

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

---

**NAMA** : RAHMIWITA (157008005)  
BINAYANTI NAINGGOLAN (157008008)

**Tanggal Praktikum** : 14 April 2016

**Tujuan Praktikum**

1. Mampu memahami prinsip-prinsip dasar mengenai teknik spektrofotometri (yaitu prinsip dasar alatnya, kuvet, standard, blanko, serta Hukum Beer-Lambert dll)
2. Latihan pembuatan dan penggunaan larutan stok
3. Kumpulkan data kadar glukosa, urea, dan protein darah
4. Latihan pembuatan dan interpretasi grafik
5. Persiapan untuk praktikum metabolisme II “ di mana akan mendesain dan melakukan percobaan yang berdasarkan teknik-teknik praktikum ini

**Cara Kerja:**

**Alat dan Bahan**

<b>Tourniquet</b>	<b>Swab alkohol</b>	<b>Tempat pembuangan yang tajam</b>
<b>Jarum</b>	EDTA	Tempat pembuangan yang kena darah
<b>Piper Morh: (1ml &amp; 5ml)</b>	Urea	Kit pemeriksaan urea
<b>Alat sentrifus klinik</b>	Glukosa	Kit pemeriksaan glukosa
<b>Alat spektrofotometer</b>	Kuvet	Kit pemeriksaan protein
<b>Waterbath 37°C</b>	Tabung reaksi dan rak	Pipet otomatis 10µl - 100µl
<b>Pipet tetes</b>	Kuvet plastik	Alat spektrofotometer

## Persiapan Larutan Stok

### ❖ Larutan stok urea:

Siapkan 10ml larutan urea pada kadar 1,0 g/L (100mg/dL), maka jumlah bubuk urea yang dibutuhkan: 0,01gr.

### ❖ Larutan stok glukosa

Siapkan 50ml larutan glukosa 1,5 g/L (150 mg/dL), maka jumlah bubuk glukosa yang dibutuhkan: 0,015 gr.

## Pengenceran untuk kurva kalibrasi (*Standard Curve*) dari larutan stok tersebut:

### ➤ Urea

1. Siapkan 2ml larutan urea sebagai larutan stok
2. Ambilkan 1ml larutan stok ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
3. Ambilkan 1m larutan dari tabung 2 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
4. Ambilkan 1m larutan dari tabung 3 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
5. Ambilkan 1m larutan dari tabung 4 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
6. Ambilkan 1m larutan dari tabung 5 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
7. Ambilkan 1m larutan dari tabung 6 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
8. Ambilkan 1m larutan dari tabung 7 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O

### ➤ Glukosa

1. Siapkan 2ml larutan glukosa sebagai larutan stok
2. Ambilkan 1ml larutan stok ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
3. Ambilkan 1m larutan dari tabung 2 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
4. Ambilkan 1m larutan dari tabung 3 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
5. Ambilkan 1m larutan dari tabung 4 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
6. Ambilkan 1m larutan dari tabung 5 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
7. Ambilkan 1m larutan dari tabung 6 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O
8. Ambilkan 1m larutan dari tabung 7 ditambah 1ml H<sub>2</sub>O

### ➤ Protein

Pada pemeriksaan protein plasma tidak menggunakan kurva kalibrasi, hanya menggunakan larutan standard yang terdapat di dalam Protein Test Kit.

Protap pemeriksaan glukosa, urea, dan protein menggunakan spektrofotometri:

	Glukosa	Protein	Urea
<b>Volume reagensia kit</b>	1000 $\mu$ l reagensia glukosa	1000 $\mu$ l reagensia	1000 $\mu$ l reagensia A, inkubasi pertama 1000 $\mu$ l reagensia B
<b>Volume sampel atau standard</b>	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<b>Konsentrasi standard</b>	100mg/dl	200mg/dl	40mg/dl
<b>Periode dan temperature inkubasi</b>	10 min @ 37°C	10 min @ 37°C	5 min @ 25°C** 2X**
<b>Periksa pada <math>\lambda</math>=</b>	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.



