

LAPORAN PRAKTIKUM 04

METABOLISME & SPEKTROFOTOMETRI

Nama : Ayu elvana & Jekson Martiar Siahaan

Tanggal praktikum : 11 Oktober 2012

Kelompok : Siang (12.00-15.00)

Tujuan Praktikum :

- Mahasiswa memahami cara penggunaan spektrofotometri dan prinsip dasar-dasar tehnik dari spektrofotometri dan membuktikan kebenaran Hukum Beer-Lambert
- Melakukan pengenceran dengan decimal delution dan doubling delution
- Melakukan pembuatan larutan stok glukosa
- Melakukan pembuatan grafik dan interpretasinya dari data yang diperoleh
- Melakukan pemeriksaan kadar glukosa darah, urea, dan trigliserida dengan metode Spektrofotometri
- ✚ Melakukan persiapan untuk praktikum Metabolisme II” di mana mahasiswa akan mendesain dan melakukan percobaan yang berdasarkan teknik-teknik pratikum ini

Alat Dan Bahan :

Alat	Bahan
Pipet Mohr	kit pemeriksaan glukosa
pipet otomatis 10-100µl	kit pemeriksaan urea
sentrifuse	kit pemeriksaan trigliserida
waterbath suhu 37°C	glukosa
tabung reaksi dan rak	urea
cuvette	
spektrofotometer	

Cara Kerja :

1. Persiapan Larutan Stok

Jumlah bubuk glukosa yang dibutuhkan untuk membuat larutan stok adalah = 0,18 gr

2. Pengenceran

a. Doubling dilution :

1. Sediakan 8 tabung reaksi, beri tanda 1 s/d 8. Tambahkan 1 ml akudes masing-masing pada tabung reaksi 2 s/d 8.
2. Pada tabung reaksi 1 tambah 2 ml larutan stok.
3. Pada tabung reaksi 2 tambah 1 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 1. Campur dengan baik.
4. Pada tabung reaksi 3 tambah 1 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 2. Campur dengan baik.
5. Buat pengenceran larutan stok selanjutnya dengan cara yang sama (yaitu 1 ml larutan dari tabung reaksi sebelumnya ditambahkan ke tabung reaksi yang selanjutnya) sampai pengenceran pada tabung reaksi ke 8

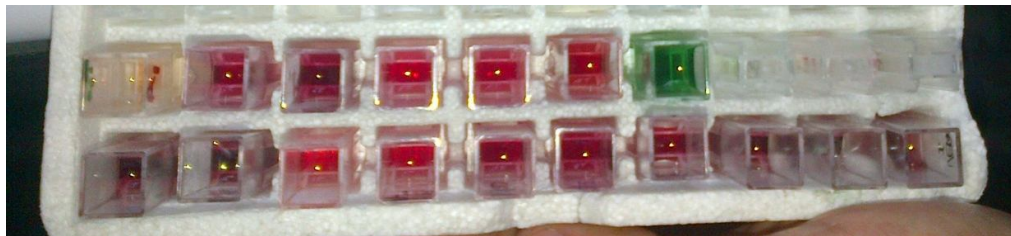
b. Decimal dilution

1. Sediakan 6 tabung reaksi
2. Tabung 1 = 2 ml larutan glukosa (stok)
3. Tabung 2 = 0,67 ml larutan (tabung 1) + 1,33 ml aquadest
4. Tabung 3 = 0,2 ml larutan (dari tabung 1) + 1,8 ml aquadest
5. Tabung 4 = 0,67 ml larutan (tabung 2) + 1,33 ml aquadest
6. Tabung 5 = 0,2 ml larutan (dari tabung 3) + 1,8 ml aquadest
7. Tabung 6 = 0,67 ml larutan (tabung 4) + 1,33 ml aquadest

