

BM-506 KETERAMPILAN DASAR LABORATORIUM

LAPORAN

PRAKTIKUM 04 –Metabolisme & Spektrofotometri

Donny Nauphar & M.Anwar

TUJUAN

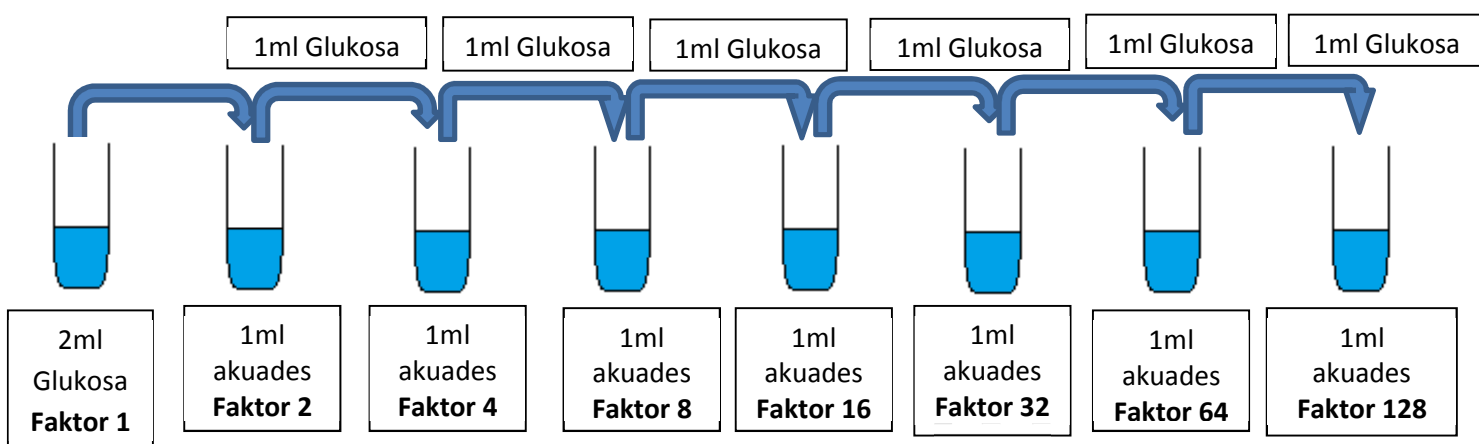
- Mahasiswa memahami cara penggunaan spektrofotometri dan prinsip dasar-dasar tehnik dari spektrofotometri dan membuktikan kebenaran Hukum Beer-Lambert
- Melakukan pengenceran dengan decimal delution dan doubling delution
- Melakukan pembuatan larutan stok glukosa
- Melakukan pembuatan grafik dan interpretasinya dari data yang diperoleh
- Melakukan pemeriksaan kadar glukosa darah, urea, dan trigliserida dengan metode spektrofotometri

ALAT DAN BAHAN

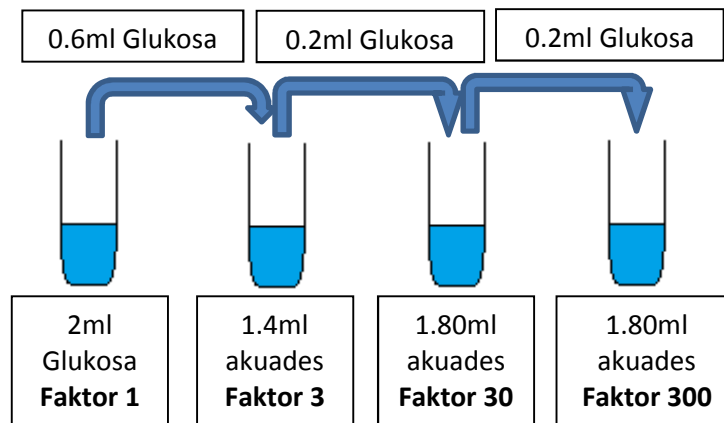
Pipet Mohr, pipet otomatis 10-100 μ l, sentrifus, waterbath suhu 37°C, kit pemeriksaan glukosa, kit pemeriksaan urea, kit pemeriksaan trigliserida, glukosa, tabung reaksi dan rak, cuvette

