

**LAPORAN PRATIUM METABOLISME GLUKOSA, UREA, dan TRIGLISERIDA
(TEKNIK SPEKTROFOTOMETRI)**

Nama Praktikan : Sri Wulandari
Yunita Wannur Azah
Tanggal : 10 maret 2015

Tujuan Pratikum :

1. Mengerti prinsip-prinsip dasar mengenai teknik spektrofotometri (yaitu prinsip dasar alatnya, kuvet, standar, blanko, serta Hukum Beer-Lambert dll)
2. Latihan pembuatan dan penggunaan larutan stok
3. Mengumpulkan data dasar glukosa, trigleserida, dan urea darah
4. Latihan pembuatan dan interpretasi grafik

Alat dan bahan :

Tourniquet	Swab alcohol	Jarum
EDTA	Pipet mohr	Pipet otomatis 100-1000µl
Alat sentrifuse klinik	Glukosa	Kit pemeriksaan urea
Alat spektrofotometer	Urea	Kit pemeriksaan glukosa
Tabung reaksi dan rak	Pipet tetes	Kit pemeriksaan trigleserida
Kuvet plastic		

Pendahuluan :

Spektrofotometri merupakan salah satu dari beberapa teknik yang sering dipakai secara rutin di laboratorium biokimia. Pada dasarnya, dengan teknik spektrofotometri kita dapat mengukur jumlah cahaya yang melewati sampel larutan. Jumlah cahaya yang diserap oleh larutan sampel berkaitan dengan konsentrasi unsur tertentu dalam larutan sampel tersebut. Teknik ini dapat

digunakan untuk memonitor perubahan warna (yaitu perubahan pada jumlah cahaya yang diserab) yang kualitatif dan mengukur konsentrasi bahan secara kuantitatif. Ingatlah spektrofotometri

$$A = \epsilon dc$$

Dimana c = konsentrasi larutan itu (satuan adalah M)

ϵ = koefisien absorbs molar

d = jarak dilalui cahay (cm)

A = serapan

Protap pemeriksaan glukosa, protein dan urea menggunakan spektrofotomeri :

	GLUKOSA	PROTEIN	UREA
volume reagensia kit	1000 μ l reagensia glukosa	1000 μ l reagensia	1000 μ l reagensia A , inkubasi pertama 1000 μ l reagensia B
volume sampel atau standard	10 μ l	10 μ l	10 μ l
konsentrasi standard	100mg/dl	200mg/dl	40mg/dl
periode dan temperatur inkubasi	10 min @ 37 \square C	10 min @ 37 \square C	5 min @ 25 \square C ** 2X**
periksa pada λ =	500nm	530nm	600nm

Prosedur kerja :

A. Pembuatan larutan stok Urea

Larutan stok urea : Siapkan 10 mL larutan urea pada kadar 1,0 g/L (atau 100 mg/dL)

Jadi jumlah bubuk urea yang dibutuhkan = 10 x 1/1000 = 0.01 gram urea yang dibutuhkan

Pengenceran untuk kurva kalibrasi (standard curve) dari larutan tersebut :

1. Siapkan 20 mg/dl standar urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
$$V_2 = (V_1 \times C_1) / C_2 = (20 \times 10) / 100 = 2 \text{ ml}$$

Jadi, diperlukan 2 ml larutan stok urea + 8 ml aquades
2. Siapkan 30 mg/dl standar urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
$$V_2 = (V_1 \times C_1) / C_2 = (30 \times 10) / 100 = 3 \text{ ml}$$

Jadi, diperlukan 3 ml larutan stok urea + 7 ml aquades
3. Siapkan 40 mg/dl standar urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
$$V_2 = (V_1 \times C_1) / C_2 = (40 \times 10) / 100 = 4 \text{ ml}$$

Jadi, diperlukan 4 ml larutan stok urea + 6 ml aquades
4. Siapkan 50 mg/dl standar urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
$$V_2 = (V_1 \times C_1) / C_2 = (50 \times 10) / 100 = 5 \text{ ml}$$

Jadi, diperlukan 5 ml larutan stok urea + 5 ml aquades
5. Siapkan 60 mg/dl standar urea dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
$$V_2 = (V_1 \times C_1) / C_2 = (60 \times 10) / 100 = 6 \text{ ml}$$

