

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

**Nama** : dewi maya sarah

**Tanggal Praktikum** : 10Maret2015

**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 H<sub>2</sub>O

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

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

2. Siapkan 30 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H<sub>2</sub>O

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

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

3. Siapkan 40 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H<sub>2</sub>O

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

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

4. Siapkan 50 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H<sub>2</sub>O

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

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

5. Siapkan 60 mg/dl standard urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H<sub>2</sub>O

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

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

Protap pemeriksaan glukosa, protein dan urea menggunakan spektrofotometri :

	<b>GLUKOSA</b>	<b>PROTEIN</b>	<b>UREA</b>
volume reagensia kit	1000µl reagensia glukosa	1000µl reagensia	1000µl reagensia <b>A</b> , inkubasi pertama 1000µl reagensia <b>B</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 ** <b>2X**</b>
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  $\lambda$  : 500-700 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standard dan sampel

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 :

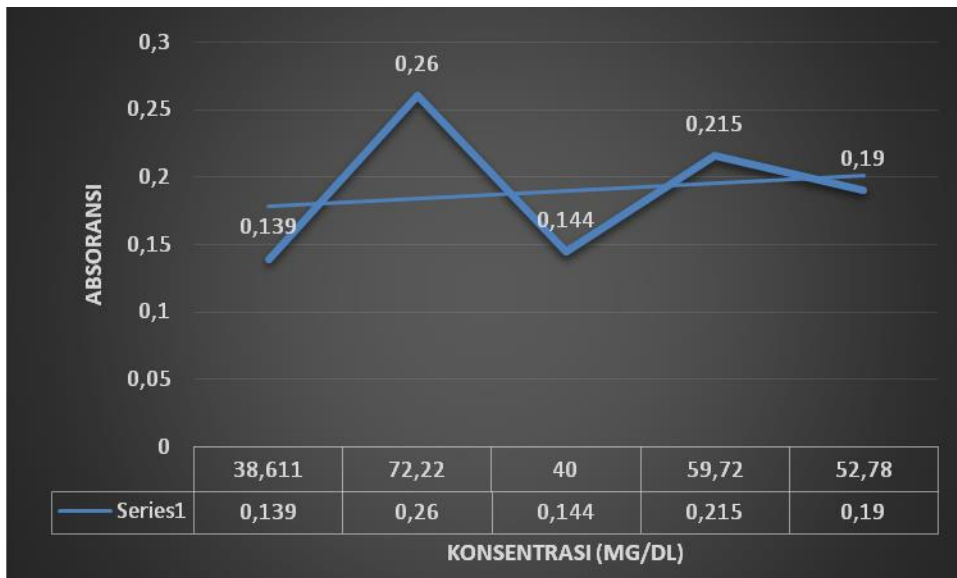
**Tabel1a : Urea – data kalibrasilarutan standar urea**

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 kalibrasilarutan standar urea



### Pembahasan :

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

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.

Untuk mengetahui apakah suatu unsur memenuhi Hukum Beer atau tidak maka perlu ditentukan grafik kalibrasi absorbansi vs konsentrasi.

Hukum Beer hanya dapat dipenuhi jika dalam range (cakupan) konsentrasi hasil kalibrasi berupa garis lurus, jadi kita hanya bekerja pada linear range. Seringkali sampel yang dianalisa akan memiliki absorbansi yang lebih tinggi dari pada larutan standar. Jika kita berasumsi bahwa kalibrasi tetap linier pada konsentrasi yang lebih tinggi.

Hukum Beer menyatakan absorbansi cahaya berbanding lurus dengan dengan konsentrasi dan ketebalan bahan/medium. Semakin pekat konsentrasi sebuah senyawa maka semakin banyak cahaya yang akan diserap.

$$A = \epsilon c l$$

Dari teori diatas dapat kita simpulkan bahwa :

- Larutan standar urea diatas tidak memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi tidak berupa garis lurus.
- Ketidaksesuaian 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.
- Dalam pembuatan sebuah larutan, harus dilakuka secara teliti dan berhati-hati agar hasil konsentrasi yang diinginkan bisa sesuai dengan konsentrasi yang didapat. Kesesuaian konsentrasi ini dapat dibuktikan dengan spektrofotometri.
- Pada larutan standar urea diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dan larutan yang diprediksi. Hal ini disebabkan oleh beberapa factor seperti kesalahan dalam perhitungan pancairan, kesalahan dalam mencampurkan larutan standar dengan reagen dari kit juga tidak meratanya pengadukan larutan sehingga belum 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 H<sub>2</sub>O