CARA KERJA

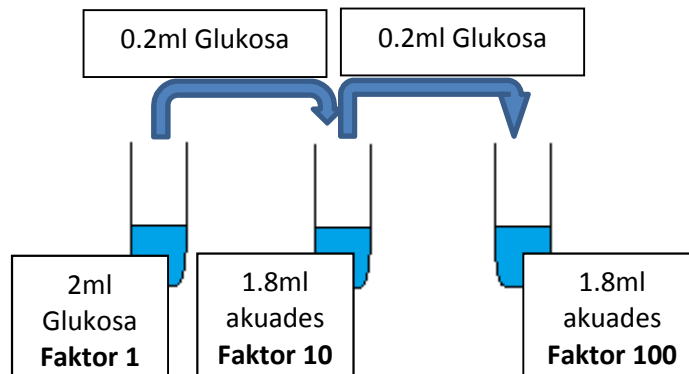
Pengenceran Glukosa dengan Doubling Dilution (Faktor 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128)



Pengenceran Glukosa dengan Decimal Dilution (Faktor 1, 3, 30, 300)



Pengenceran Glukosa dengan Decimal Dilution (Faktor 1, 10, 100)



Untuk pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea

- Ambil 1ml darah vena masukkan dalam wadah yang telah berisi EDTA, sentrifuse \pm 15 menit
- Ambil 23 tabung reaksi:
 - Tabung reaksi 1 : 1ml reagensia glukosa (blank)
 - Tabung reaksi 2 : 1ml reagensia glukosa + 10 μ l glukosa standart (standart)
 - Tabung reaksi 3 : 1ml reagensia glukosa + 10 μ l plasma (sampel)
 - Tabung reaksi 4 : 1ml reagensia trigliserida (blank)
 - Tabung reaksi 5 : 1ml reagensia trigliserida + 10 μ l trigliserida standart (standart)
 - Tabung reaksi 6 : 1ml reagensia trigliserida + 10 μ l plasma (sampel)
 - Tabung reaksi 7 : 1ml reagensia urea (blank)
 - Tabung reaksi 8 : 1ml reagensia urea + 10 μ l urea standart (standart)
 - Tabung reaksi 9 : 1ml reagensia urea + 10 μ l plasma (sampel)

- Tabung reaksi 10 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 1
- Tabung reaksi 11 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 2
- Tabung reaksi 12 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 4
- Tabung reaksi 13 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 8
- Tabung reaksi 14 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 16
- Tabung reaksi 15 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 32
- Tabung reaksi 16 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 64
- Tabung reaksi 17 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 128
- Tabung reaksi 18 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 1
- Tabung reaksi 19 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 3
- Tabung reaksi 20 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 10
- Tabung reaksi 21 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 30
- Tabung reaksi 22 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 100
- Tabung reaksi 23 : 1ml reagensia glukosa + 10µl faktor 300

Doubling dilution

Decimal dilution

- Masukkan tabung reaksi 1,2,3 kedalam waterbath (suhu 37°C) ± 10 menit, tabung reaksi 4,5,6 kedalam waterbath (suhu 37°C) ± 5 menit, tabung reaksi 7,8,9 diamkan dalam suhu ruangan (25°C) ± 5 menit.
- 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
- Masukkan cuvette yang berisi larutan blank ke sample holder pada spektrofotometri, set transmisi %T pada 100
- Masukkan cuvette larutan standart : catat hasil → As: Absorbance standart
- Masukkan cuvette larutan sample : catat hasil → Au : Absorbance zat yang diukur
- Begitu juga untuk pemeriksaan doubling dilution & decimal dilution sebelumnya masukkan blank dan standart glukosa.