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

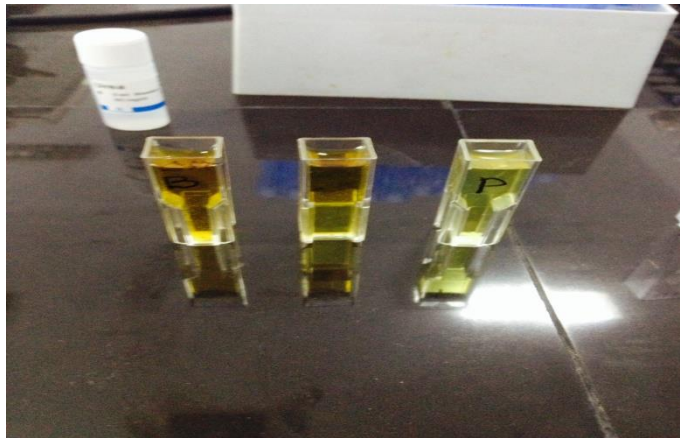


Gambar 1. Larutan stok urea

Persiapan panjang gelombang max :

Urea :

- ✓ Untuk melakukan pemeriksaan absorbansi urea menggunakan spektrofotometri harus dibuat terlebih dahulu larutan blanko dan larutan standar urea berdasarkan petunjuk pada kit urea.
- ✓ Siapkan kuvet yang berisi blanko terdiri dari 1000 μ l reagen urea sesuai kit
- ✓ Siapkan kuvet yang berisi standar terdiri dari 1000 μ l reagen urea + 10 μ l larutan standar urea sesuai kit
- ✓ Siapkan 40 ml/dl larutan standar urea dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV/Vis dengan λ : 500 – 700 nm.
- ✓ Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standar dan sampel.



Gambar 2. Larutan urea Blanko, Standar



Gambar 3. Larutan stok urea pada kuvet

Hasil praktikum :

- Digunakannya larutan standar urea 40 ml, larutan stok urea ini yang digunakan untuk mencari gelombang maksimal pada spektrofotometri. Pada alat spektrofotometri didapatkan panjang gelombang yaitu $\lambda = 689,5$ nm. Dengan didaptkannya panjang gelombang tersebut maka digunakan untuk pemeriksaan absorbansi pada setiap larutan standar urea yang telah dibuat, sehingga dari tiap-tiap tabung didapatkan hasil berupa :

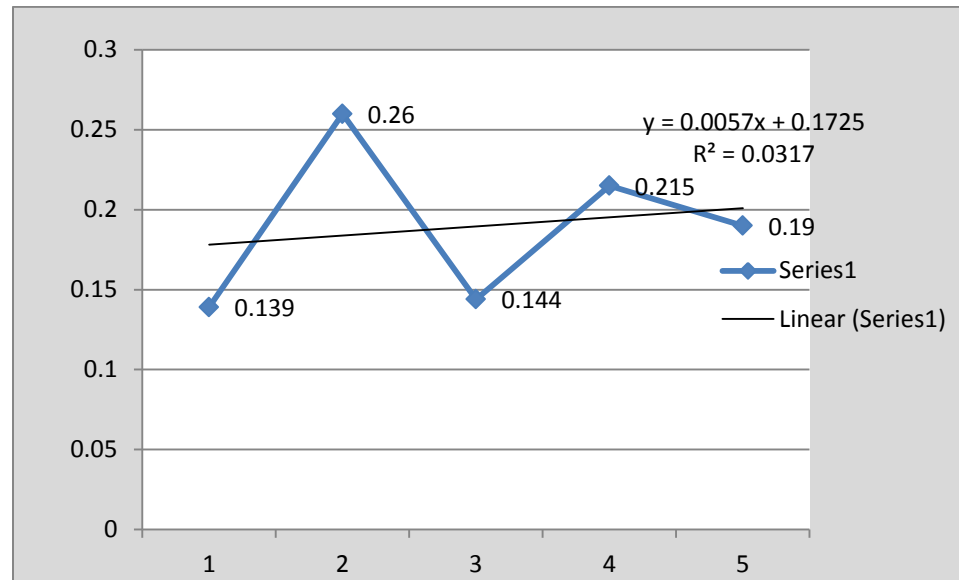
Tabel 1a. Urea – Data kalibrasi larutan standar urea pada tabung