Gambar 1: 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 spektrometri yaitu  $\lambda = 645 \text{ nm}$ .
- Menghitung konsentrasi yang pengukuran absorbansi sampel dengan pembanding absorbansi standar urea kit (diketahui konsentrasi = 80 mg/dl)

$$C. \text{Sampel Urea} = \frac{A. \text{Sampel}}{A. \text{Standard}} \times 80 \text{ mg/dl}$$

- Kuvet hasil pengenceran setelah ditambah kit urea (sesuai prosedur)

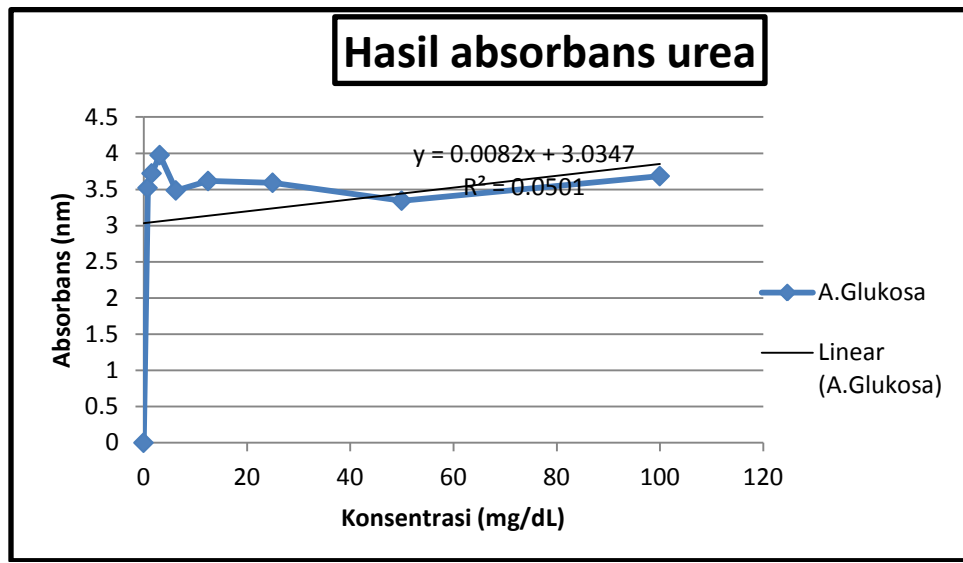


Gambar 2 : Kuvet urea dari blanko, standar, factor 2 sampai 128 dan sampel

- Dengan menggunakan panjang gelombang di atas dilakukan pemeriksaan absorbansi pada setiap larutan standar urea yang telah dibuat. Data yang diperoleh dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

**Tabel 1. Data Hasil Kalibrasi Urea**

	Konsentrasi	Hasil
Stok	100	3,684
Faktor 2	50	3,345
Faktor 4	25	3,592
Faktor 8	12.500	3,616
Faktor 16	6.250	3,486
Faktor 32	3.125	3,974
Faktor 64	1.563	3,721
Faktor 128	0.781	3,521
Blanko	0	0



Grafik 1. Hasil absorbansi urea

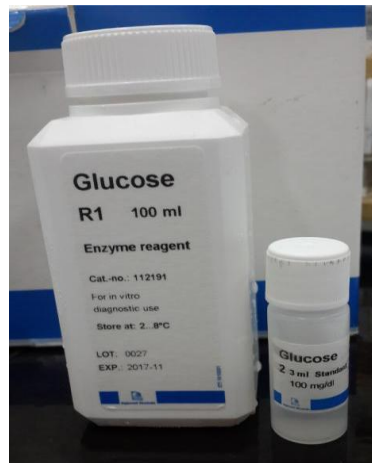
Kesimpulan:

- a. Tingkat keakuratan (deviasi 'R') yang terukur 0,0501. Hal ini menunjukkan bahwa pada saat pembuatan pengenceran larutan urea konsentrasinya kurang tepat, pengukuran volume reagenya pada saat pembuatan larutan kurang tepat, reagen terkontaminasi, kesalahan pada saat memasukkan larutan dengan pipet otomatis karena volume yang dibutuhkan sangat kecil, kemungkinan pada saat memasukkan ke dalam tabung reaksi larutan urea tidak seluruhnya bercampur dengan reagen tetapi lebih banyak menempel di dinding tabung, pengaruh lamanya larutan urea diperiksa di spektrofotometer sehingga warnanya menjadi terlalu pekat, atau juga kesalahan pengkalibrasian spektrofotometer.
- b. Pada percobaan kedua grup meja menunjukkan adanya ketidaksesuaian dengan hukum *Beer-Lambert* ( $A = \epsilon dc$ ), terlihat pada beberapa titik konsentrasi tidak berbanding lurus dengan A dan tidak membentuk garis liner. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi urea yang digunakan cukup tinggi, absorbansi yang dihasilkan terlalu panjang. Seharusnya urea tersebut diencerkan lagi, agar hasilnya lebih akurat/dapat dipercaya.
- c. Pada saat dibuat persamaan linear, hasil percobaan dengan  $y = 0,0082x +$