3. Pemeriksaan Glukosa, Trigliserida dan Urea

1. 1 ml darah diambil ke dalam wadah yang berisi EDTA. Menggunakan alat sentrifugasi klinik untuk memisahkan sel-sel darah dari plasma. Diharap dapat $\pm$ 500 μ l plasma tapi hanya 10 μ l dibutuhkan untuk pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea masing-masing.
2. Pemeriksaan terhadap glukosa, trigliserida serta urea berdasar reaksi enzim (lihat lampiran-lampiran). Perhatikanlah bahwa waktu pada reaksi enzim dicatat dan diikuti dengan benar – kalau sampel-sampel tidak diperlakukan secara sama, hasilnya pasti kurang bagus.
3. Oleh karena periode reaksi harus diatur dengan baik, kerjakan setiap bagian satu per satu (yaitu inkubasi untuk sampel-sampel pengenceran *doubling* dan *decimal*, maupun pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea).

4. Bahan (reagensia kit serta standar) untuk pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea disediakan di tempat tertentu di Lab Terpadu. Bawalah tabung reaksi dengan rak tabungnya ke tempat pemeriksaan untuk mengambil reagensia yang dibutuhkan.
5. Kemudian masukkan masing-masing tabung reaksi ke dalam cuvette, hidupkan alat spektrofotometri dan atur panjang gelombang (glukosa: 500nm, trigliserida 530nm, urea 600nm), set absorbance pada angka 0
6. Masukkan cuvette yang berisi larutan blank ke sample holder pada spektrofotometri, set transmisi %T pada 100
7. Masukkan cuvette larutan standart : catat hasil As: Absorbance standart
8. Masukkan cuvette larutan sample : catat hasil Au : Absorbance zat yang diukur
9. Begitu juga untuk pemeriksaan doubling dilution & decimal dilution sebelumnya masukkan blank dan standart glukosa



Gambar 1. Cuvette yang akan di masukkan ke dalam spektrofotometer

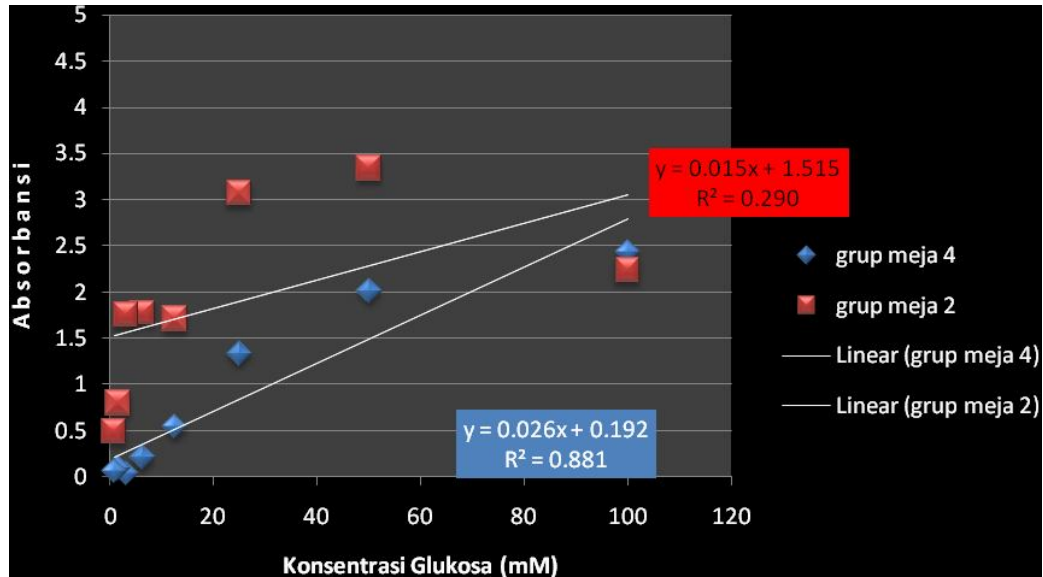
Hasil Praktikum dan Kesimpulan :

1. Glukosa

Konsentrasi stok glukosa = 100 mg/ dL

Tabel 1a. Data untuk kalibrasi *doubling dilution* glukosa

faktor	konsentrasi	grup meja 4	grup meja 2
1	100	2.434	2.237
2	50	2.013	3.338
4	25	1.336	3.073
8	12.50	0.546	1.710
16	6.25	0.210	1.778
32	3.125	0.037	1.758
64	1.563	0.095	0.799
128	0.781	0.063	0.494
blanko	0	0	0