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	52,77
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 1. kalibrasi larutan standar urea



Pembahasan :

1. Dari grafik diatas didapatkan persamaan regresi yaitu $Y = 0,0057x + 0,1725$ dengan nilai $R^2 = 0,0317$, maka dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa kurva kalibrasi ini menunjukkan hasil yang kurang baik, hal ini bisa diakibatkan teknik pengenceran yang kurang tepat atau adaya kesalahan saat meletakkan sampel pada alat spektrofotometri seperti kuvet yang kurang bersih, panjang gelombang yang salah, dan kesalahan – kesalahan lainnya yang mungkin terjadi.
2. Rumus yang digunakan untuk mencari konsentrasi larutan standar yaitu :

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

Dimana : C = konsentrasi larutan

A = Absorbansi

Dari rumus diatas didapat konsentrasi larutan standar yaitu 40mg/dl dan absorbansi standar yang digunakan adalah absorbansi larutan 40ml yaitu 0,144. Larutan 40ml dijadikan acuan karena memiliki panjang gelombang maksimal.

Hukum Beer dapat dipenuhi dengan cara menentukan grafik kalibrasi berbanding 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 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 suatu senyawa maka semakin banyak cahaya yang akan diserap.

$$A = \epsilon c l$$

Berdasarkan teori diatas dapat disimpulkan bahwa :

- a. Larutan standar urea dia yang dibuat tidak memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi tidak berupa garis lurus.
- b. Ketidak sesuaian larutan standar dengan hukum lambert-beer dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya kesalahan saat membuat larutan, larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen.
- c. Dalam pembuatan suatu larutan, harus dilakukan secara teliti dan berhati-hati agar hasil konsentrasi yang diinginkan bisa sesuai dengan konsentrasi yang didapat. Kesesuaian konsentrasi ini dapat dibuktikan dengan spektrofotometri.
- d. Pada larutan standar urea diatas terjadi ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dengan larutan yang diprediksi. Hal ini dikarenakan oleh beberapa sebab seperti kesalahan dalam menghitung pencairan, kesalahan dalam mencampurkan larutan standar dengan reagen dari kit, tidak meratanya pengadukan larutan sehingga belum homogen.

B. Pembuatan larutan stok Glukosa

Larutan stok glukosa : Siapkan 50 ml larutan glukosa 1,5 g/L (150 mg/dl)

Jumlah bubuk glukosa yang dibutuhkan = $50 \times 1,5/1000 = 0,075$ gram glukosa

Pengenceran untuk kurva kalibrasi (standar curve) dari larutan stok glukosa

1. Siapkan 80 mg/dl standar 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, diperlukan 5,33 ml larutan stok glukosa + 4,67 ml aquades
2. Siapkan 90 mg/dl standar glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
 $V_2 = V_1 \times C_1 / C_2 = (90 \times 10) / 150 = 6 \text{ ml}$
Jadi, diperlukan 6 ml larutan stok glukosa + 4 ml aquades
3. Siapkan 100 mg/dl larutan stok glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
 $V_2 = V_1 \times C_1 / C_2 = (100 \times 10) / 150 = 6,67 \text{ ml aquades}$
Jadi, diperlukan 6,67 ml larutan stok glukosa + 3,33 ml aquades
4. Siapkan 110 mg/dl larutan stok glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
 $V_2 = V_1 \times C_1 / C_2 = (110 \times 10) / 150 = 7,33 \text{ ml aquades}$
Jadi, diperlukan 7,33 ml larutan stok glukosa + 2,67 ml aquades
5. Siapkan 120 mg/dl larutan stok glukosa dilarutkan hingga 10 ml dengan H₂O
 $V_2 = V_1 \times C_1 / C_2 = (120 \times 10) / 150 = 8 \text{ ml aquades}$
Jadi, diperlukan 8 ml larutan stok glukosa + 2 ml aquades

Persiapan panjang gelombang max glukosa :

- ✓ Siapkan 100 mg/dl larutan standar glukosa dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan $\lambda = 400-600 \text{ nm}$
- ✓ Siapkan kuvet blanko yang berisi 1000 μl reagen glukosa
- ✓ Siapkan kuvet standar yang berisi 1000 μl reagen glukosa + 10 μl larutan standar glukosa dengan konsentrasi 100 mg/dl
- ✓ Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standar dan sampel.