3,0347 Dalam hal ini diperlukan ketelitian praktikan dalam melakukan pengenceran.

### ❖ Glukosa

- Untuk melakukan pemeriksaan absorbansi glukosa menggunakan spektrofotometri harus dibuat terlebih dahulu larutan blanko dan larutan standar glukosa berdasarkan petunjuknya pada kit glukosa



Gambar 3: kit Glukosa

- Siapkan 100 mg/dl standard urea dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan  $\lambda$  : 400-600 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standar dan sampel
- Didapatkan panjang gelombang maksimal larutan standar urea 40ml menggunakan spektrometri yaitu  $\lambda = 510 \text{ nm}$ .
- Menghitung konsentrasi yang pengukuran absorbansi sampel dengan pembandingan absorbansi standar urea kit (diketahui konsentrasi = 100 mg/dl)

$$C \text{ Sampel Glukosa} = \frac{A. \text{ Sampel}}{A. \text{ Standard}} \times 100 \text{ mg/dl}$$

- Kuvet hasil pengenceran glukosa setelah ditambahkan kit (sesuai prosedur)

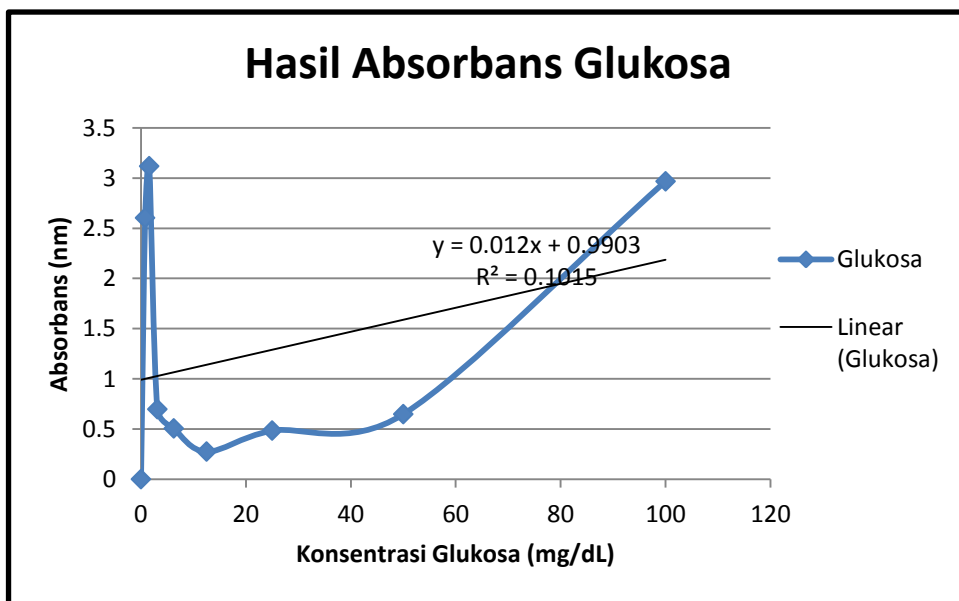


Gambar 4 : Kuvet urea dari blanko, standar, factor 2 sampai 128 dan sampel

- Dengan menggunakan panjang gelombang di atas dilakukan pemeriksaan absorbansi pada setiap larutan standar urea yang telah dibuat. Data yang diperoleh dapat dilihat pada tabel di bawah ini

**Tabel 2. Data Hasil Kalibrasi Glukosa**

	Konsentrasi	Hasil Absorbansi
Stok	100	2,967
Faktor 2	50	0,6478
Faktor 4	25	0,4841
Faktor 8	12.500	0,2751
Faktor 16	6.250	0,5055
Faktor 32	3.125	0,697
Faktor 64	1.563	3,118
Faktor 128	0.781	2,603
Blanko	0	0