Gambar 2. Grafik 1a Hasil kalibrasi *doubling dilution* glukosa

Kesimpulan :

1. Persamaan regresi dari pengenceran glukosa grup meja 2 adalah :

$$Y = 0,015x + 1,515$$

$$R^2 = 0,290$$

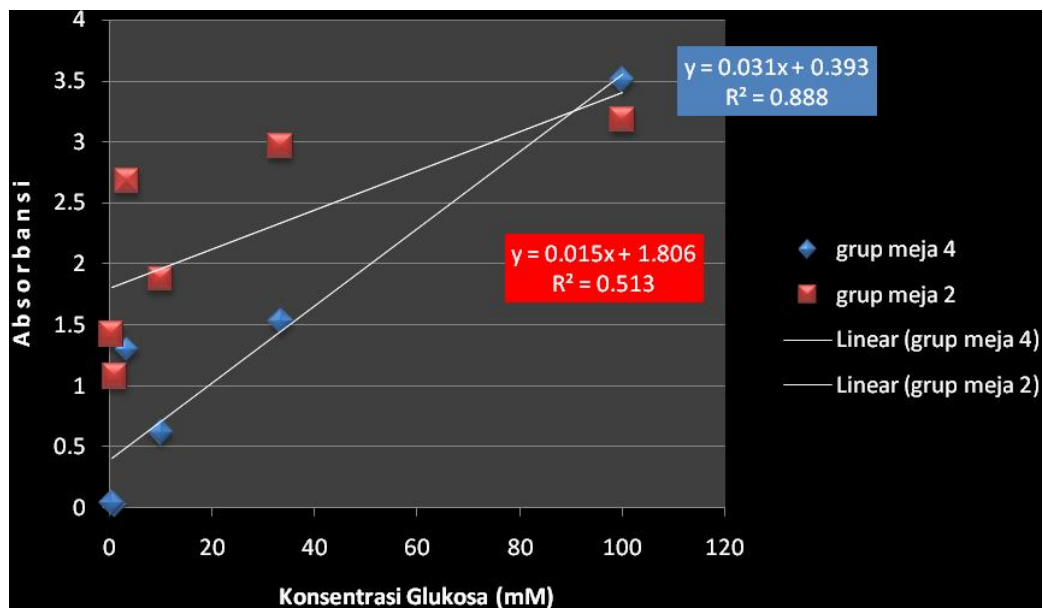
Persamaan regresi dari pengenceran glukosa grup meja 4 adalah :

$$Y = 0,026x + 0,192$$

$$R^2 = 0,881$$
2. Dari grafik diatas diketahui persamaan regresi dari pengenceran glukosa meja 4 memiliki nilai confidence yang lebih tinggi ($R^2 = 0,881$) dibandingkan dengan hasil grup meja 2 yang memiliki nilai confidence ($R^2 = 0,290$). Jadi bisa disimpulkan bahwa grup meja 4 lebih baik tingkat kepercayaan hasil praktikumnya karna mendekati 1.
3. Hasil pemeriksaan Absorban berbagai konsentrasi pengenceran glukosa (*doubling dilution*) pada grup meja 2 menunjukkan adanya ketidaksesuaian dengan hukum Beer-Lambert $A = \epsilon dc$, terlihat pada tidak adanya titik yang linear.

