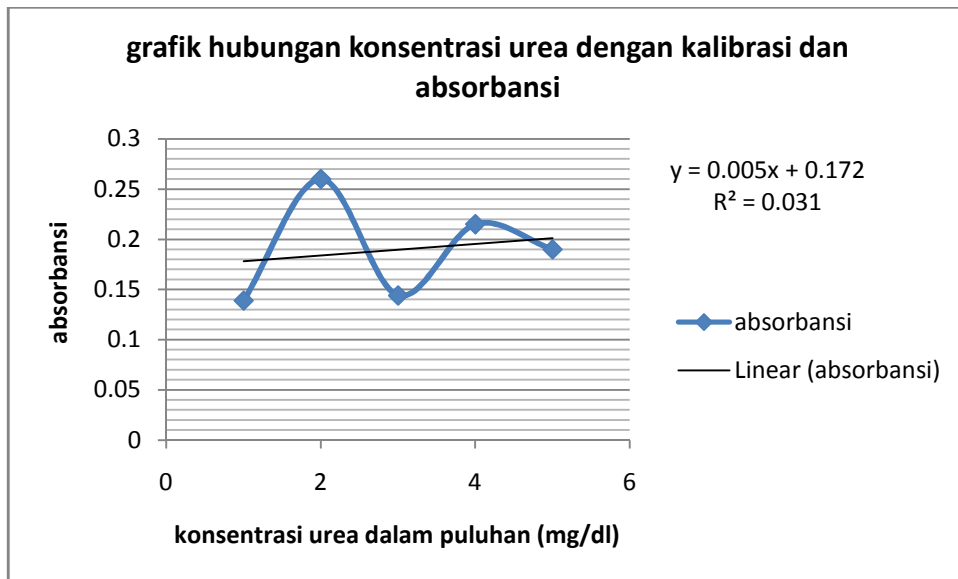
Dari hasil pengukuran spektrofotometer diperoleh panjang gelombang maksimum :

$$\lambda = 689,5 \text{ nm}$$

Data untuk kurva kalibrasi :

Konsentrasi [mg/dl]	Absorbansi
20	0.139
30	0.260
40	0.144
50	0.215
60	0.190

Dari data diatas dibuat grafik sebagai berikut :



Apabila konsentrasi dihitung berdasarkan nilai  $y = 0,005x + 0,172$ , dimana  $y$  adalah absorbansi dan  $x$  adalah konsentrasi urea, maka diperoleh konsentrasi urea berdasarkan kurva kalibrasi sebagai berikut :

Konsentrasi [mg/dl]	Absorbansi	Konsentrasi berdasarkan kurva kalibrasi (mg/dl)
20	0.139	-66
30	0.260	17,6
40	0.144	-5,6
50	0.215	8,6
60	0.190	3,6

Dari grafik diatas disimpulkan :

1. Praktikan tidak dapat membuktikan hukum Beer-Lambert, dimana absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi . grafik diatas menunjukkan tidak adanya konsistensi peningkatan konsentrasi terhadap peningkatan absorbansi.

2. Kesalahan hasil pembuktian hukum Beer- Lambert dalam praktikum ini disebabkan ketidakhomogenan larutan pada kuvet atau faktor suhu ruangan yang tinggi yang mempengaruhi larutan.
3. Nilai R = 0,031 menunjukkan cara mencari konsentrasi urea dengan cara kalibrasi kurang baik, karena nilai 0,031 jauh dari nilai 1,00.

Dengan menggunakan panjang gelombang maksimum  $\lambda = 600 \text{ nm}$  diukurlah sampel untuk memeriksa Urea . Sampel Urea yang digunakan berasal dari serum darah

- Sampel serum darah

~ 1 ml darah diambil ke dalam wadah yang berisi EDTA. Menggunakan alat sentrifugasi klinik untuk memisahkan sel-sel darah dari plasma. Akan diperoleh  $\pm 500\mu\text{l}$  plasma tapi hanya  $10\mu\text{l}$  dibutuhkan untuk pemeriksaan urea.