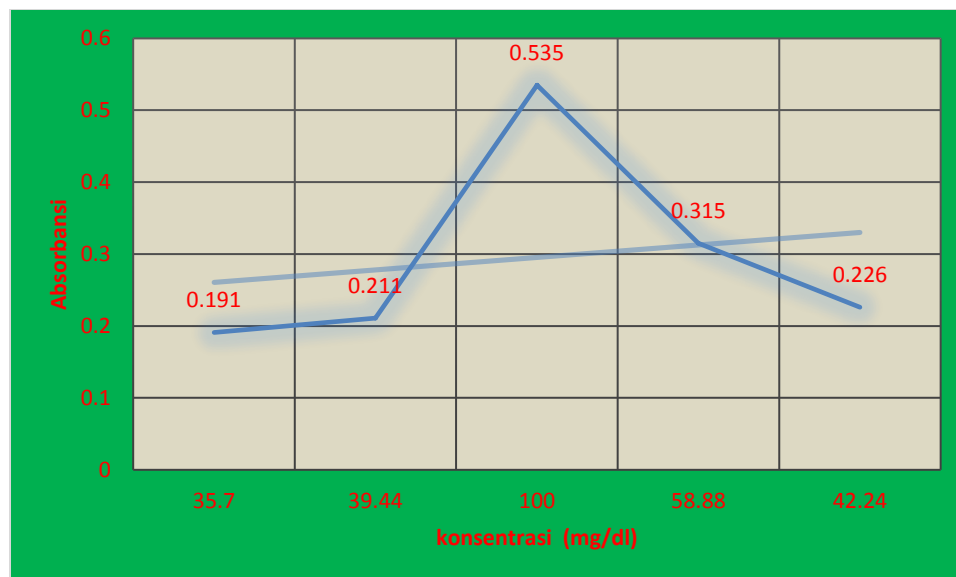
Hasil praktikum :

Dengan menggunakan larutan 100 mg/dl larutan standar glukosa didapatkan panjang gelombang dari spektrofotometri yaitu $\lambda = 479,0$ nm, dengan menggunakan panjang gelombang tersebut dilakukan pemeriksaan absorbansi pada setiap larutan standar glukosa, didapatkan data sebagai berikut :

Tabel 2a. Data hasil kalibrasi larutan standar glukosa

Konsentrasi yang diinginkan (mg/dl)	Absorbansi	Konsentrasi yang didapatkan (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 2. Data hasil kalibrasi larutan standar glukosa



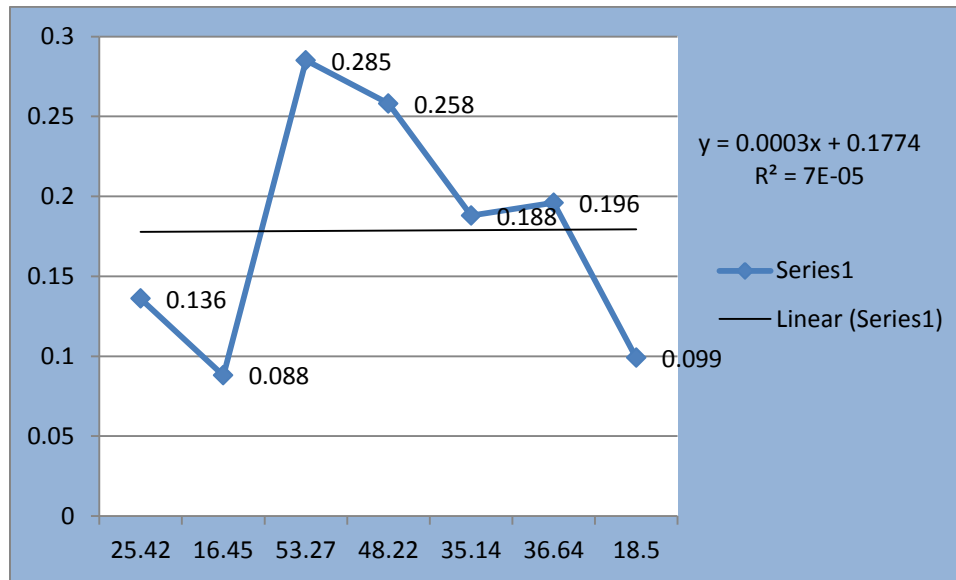
Pembahasan :