- Kemudian hasil masukkan dalam **Hukum Beer-Lambert**

$$\frac{A_u}{C_s} = \frac{A_s}{C_s} \times \frac{C_s}{A_s}, \quad C_u = \frac{A_u \times C_s}{A_s}$$

Dimana :

Au = Absorbance zat yang diukur

As = Absorbance standart

Cu = konsentrasi zat yang akan diukur

Cs = konsentrasi larutan standart (glukosa 100mg/dl, trigliserida 200mg/dl, urea 40mg/dl)

HASIL

Faktor	Konsentrasi	Grup Meja 3	Grup Meja 5
1	500	3.972	2.019
2	250	4	3.602
4	125	3.527	4
8	62.5	2.283	3.711
16	31.25	1.163	2.46
32	15.625	0.623	1.357
64	7.8125	0.325	0.612
128	3.90625	0.202	0.167

Tabel 1a. Hasil pemeriksaan absorbansi Urea dengan Doubling Dilution.

Faktor	Konsentrasi	Grup Meja 3	Grup Meja 5
1	500	4	1.631
3	150	3.756	3.528
10	50	1.468	3.691
30	15	0.628	1.476
100	5	0.168	0.255
300	1.5	0.089	0.139

Tabel 1b. Hasil pemeriksaan absorbansi Urea dengan Decimal Dilution.

Faktor	Konsentrasi	Grup Meja 2	Grup Meja 4
1	50.00	2.124	1.642
2	25.00	1.485	-0.011
4	12.50	0.761	0.214
8	6.25	0.423	0.241
16	3.13	0.255	0.006
32	1.56	0.099	0.046
64	0.78	0.075	-0.026
128	0.39	0.056	-0.090

Tabel 2a. Hasil pemeriksaan absorbansi Glukosa dengan Doubling Dilution.

Faktor	Konsentrasi	Grup Meja 2	Grup Meja 4
1	50.00	2.05	1.814
3	15.00	0.68	0.613
10	5.00	0.19	0.185
30	1.50	-0.50	0.039
100	0.50	-0.08	0.031
300	0.15	-0.09	0.000

Tabel 2b. Tabel pemeriksaan absorbansi Glukosa dengan Decimal Dilution.