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

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

2. Siapkan 90 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H<sub>2</sub>O

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

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

3. Siapkan 100 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H<sub>2</sub>O

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

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

4. Siapkan 110 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H<sub>2</sub>O

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

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

5. Siapkan 120 mg/dl standard glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H<sub>2</sub>O

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

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

**Persiapan panjang gelombang max :**

**Glukosa :**

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

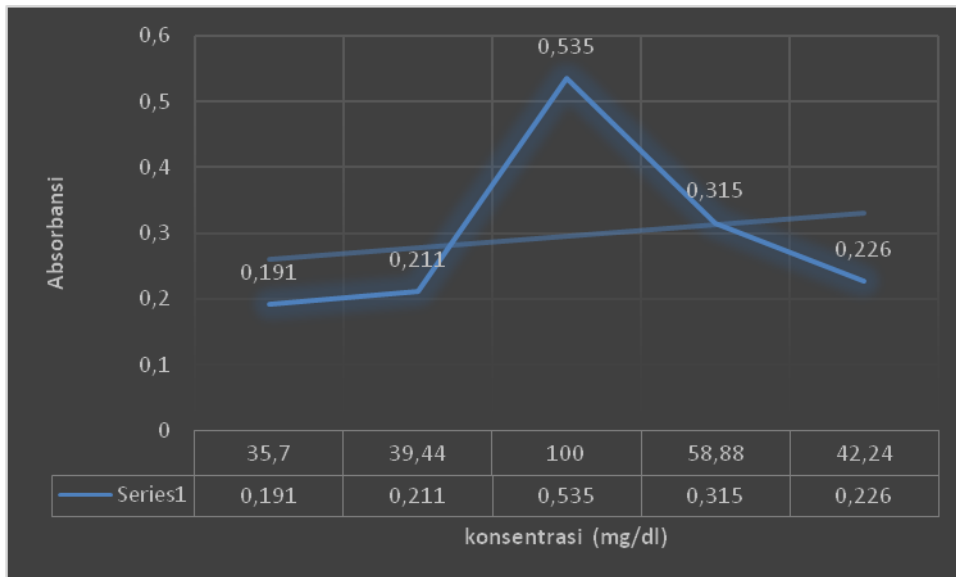
Didapatkan panjang gelombang maksimal menggunakan larutan standar glukosa 100 ml yaitu  $\lambda = 479,0 \text{ nm}$

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	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 :

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

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.

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

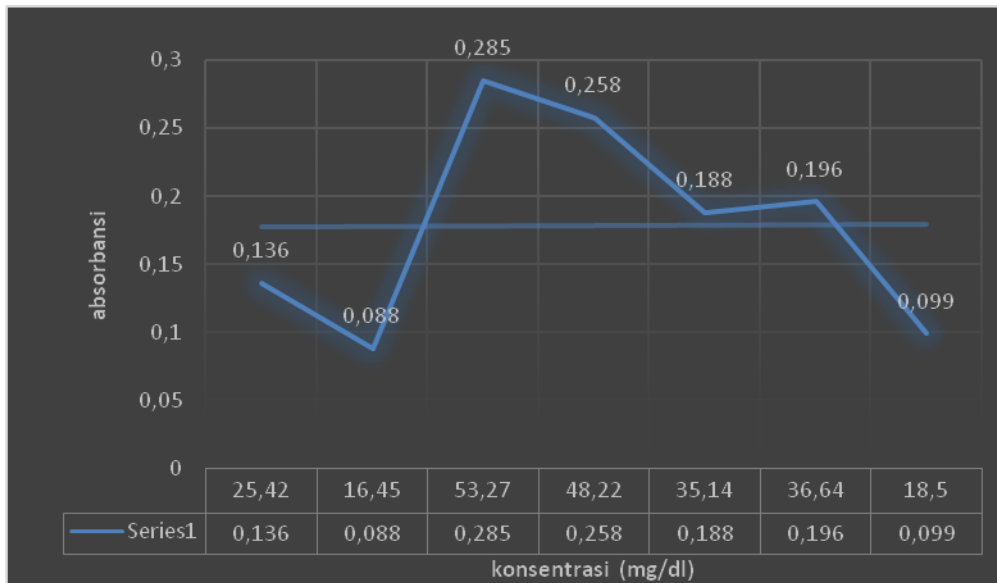
dengan absorbansi. Seharusnya ketika konsentrasi sebuah larutan semakin besar maka absorbansinya juga akan semakin besar.

**Kesimpulan** ;

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

<b>Faktor</b>	<b>Konsentrasi yang diprediksi (mg/dl)</b>	<b>Absorbansi</b>	<b>Konsentrasi yang didapat (mg/dl)</b>
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 douledilution**



**Pembahasan :**

Pada 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. Volume larutan glukosa yang dibutuhkan sangat sedikit yaitu 10  $\mu$ 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.

**Kesimpulan :**

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

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

n		(mg/dl)		(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  
Glukosa desimal dilution**