1. Dari grafik diatas didapatkan persamaan regresi yaitu $Y = 0,0174x + 0,2434$ dengan nilai $R^2 = 0,0375$, hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi diatas juga tidak linier dan hasilnya kurang baik,
2. 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 dapat disebabkan karena kurang homogenya larutan pada kuvet yang mempengaruhi konsentrasi larutan. Volume larutan glukosa yang dibutuhkan sangat sedikit yaitu 10 μ l sehingga kemungkinan pada saat memasukkan ke dalam tabung reaksi larutan tidak seluruhnya bercampur dengan reagen, selain itu waktu persiapan sampel di kuvet dengan pengukuran absorbansi di spektrofotometer juga lama yang mengakibatkan larutan kurang homogen. Kesalahan juga dapat terjadi pada saat pengkalibrasian spektrofotometer yang digunakan.

Tabel 3.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	0.316	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 3. Hasil pengukuran larutan sampel pengenceran glukosa double dilution



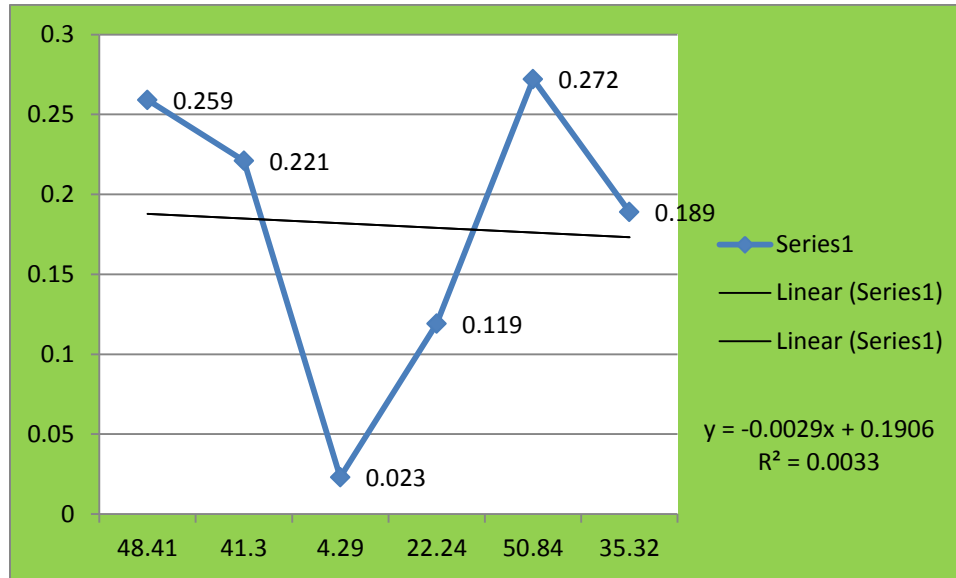
Pembahasan :

Dari grafik diatas didapatkan persamaan regresi yaitu $Y = 0,0003x + 0,1774$ dengan nilai $R^2 = 7E-05$, hal ini menunjukkan bahwa kurva kalibrasi tidak linier dan kurang baik atau tidak akurat.

Tabel 4. Data hasil pengukuran kalibrasi larutan sampel pengenceran glukosa decimal 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	48,41
0,01 X	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 4. Hasil pengukuran larutan sampel pengenceran glukosa decimal dilution



Pembahasan :

Dari kurva kalibrasi diatas didapatkan persamaan regresi yaitu $Y = 0,0029x + 0.1906$ dengan nilai $R^2 = 0,0033$ hal ini menunjukkan bahwa kurv kalibrasi tidak linier dengan hasilnya dan tidak akurat.

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.