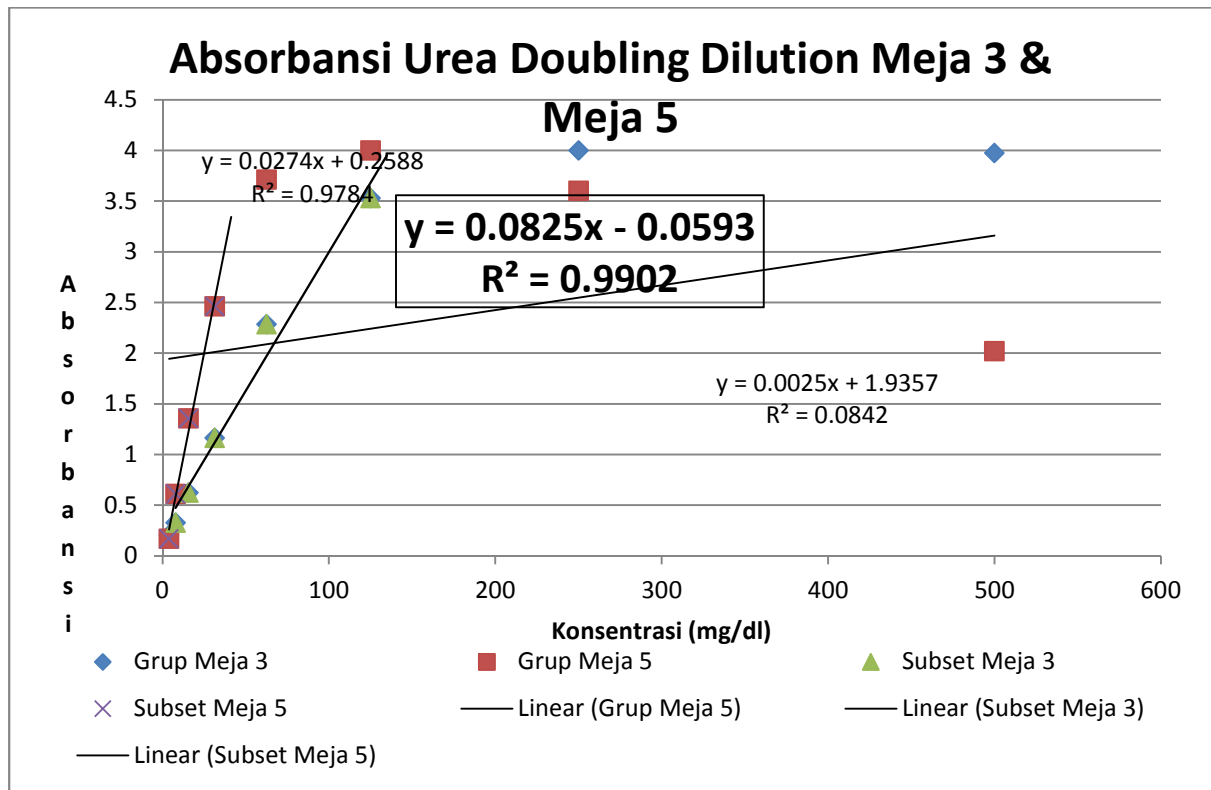
Glukosa	Absorbansi	Trigliserida	Absorbansi	Urea	Absorbansi
Blank	0.000	Blank	0.000	Blank	0.000
Standar	0.359	Standar	0.398	Standar	0.230
Darah	0.271	Darah	0.098	Darah	0.256

Tabel 3. Tabel pemeriksaan absorbansi Glukosa, Trigliserida, dan Urea dari sampel darah.

No	Detail2 Mhs (berapa lama sejak makan, rata2 apa yg dimakan, jenis kelamin, umur)	Glukosa		Trigliserida		Urea	
		A	Kadar(mg/dl)	A	Kadar(mg/dl)	A	Kadar(mg/dl)
1	KELOMPOK DORRA-LILY Menu : nasi lengkap+air putih Makan 1 jam sbim sampel diambil	0.167	60,73	0.091	81,98	0.017	75,56
2	Kelompok Donny_Anwar Makan roti coklat + teh manis 1 jam sbim sampel diambil	0.271	75,49	0.256	222,61	0.098	9,85
3	Kelompok Vera-Taufik Menu : nasi lengkap+air putih Makan 1 jam sbim sampel diambil	0,185	77,41	0,18	181,81	0,041	44,32
4	Kelompok Roy-Dedi Menu : nasi lengkap+air putih Makan 1 jam sbim sampel diambil	0,409	120,29	0,065	57,02	0,009	60
5	Kelompok Martina – Ernawati Segelas susu 1 jam sbim sampel diambil	1,339	90,96	0,29	267,28	0,108	47,47
6	Kelompok Siti-mara-leo Menu : juice kuini sejam sebelum pengambilan sample dan 2 gorengan 5 jam sbim pengambilan sample	0,286	250,88	0,092	162,83	0,008	0,83
7	Kelompok Dita (nasi dan ikan 1 jam sebelum sampel diar	2,431	682,87	0,091	86,26	0,166	22,13
8	Kelompok Sukeisi Menu : Lontong 3 jam sebelum sample diambil	0,131	38,87	0,09	90	0,147	18,04
9	Kelompok Taya Menu : Nasi lengkap dan air putih 4 jam sebelum sample diambil	0,22	65,28	0,337	262,26	0,179	18,36

Tabel 4. Hasil pemeriksaan absorbansi Glukosa, Urea, dan Trigliserida kelas. Semua hasil dicari dengan menggunakan rumus kit.