Tabel 1b. Data untuk kalibrasi *decimal dilution* glukosa

Faktor	konsentrasi	grup meja 4	grup meja 2
1	100	3.512	3.183
3	33.33	1.532	2.963
10	10	0.624	1.878
30	3.333	1.300	2.678
100	1	0.025	1.076
300	0.333	0.043	1.423
Blanko	0	0	0



Gambar 3. Grafik 1b Hasil kalibrasi *decimal dilution* glukosa

Kesimpulan :

1. Persamaan regresi dari pengenceran glukosa grup meja 2 adalah :

$$Y = 0,015x + 1,806$$

$$R^2 = 0,513$$

- Persamaan regresi dari pengenceran glukosa grup meja 4 adalah :

$$Y = 0,031x + 0,393$$

$$R^2 = 0,888$$

2. Dari grafik diatas diketahui persamaan regresi dari pengenceran glukosa meja 4 memiliki nilai confidence yang lebih tinggi ($R^2 = 0,888$) dibandingkan dengan hasil grup meja 2

yang memiliki nilai confidence ($R^2 = 0,513$). Jadi bisa disimpulkan bahwa grup meja 4 lebih baik tingkat kepercayaan hasil praktikumnya karna mendekati 1.

3. Hasil pemeriksaan Absorban decimal dilution pada grup ini juga menunjukkan adanya ketidaksesuaian dengan hukum Beer-Lambert $A = \epsilon dc$, terlihat pada beberapa titik yang linear. Pada grup meja 2 tidak ada titik yang linear, sedangkan pada grup meja 4 ada satu titik saja yang linear. Hal ini dikarenakan beberapa faktor kesalahan pada saat praktikum.

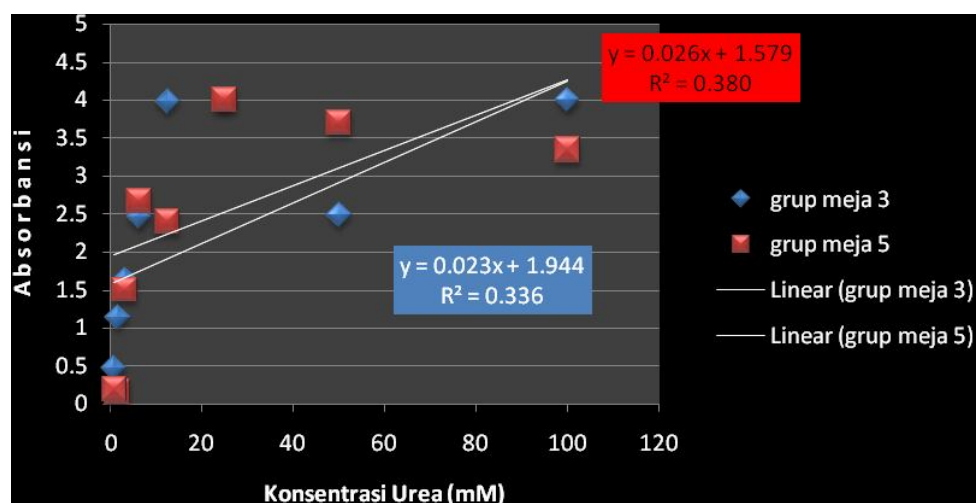
2. Urea

A. Urea_Data untuk kalibrasi *doubling dilution*

Konsentrasi stok urea = 100 mg/ dL

Tabel 2a. Data untuk kalibrasi *doubling dilution*

Faktor	Konsentrasi	Grup meja 3	Grup meja 5
1	100	4.000	3.340
2	50	2.489	3.698
4	25	4.000	4.000
8	12.50	3.980	2.393
16	6.25	2.463	2.666
32	3.125	1.632	1.502
64	1.563	1.141	0.159
128	0.781	0.476	0.194
Blanko	0	0	0



Gambar 4. Grafik 2a Hasil kalibrasi *doubling dilution* urea

Kesimpulan :

1. Persamaan regresi dari pengenceran glukosa grup meja 3 adalah :

$$Y = 0,023x + 1,944$$

$$R^2 = 0,336$$

- Persamaan regresi dari pengenceran glukosa grup meja 5 adalah :