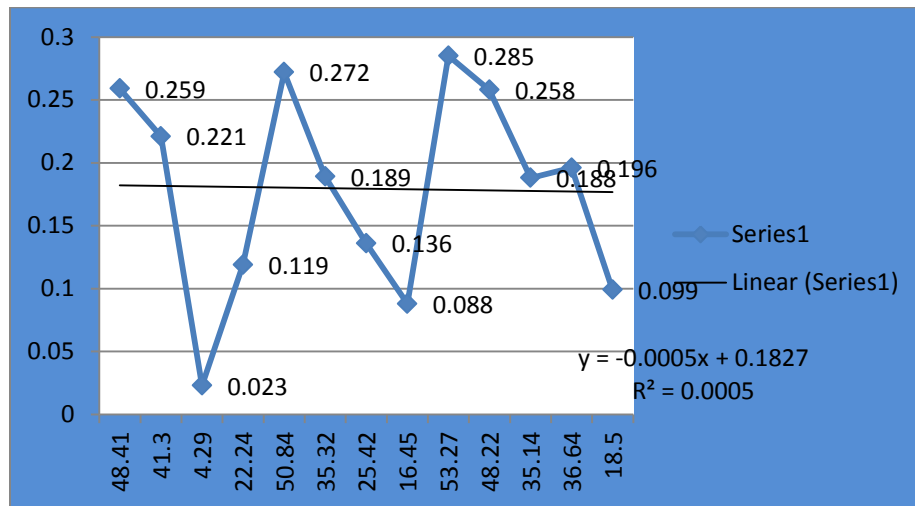
Tabel 5. Perbandingan konsentrasi sampel Glukosa dan urea yang dihitung pada grafil kalibraasi data yang dihitung dengan rumus pada regensia tes kit

Pemeriksaan sampel serum plasma	Absorbansi pada grafik kalibrasi	Konsentrasi pada grafik kalibrasi	Absorbansi pada rumus regensia kit	Konsentrasi pada regensia kit
Glukosa (Kirana)	0,197	36,82 mg/dl	0,225	90,36 mg/dl
Urea (Yunita)	0,311	86,38 mg/dl	0,167	127,23 mg/dl

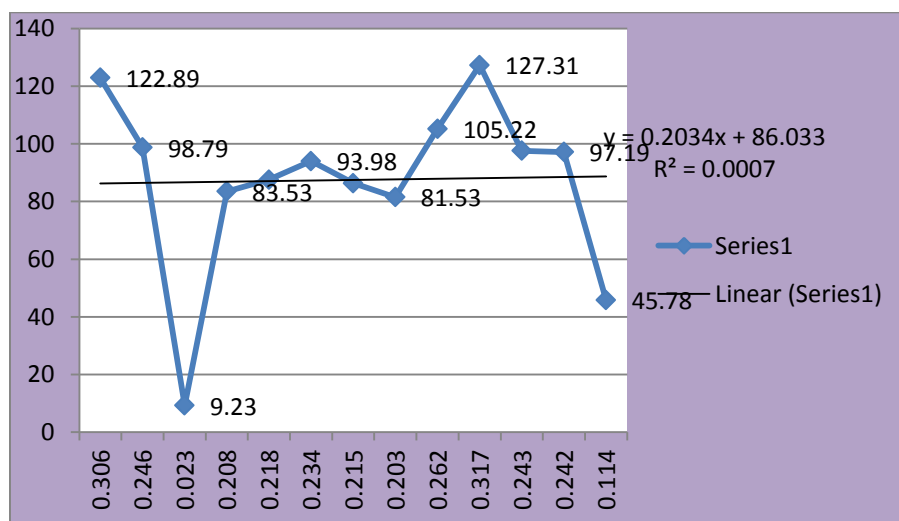
Pemeriksaan sampel pengenceran glukosa	Absorbansi pada grafik kalibrasi	Konsentrasi pada grafik kalibrasi (mg/dl)	Absorbansi pada rumus regensia tes kit	Konsentrasi pada regensia tes kit (mg/dl)
0,1X	0,259	48,41	0,306	122,89
0,01X	0,221	41,30	0,246	98,79
0,001X	0,023	4,29	0,023	9,23
0,3X	0,119	22,24	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	0,258	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 5. Hasil pengukuran konsentrasi absorbansi larutan sampel glukosa menggunakan panjang gelombang $\lambda = 479$ nm pada kalibrasi



Kurva 6. hasil pengukuran konsentrasi absorbansi larutan sampel glukosa menggunakan panjang gelombang $\lambda = 500$ nm sesuai rumus pada reagensia test



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

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

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.

Tabel 6. 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	-	-

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.

SARAN

- Sebaiknya adanya penambahan alat agar semua praktikan dapat mengerjakan praktikum dengan baik tidak saling berebutan alat.
- Sebaiknya instruktur menjelaskan kembali bagaimana cara kerja praktikum.