**Pembahasan :**

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

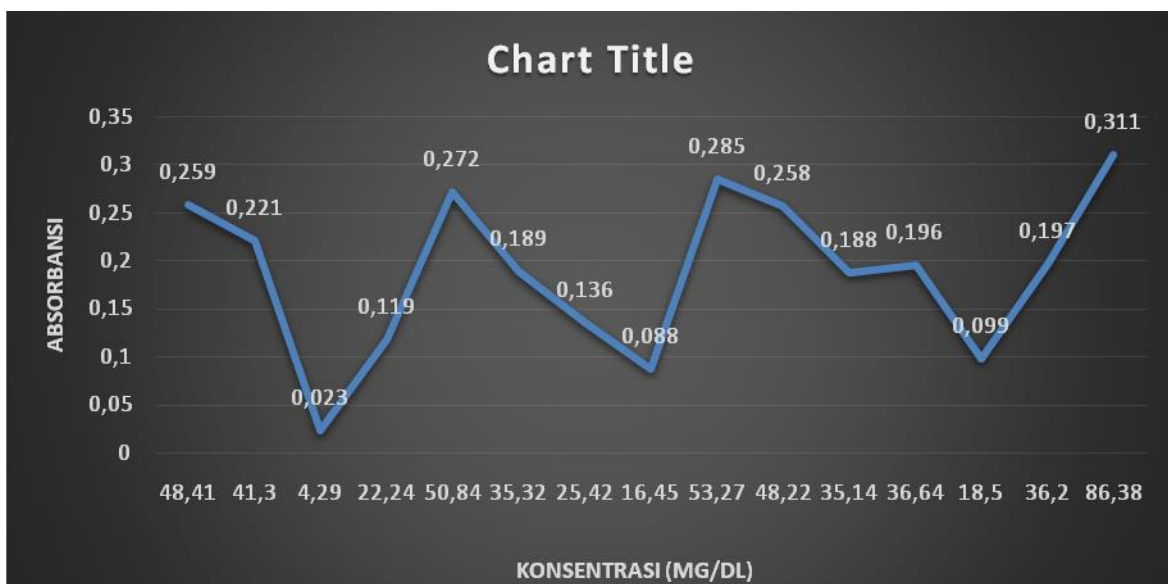
Pemeriksaan Sampel serum plasma	Absorbansi pada grafik kalibrasi	Konsentrasi pada grafik kalibrasi	Absorbansi pada rumus reagensia	Konsentrasi pada reagensia

			<b>test kit</b>	<b>test kit</b>
<b>Glukosa ( kirana)</b>	0,197	36,82 mg/dl	0,225	90,36 mg/dl
<b>Urea ( yunita)</b>	0,311	86,38 mg/dl	0,167	127,23 mg/dl

<b>Pemeriksaan Sampel pengenceran Glukosa</b>	<b>Absorbansi pada grafik kalibrasi</b>	<b>Konsentrasi pada grafik kalibrasi</b>	<b>Absorbansi pada rumus reagensia test kit</b>	<b>Konsentrasi pada reagensia test kit</b>
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 :**

Menghitung konsentrasi sampel glukosa dengan grafik kalibrasi menggunakan panjang gelombang maksimal larutan 100mg/dl yaitu  $\lambda = 479,0$  nm sedangkan dengan rumus reagensia pada test kit menggunakan panjang gelombang  $\lambda = 500$  nm. Untuk Menghitung konsentrasi sampel urea dengan grafik kalibrasi menggunakan panjang gelombang maksimal larutan 40 mg/dl yaitu  $\lambda = 689,5$  nm sedangkan dengan rumus reagensia pada test kit menggunakan panjang gelombang  $\lambda = 600$  nm. Rumus yang digunakan yaitu

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

Dimana : C = konsentrasi larutan

A = Absorbansi

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

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 yang diperoleh

memiliki range yang kecil. 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** :

**Tabel 5 Hasil pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea plasma mahasiswa**

detil <sup>2</sup> mhs (berapa lama sejak makan; rata-rata apa yg dimakan; jenis kelamin; umur)	GLUKOSA		TRIGLISERIDA		UREA	
	A	kadar	A	kadar	A	kadar
<b>1. Yunita Wannur azah</b> Jenis kelamin : perempuan Usia : 28 tahun Makanan : makan ifumie Waktu : 1jam sebelum pemeriksaan	-	-	<b>0,313</b>	<b>82,37</b>	<b>0,311</b>	<b>236,95</b>
<b>2. Kirana patrolina</b> Jenis kelamin : perempuan	<b>0,197</b>	<b>79,11</b>	<b>0,241</b>	<b>63,42</b>	-	-

Usia : 32 tahun						
Makanan : makan nasi putih dengan ikan teri sambal+susu anlene						
Waktu : 3 jam sebelum pemeriksaan						

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.

## **GLUKOSA**

Dari data diatas kadar glukosa Kirana Patrolina 79,11 mg/dl. Hal ini mih 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  $\alpha$  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 setalah 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.

Sehingga untuk mencapai hati tempat glukosa berubah menjadi glukogen diperlukan waktu yang lebih lama. Makanan dari lambung harus melewati usus lalu dialirkan oleh darah ke hati. Selain itu kadar glukosa dipengaruhi oleh pola makan dan perbedaan aktivitas mahasiswa tersebut dalam kesehariannya. Kesalahan lain yang mungkin menyebabkan perbedaan ini adalah proses pembuatan larutan kedalam kuvet dan juga homogenisasi larutan.

## **TRIGLISERIDA**

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 236, 95 mg/dl. Dari data nilai ini bisa dikatakan terlalu tinggi ataupun tidak normal. Dataa 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<sub>2</sub> , air dan energi. Tapi amonia merupakan racun bagi sel-sel , sehingga harus dikeluarkan dari tubuh . Seorang dewasa biasanya mengeluarkannya sekitar 25 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.