ANALISA & KESIMPULAN



Grafik 1a. Persamaan regresi dan confidence pada Doubling Dilution Urea grup meja 3 & meja 5.

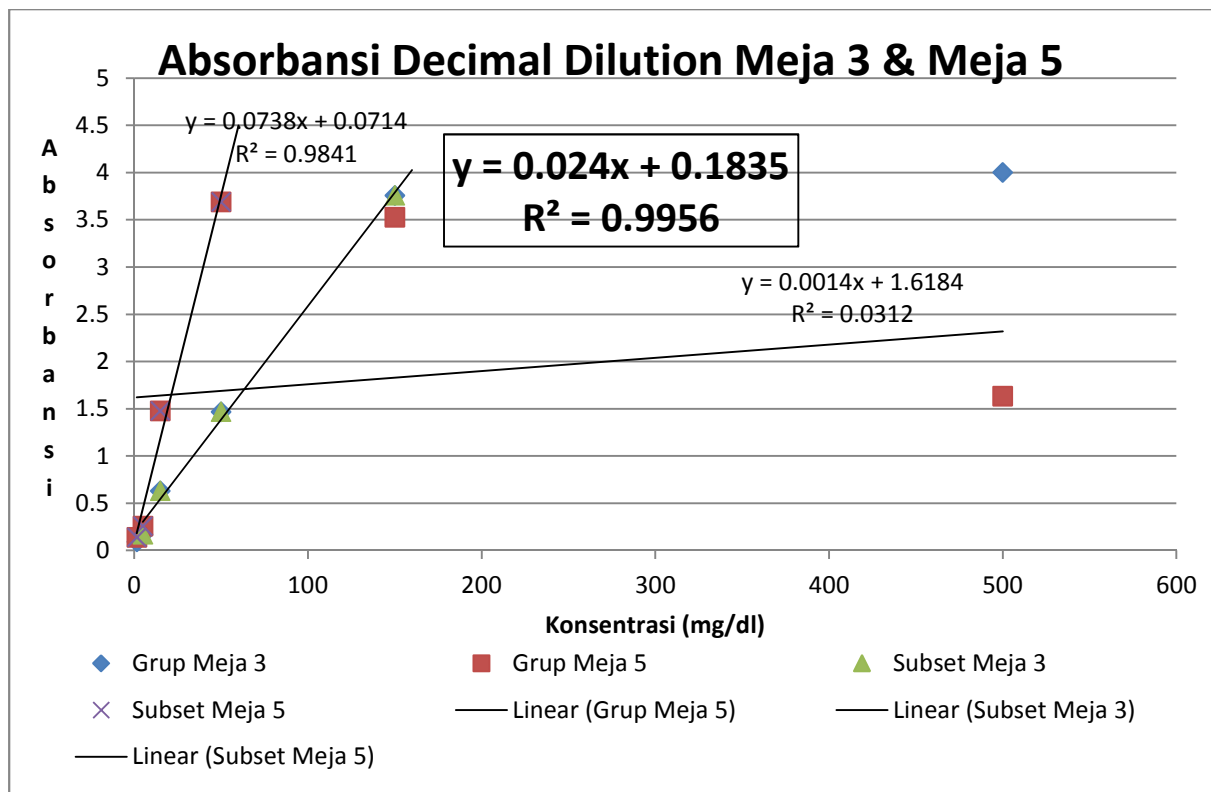
Dari Tabel 1a, dapat dibuat grafik seperti diatas. Perhitungan regresi dari data-data yang didapat dari Grafik 1a. menunjukkan confidence level (R^2) dari meja yang sangat rendah 0.0842 dan persamaan garis regresi tersebut tidak dapat dipakai karena confidence level yang rendah menunjukkan ketidaklinearan data-data yang ada. menghitung