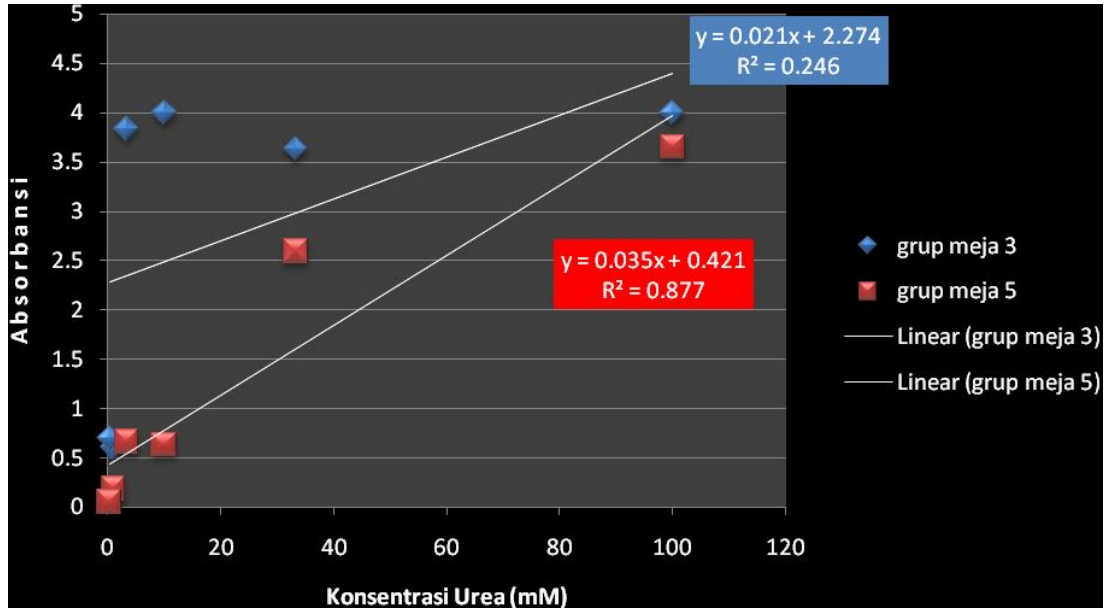
$$Y = 0,026x + 1,579$$

$$R^2 = 0,380$$

2. Dari grafik diatas diketahui persamaan regresi dari pengenceran glukosa meja 5 memiliki nilai confidence yang lebih tinggi ($R^2 = 0,380$) dibandingkan dengan hasil grup meja 3 yang memiliki nilai confidence ($R^2 = 0,290$). Jadi bisa disimpulkan bahwa kedua grup ini memiliki tingkat kepercayaan yang rendah.
3. Hasil pemeriksaan Absorban doubling dilution urea pada grup ini juga menunjukkan adanya ketidaksesuaian dengan hukum Beer-Lambert $A = \epsilon dc$, hal ini terlihat pada tidak adanya titik yang linear, terlihat pada grafik di atas.

Tabel 2b. Data untuk kalibrasi *decimal dilution* Urea

Faktor	Konsentrasi	Grup meja 3	Grup meja 5
1	100	4,000	3,652
3	33,33	3,6325	2,591
10	10	4,000	0,634
30	3,333	3,839	0,662
100	1	0,612	0,184
300	0,333	0,702	0,053
blanko	0	0	0



Gambar 5. Grafik 2b Hasil kalibrasi *decimal dilution* urea

Kesimpulan :

- Persamaan regresi dari pengenceran glukosa grup meja 3 adalah :

$$Y = 0,021x + 2,274$$

$$R^2 = 0,246$$

 Persamaan regresi dari pengenceran glukosa grup meja 5 adalah :

$$Y = 0,035x + 0,421$$

$$R^2 = 0,877$$
- Dari grafik diatas diketahui persamaan regresi dari pengenceran glukosa meja 5 memiliki nilai confidence yang lebih tinggi ($R^2 = 0,877$) dibandingkan dengan hasil grup meja 3 yang memiliki nilai confidence ($R^2 = 0,246$). Jadi bisa disimpulkan bahwa grup meja 5 lebih baik tingkat kepercayaan hasil praktikumnya karna mendekati 1.
- Hasil pemeriksaan Absorban decimal dilution pada grup ini juga menunjukkan adanya ketidaksesuaian dengan hukum Beer-Lambert $A = \epsilon dc$, terlihat pada beberapa titik yang linear. Pada grup meja 3 tidak ada titik yang linear, sedangkan pada grup meja 5 ada satu titik saja yang linear. Hal ini dikarenakan beberapa faktor kesalahan pada saat praktikum. Pada saat melakukan pengenceran maupun inkubasi bahan.