Dari pemeriksaan spektrofotometri diperoleh hasil sebagai berikut :

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi
Sampel plasma	0,167	127,23 mg/dl

### C. TRIGLISERIDA

Siapkan Larutan Blanko dan standar yang diisi ke dalam kuvet :

- Larutan Blanko : Terdiri dari Reagen Trigliserida  $1000 \mu\text{l}$
- Larutan Standar :Terdiri dari Reagen Trigliserida  $1000 \mu\text{l} +$

Larutan standar  $10 \mu\text{l}$

Dengan menggunakan panjang gelombang  $\lambda = 500 \text{ nm}$  tersebut diukurlah sampel Trigliserida . Sampel Trigliserida yang digunakan berasal dari serum darah

- Sampel serum darah

~ 1 ml darah diambil ke dalam wadah yang berisi EDTA. Menggunakan alat sentrifugasi klinik untuk memisahkan sel-sel darah dari plasma. Akan diperoleh ± 500µl plasma tapi hanya 10µl dibutuhkan untuk pemeriksaan Triglicerida.

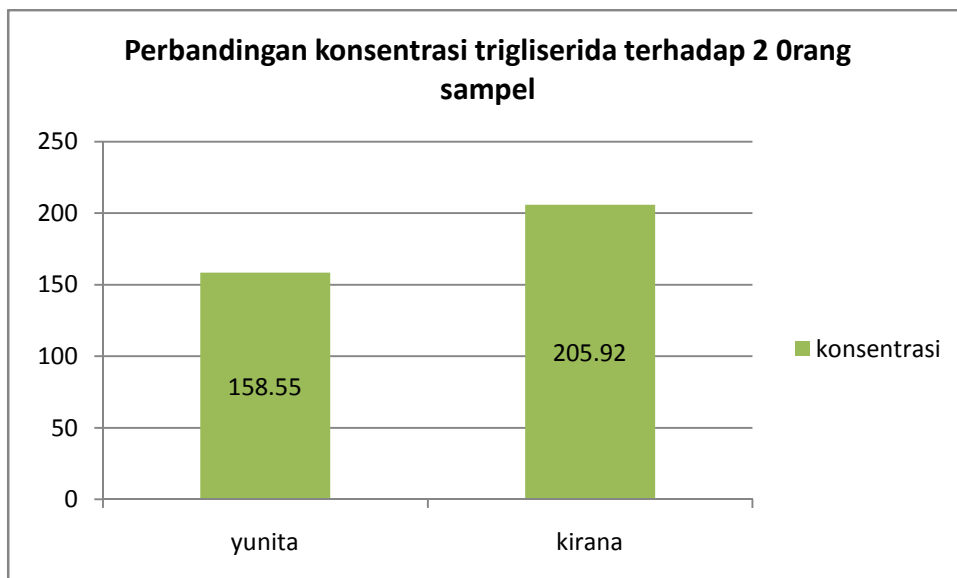
Dari Hasil pemeriksaan diperoleh data sebagai berikut :

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi
Sampel plasma 1 (yunita)	0.241	$(0.241/0.304) \times 200 = 158,55 \text{ mg/dl}$
Sampel plasma 2 (kirana)	0.313	$(0.313/0.304) \times 200 = 205,92 \text{ mg/dl}$

Konsentrasi dapat diperoleh melalui rumus sebagai berikut ;

$$\text{Konsentrasi sampel} = \frac{\text{Absorban sampel} \times \text{Konsentrasi Standar}}{\text{Absorban Standar}}$$

Dari data tersebut dapat dibuat grafik sebagai berikut :



## Hasil Pengukuran Kadar Sampel Glukosa-Urea-Trigliserida

Seluruh Kelompok Detil Mahasiswa

Detail Mhs (berapa lama sejak makan, jenis kelamin, umur)	Glukosa		Trigliserida		Urea	
	A	Kadar (mg/dl)	A	Kadar (mg/dl)	A	Kadar (mg/dl)
1. Yunita, 28 tahun ( makan ifumi 1 jam sebelum diambil sampel darahnya )			0,241	158,5	0,311	236,95
2. Kirana, 32 tahun ( makan nasi putih + ikan teri sambal + susu , 3 jam sebelum diambil sampel darahnya )	0,197	0,041	0,313	205,9		

Kesimpulan :

Kadar trigliserida serum kirana lebih tinggi daripada yunita. Hal ini disebabkan perbedaan jenis, banyak makanan yang dimakan dan jarak waktu makan dan pengambilan sampel serum.

Saran :

Sebaiknya peralatan di laboratorium ditambah agar semua praktikan bisa melakukan kegiatan praktikum secara bersamaan.