Karena pada hukum Beer-Lambert, Absorbansi adalah berbanding lurus dengan Konsentrasi maka,, untuk mendapatkan persamaan regresi yang memiliki confidence level yang tinggi, hanya data-data yang linear akan kita pakai untuk mencari persamaan regresi. Untuk mencari persamaan regresi yang paling tinggi confidence levelnya, maka dipilih subset data dari meja 3 dan meja 5 yang plaign linear. Pada persamaan regresi yang didapat dari subset meja 3 dan meja 5, kami memilih persamaan regresi meja 3 yang memiliki confidence (R^2) yang paling tinggi.

$$y = 0.0825x - 0.0593$$
$$R^2 = 0.9902$$

y = absorbansi

x = konsentrasi



Grafik 1b. Persamaan regresi dan confidence pada Decimal Dilution Urea grup meja 3 & meja 5.

Dari Tabel 1b, dapat dibuat grafik seperti diatas. Perhitungan regresi dari data-data yang didapat dari Grafik 1b. menunjukkan confidence level (R^2) dari meja yang sangat rendah 0.0312 dan persamaan garis regresi tersebut tidak dapat dipakai karena confidence level yang rendah menunjukkan ketidaklinearan data-data yang ada. menghitung

Karena pada hukum Beer-Lambert, Absorbansi adalah berbanding lurus dengan Konsentrasi maka,, untuk mendapatkan persamaan regresi yang memiliki confidence level yang tinggi, hanya data-data yang linear akan kita pakai untuk mencari persamaan regresi. Untuk mencari persamaan regresi yang paling tinggi confidence levelnya, maka dipilih subset data dari meja 3 dan meja 5 yang plaign linear. Pada persamaan regresi yang didapat dari subset meja 3 dan meja 5, kami memilih persamaan regresi meja 3 yang memiliki confidence (R^2) yang paling tinggi.