Pemeriksaan Glukosa, Trigliserida Dan Urea Plasma Mahasiswa

Tabel 3. Konsentrasi glukosa dan urea dalam plasma yang dibaca pada grafik 1a s/d 2b, serta yang dihitung melalui rumus kit.

	Glukosa		Urea	
	Meja : 4 Mhs : rebecca	Meja : 2 Mhs : jekson	Meja : 3 Mhs : henny	Meja : 5 Mhs : sari
Serapan sampel	0.1663	0.3332	0.1314	0.2559
Dari grafik 1a/2a	-7.2183	-100.6680	-60.5993	-84.2658
Dari grafik 1b/2b	-12.5111	-71.7080	-108.1543	-11.7726
Dari rumus kit	67.4098	135.0630	14.0272	27.3178

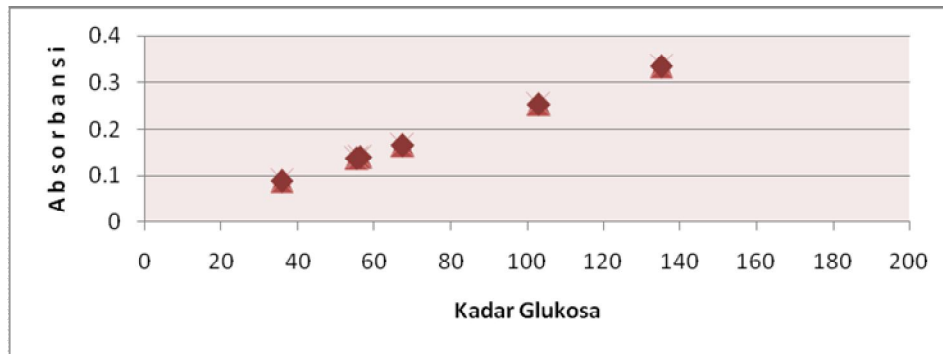
Kesimpulan :

Dari tabel di atas dapat disimpulkan bahwa hasil pemeriksaan glukosa dan urea baik pada meja 4, 2, 3 dan 5 tidak sesuai dengan rumus kit dan hasil yang didapat sangat jauh perbedaan hasil perhitungannya. Hal ini disebabkan oleh faktor human error, ini terjadi kesalahan dalam melakukan pengenceran glukosa dan urea tidak tepat ataupun pada saat melakukan inkubasi, sehingga hasil yang diperoleh tidak valid. Persamaan regresi linear yang diperoleh dari perbandingan konsentrasi dan nilai absorbansi yang diperoleh pada proses pengenceran pada praktikum kali ini tidak dapat digunakan sebagai rumus standard untuk memprediksi konsentrasi sampel karena hasil yang diberikan jauh berbeda dengan konsentrasi berdasarkan absorbansi sampel dan rumus kit. Hal ini mungkin disebabkan karena variasi konsentrasi yang digunakan dalam percobaan sangat kecil sehingga semua rumus menunjukkan hasil negatif, ini berarti konsentrasinya lebih kecil dari blanko dan hal ini menunjukkan terdapatnya kesalahan pada proses kerja.

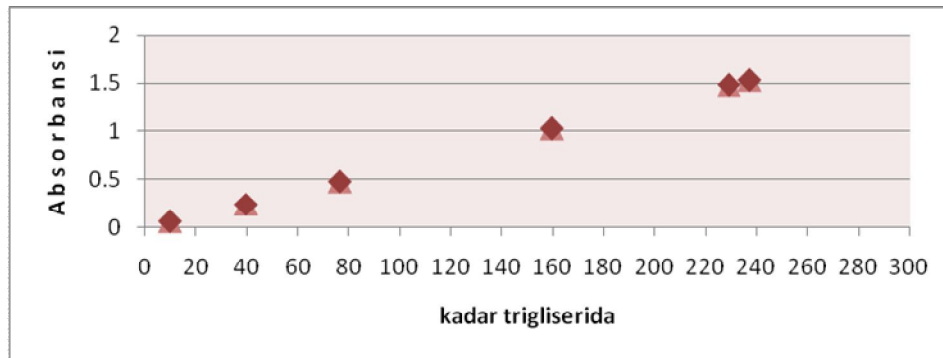
Tabel 4. Hasil Pemeriksaan Glukosa, Triglicerida Dan Urea Plasma Mahasiswa