Grafik 2 : Hasil absorbansi glukosa dengan spektrofotometri

Kesimpulan:

- Pada percobaan ini menunjukkan adanya ketidaksesuaian dengan hukum *Beer-Lambert* ( $A = \epsilon dc$ ), terlihat pada kebanyakan titik dimana konsentrasi tidak berbanding lurus dengan A, kemungkinan kesalahan pada saat membuat pengenceran glukosa yang tidak sesuai dengan konsentrasi yang diharapkan.
- Hasil menunjukkan penyimpangan yang cukup besar (tidak membentuk garis linear), hasil ini tidak dapat membuktikan Hukum *Beer-Lambert* :  $A = \epsilon dc$ , dimana absorbansi tidak berbanding lurus dengan konsentrasi, menunjukkan hasil pengenceran tidak sesuai dengan konsentrasi yang diharapkan.
- Tingkat keakuratan (deviasi 'R') yang terukur 0,1015 dan  $y = 0,012x + 0,9903$ . Hal ini menunjukkan bahwa pada saat pembuatan pengenceran larutan glukosa konsentrasinya tidak cukup tepat, pengukuran volume reagenya tidak tepat pada saat pembuatan larutan, kurang teliti pada saat memasukkan larutan glukosa dengan pipet otomatis karena volume yang dibutuhkan sangat kecil, kemungkinan pada saat memasukkan ke dalam tabung reaksi larutan tidak seluruhnya bercampur dengan reagen, tetapi lebih banyak menempel di dinding tabung atau terdapat kesalahan pengkalibrasian spektrofotometer.

❖ **Pemeriksaan glukosa, Protein, dan urea plasma praktikan**

Tabel 3 : Pemeriksaan glukosa, Protein, dan urea plasma praktikan

No	Detail 2 Mhs (berapa lama sejak makan, rata2 apa yg)	Glukosa		Protein		Urea	
		A	Kadar(mg/d)	A	Kadar(mg/d)	A	Kadar(mg/d)
1	Binayanti Menu : nasi + telur + susu Makan 1 jam sblm sampel	0,3842	41,8472	0,2706	5,7233	0,3842	8,6604
2	Rahmi Menu: Nasi campur + Ayam goreng + perkedel + air putih 1 jam sblm sampel diambil	0,3767	98,0478	0,2057	4,3506	0,3683	8,6934

**Kesimpulan :**

**Glukosa**

Bila diperhatikan pada tabel di atas untuk kelompok 1 dan 2 pada umumnya darah sampel diambil 1 jam setelah makan akan tetapi keseluruhan kelompok memiliki hasil yang bervariasi. Hal ini mungkin dipengaruhi oleh jumlah kalori makanan yang dikonsumsi bervariasi ataupun faktor metabolisme yang berbeda karena perbedaan jenis kelamin. Pada saat 1 jam sebelum makan kadar sampel glukosa tidak meningkat tinggi karena fungsi dari hormon insulin yang menstimulasi absorpsi glukosa di jaringan perifer dan mengaktifkan sintesis glikogen dan lipid.

**Protein**

Kadar protein praktikan masih dalam ambang normal dengan pengambilan sampel 1 jam setelah makan. Protein dalam sampel yang dicampur dengan reagent akan membentuk kompleks berwarna biru-ungu dengan ion tembaga pada larutan alkali. Absorbansi warnanya proporsional dengan konsentrasi.

**Urea**

Pada hasil pemeriksaan menunjukkan hasil yang batas normal, hal ini dipengaruhi oleh jumlah protein yang dikonsumsi oleh setiap orang berbeda-beda

**Kesimpulan :**

Hasil perhitungan kadar sampel yang diperoleh dari rumus grafik bila dibandingkan dengan hasil pengukuran sampel dengan rumus kit menunjukkan hasil yang jauh berbeda, karena nilai 'R' yang dipakai sesuai dengan hasil praktikan. Hal ini mungkin disebabkan oleh pengenceran glukosa dan urea yang tidak tepat, sehingga rumus tersebut tidak valid untuk digunakan mengukur kadar sampel

**Saran**

1. Tolong disiapkan tong sampah yang medis dan non medis
2. Perlu dipersiapkan juga handscoon untuk menjaga higienitas dalam pengambilan sampel darah