$$y = 0.024x + 0.1835$$

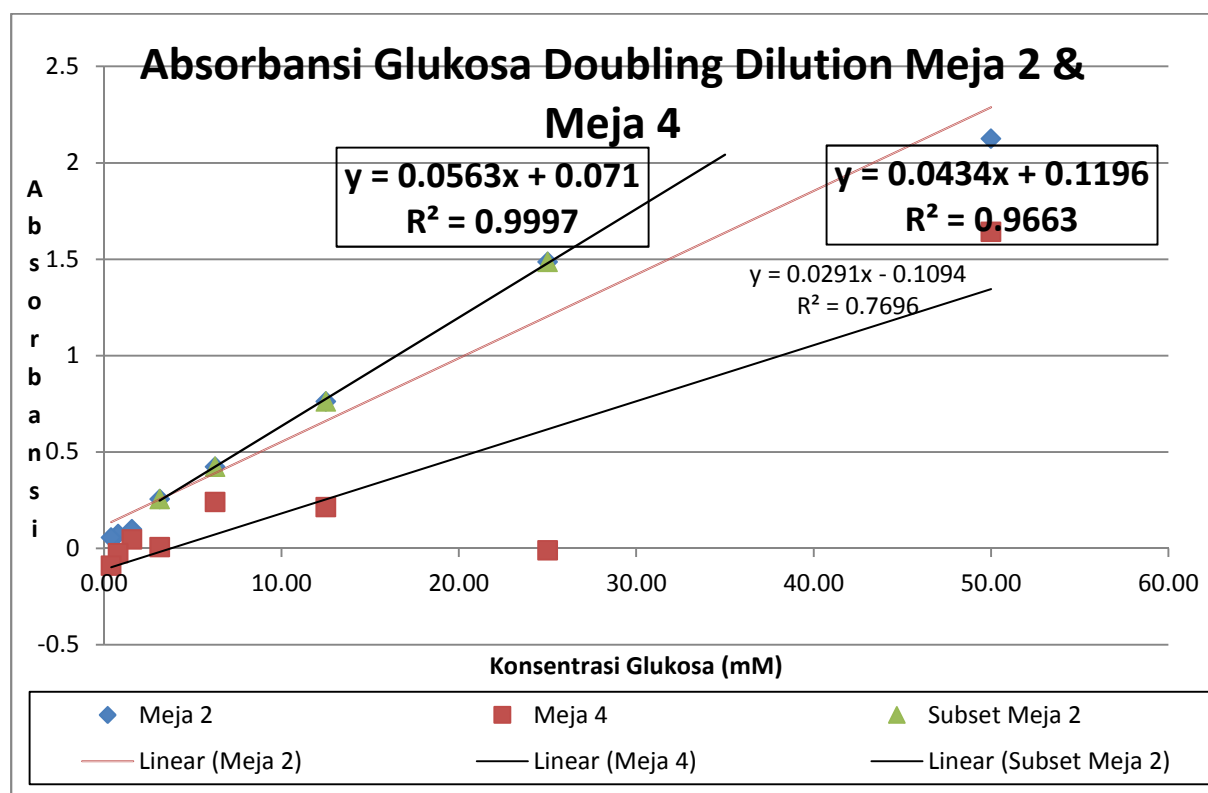
$$R^2 = 0.9956$$

y = absorbansi

x = konsentrasi

Tren pengenceran urea dengan doubling dilution pada meja 3 dan 5 yang tidak linear, baik ada doubling dilution maupun decimal dilution, bisa disebabkan beberapa hal:

1. Kesalahan pada labeling sampel sehingga absorbansi sampel salah dibaca adalah salah satunya.
2. Penyebab lain yang bisa menyebabkan data-data diatas tidak linear sesuai pengencerannya adalah kontaminasi pada reagensia urea yang dipakai sehingga reaksi enzimatik tidak terjadi.
3. Bisa juga terjadi kesalahan pada saat pengenceran pada salah satu larutan dalam rantai doubling dilution, misalnya apabila 1:2 terlalu encer, maka pengenceran seterusnya juga akan akan terpengaruh.
4. Konsentrasi urea yang terlalu tinggi bisa menyebabkan sensitifitas alat spektrofotometer melewati ambang batas yang ditentukan dan tidak dapat dikalkulasi dengan benar.