Detail-detail Mahasiswa (berapa lama sejak makan, rata-rata apa yang dimakan, jenis kelamin, umur)	Glukosa		Triglicerida		Urea	
	A	Kadar (mg/dl)	A	Kadar (mg/dl)	A	Kadar (mg/dl)
Jekson (molen)	0.3332	135.06	1.5322	237.15	0.7163	15.29
Sari (±5 jam sebelum praktikum = nasi gurih komplit, ±1 jam sebelum praktikum = nasi putih, chicken wing, kentang goreng tabur keju)	0.0882	35.75	1.4772	228.93	0.2559	5.46
Henny (Mie goreng)	0.1393	56.46	1.0294	159.54	0.1314	2.80
Rebecca (±4 jam sebelum praktikum = nasi komplit, ±1 jam sebelum praktikum = 3 gorengan)	0.1663	67.40	0.0638	9.887	0.2654	5.66
Yulia (pagi = segelas susu herbal, pisang coklat)	0.2544	103.12	0.2486	39.55	0.1252	2.67
Frenky (nasi komplit + telur + bakwan + teh manis)	0.1368	55.45	0.4807	76.48	0.1368	2.92

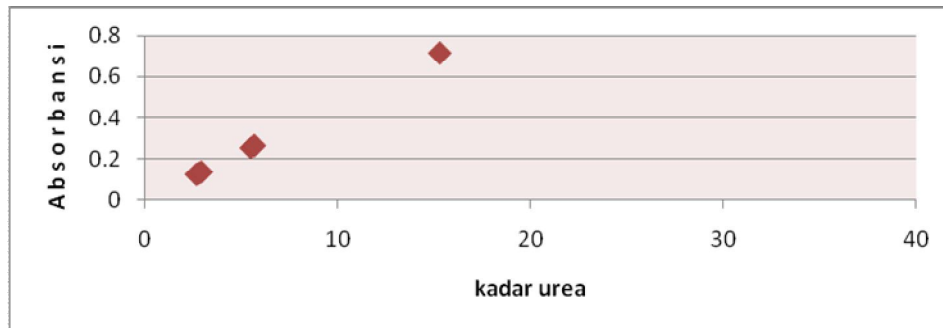
Glukosa plasma mahasiswa



Trigliserida plasma mahasiswa



Urea plasma mahasiswa



Gambar 6. Grafik pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea plasma mahasiswa

Kesimpulan grafik :

1. Diketahui absorbansi pada masing-masing mahasiswa berbeda, hal ini dapat disebabkan oleh adanya perbedaan jenis makanan yang dimakan, jarak waktu antara saat makan dengan saat pengambilan sampel dan jenis kelamin.
2. Hasil pemeriksaan glukosa berada pada kisaran konsentrasi 35,751 mg/dl - 135,060 mg/dl, pemeriksaan trigliserida berada pada kisaran 9,887 mg/dl – 237,150 mg/dl, pemeriksaan urea berada pada kisaran 2,673 mg/dl – 15,290 mg/dl.

3. Kadar glukosa yg paling rendah terdapat pada mahasiswi bernama sari yaitu 35,751 mg/dl. Kadar ini cukup rendah untuk cakupan makanan yg lumayan banyak dalam jumlah konsumsinya yaitu (± 5 jam sebelum praktikum = nasi goreng komplit, ± 1 jam sebelum praktikum = nasi putih, chicken wing, kentang goreng tabur keju) dibandingkan dengan jekson yang hanya mengkonsumsi beberapa molen ± 1 jam sebelum praktikum dan memiliki kadar glukosa yang tinggi yaitu sebesar 135,06 mg/dl, hal ini mungkin disebabkan oleh jarak waktu konsumsi makanan tersebut, 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. Sehingga kadar glukosa belum meningkat tajam. Atau hal ini bisa juga terjadi karna adanya kesalahan dalam melakukan pengenceran yg dilakukan oleh praktikan, sehingga hasilnya tidak akurat lagi seperti hasil pengukuran kadar glukosa pada jekson. hal ini tidak sesuai dengan kondisi klinisnya yang sadar penuh dan dapat beraktivitas dengan baik. Sebab kadar glukosa yg sangat tinggi (hipoglikemia berat) menyebabkan seseorang tidak dapat melakukan aktivitas dengan kondisi kesadaran penuh dan aktif.
4. Pada pemeriksaan kadar trigliserida ini diperoleh beberapa mahasiswa yang mempunyai kadar trigliserida tinggi yaitu jekson (237,15 mg/dl), sari (228,93 mg/dl). Sari memiliki kadar trigliserida yang tinggi dikarenakan konsumsi makanan yang memiliki kadar lemak dan karbohidrat yang cukup tinggi yaitu ± 5 jam sebelum praktikum = nasi goreng komplit, ± 1 jam sebelum praktikum = nasi putih, chicken wing, kentang goreng tabur keju, maka trigliserida langsung meningkat saat makan karena langsung diserap dari makanan dalam bentuk kilomikron. Wajar jika kadar trigliserida sari tinggi, tetapi hal yang kontradiktif terjadi pada jekson yang hanya mengkonsumsi molen ± 1 jam sebelum praktikum tetapi memiliki kadar trigliserida yang lebih tinggi daripada sari. Hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor yaitu : mengkonsumsi makanan tinggi karbohidrat di pagi hari sebelum sampel makan molen dan darah sampel diambil di siang hari, sehingga trigliserida yang dihasilkan mengalami peningkatan yang lebih lama, karena trigliserida yang dihasilkan adalah berasal dari penyerapan karbohidrat, jumlah molen yang dikonsumsi mengandung karbohidrat dan lemak yang tinggi, kesalahan dalam melakukan praktikum.
Kadar trigliserida yang kecil terdapat pada mahasiswa rebecca yang mengkonsumsi ± 4 jam sebelum praktikum = nasi komplit, ± 1 jam sebelum praktikum = 3 gorengan. Hal ini mungkin disebabkan kesalahan dalam pengambilan sampel. Sebab jika dilihat dari komposisi makanan yang dimakan sebelum pengambilan sampel, kadar trigliserida yang diperoleh tidak sesuai.

5. Pada pemeriksaan kadar urea yang terukur bervariasi juga untuk masing-masing individu karena dapat dipengaruhi oleh variasi makan yang dimakan hal ini, dipengaruhi oleh jumlah protein yang dikonsumsi oleh setiap orang berbeda-beda. Pada percobaan ini diperoleh kadar urea tertinggi pada jekson sebesar 15,29 mg/dl.

Saran :

1. Harus melakukan pengenceran dengan baik dan benar agar mendapatkan hasil yang akurat. Konsentrasi larutan stok tidak boleh terlalu tinggi ataupun terlalu rendah. Larutan stok yang terlalu tinggi akan sulit dibaca oleh Spektrofotometer atau akan melewati batas maksimum deteksi yang akan menyebabkan pembacaan absorbansi tidak akurat.
2. Sebaiknya ada penambahan alat pada laboratorium, pada masing-masing grup meja terdapat pipet otomatis yang bisa dipakai untuk masing-masing kelompok tanpa harus menunggu pemakaian dari kelompok lain yang membuat waktu tidak efisien.
3. Sebaiknya penggunaan alat spektrofotometer dapat dilakukan oleh masing-masing kelompok untuk mengetahui bagaimana cara dan metode pemakaian serta pembacaan nilai absorbansinya. Sehingga lebih paham dalam melaksanakan keseluruhan praktikum dengan baik.