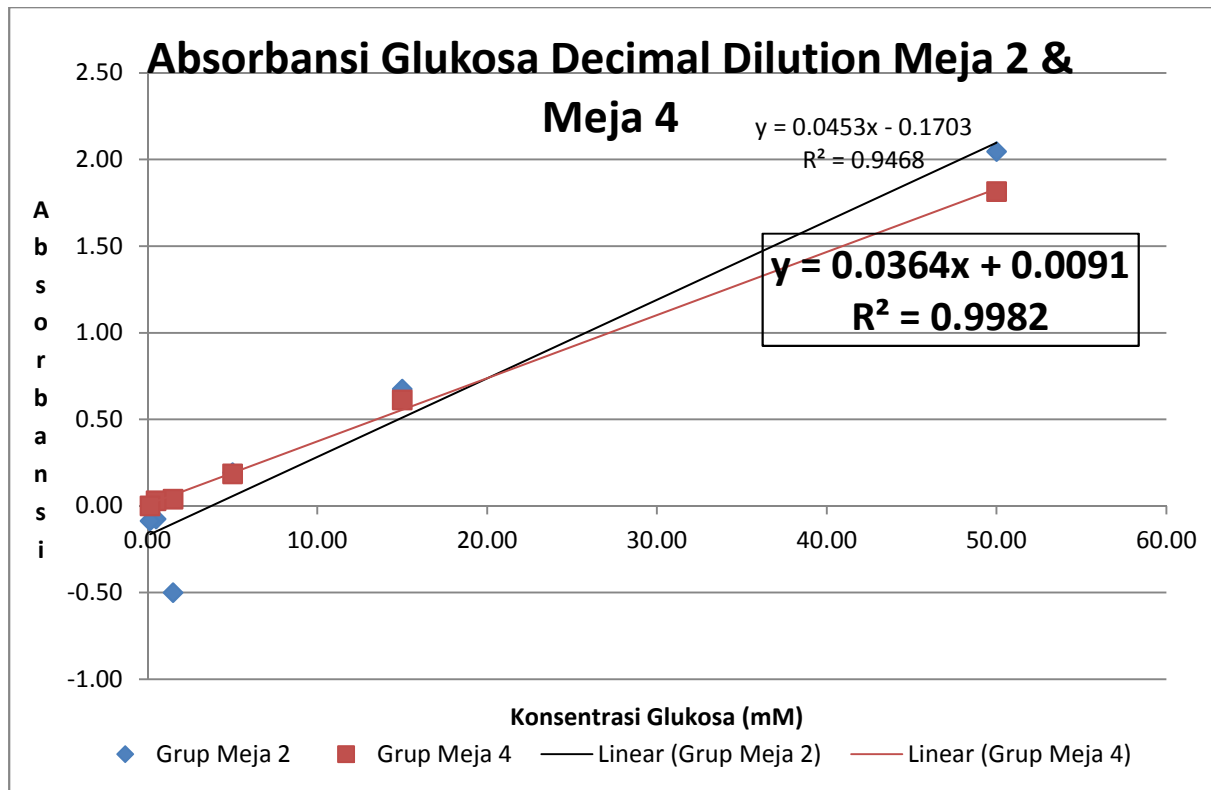


Grafik 2a. Persamaan regresi dan confidence pada Doubling Dilution Urea grup meja 3 & meja 5.

Dari Tabel 2a, dapat dibuat grafik 2a seperti diatas. Perhitungan persamaan regresi dari pengenceran glukosa diatas. Hasil meja 4 memiliki nilai confidence yang cukup tinggi ($R^2 = 0.9663$), walaupun demikian untuk mencari best fit dengan nilai confidence yang lebih tinggi, kami mencoba membuat persamaan regresi dari subset data meja 4 dan berhasil menemukan persamaan regresi yang lebih baik yakni:

$$y = 0.0563x + 0.071$$

$$R^2 = 0.9997$$



Grafik 2b. Persamaan regresi dan confidence pada Doubling Dilution Urea grup meja 3 & meja 5.

Dari Tabel 2b, dapat dibuat grafik 2b seperti diatas. Perhitungan persamaan regresi dari pengenceran glukosa diatas. Dari grafik diatas hasil persamaan regresi pada meja 4 sangat baik dimana nilai $R^2 = 0.9982$. Ini menunjukkan pengenceran yang sangat baik. Persamaan regresi yang akan digunakan:

$$y = 0.0364x + 0.0091$$

$$R^2 = 0.9982$$

y = absorbansi

x = konsentrasi

Pada grafik 2a dan 2b, dapat dilihat bahwa data absorbansi yang sesuai dengan Hukum Beer-Lambert yang menyatakan bahwa Absorbansi adalah bebanding lurus dengan Konsentrasi. Pada teorinya, disaat konsentrasi suatu larutan diencerkan menjadi setengah konsentrasi awalnya, maka absorbansinya harus ikut turun menjadi setengah dari absorbansi konsentrasi awalnya. Tren ini dapat dilihat pada data-data meja 4 yang cukup linear mengikuti Hukum Beer-Lambert. Ini dibuktikan dengan persamaan regresi yang memiliki confidence level (R^2) yang mendekati 1.

Walaupun begitu, untuk mendapatkan data yang linear ada beberapa faktor yang harus diperhatikan dan dipertimbangkan:

1. Pengetahuan mengenai alat spektrofotometer sangatlah penting, karena setiap alat memiliki Maximum Detectable Concentration, Minimum Detectable Concentration, Coefficient of

Variations dan Functional Assay Sensitivity. Pengetahuan mengenai limitasi alat dapat membantu kita merancang jumlah dilusi dan konsentrasi awal.

2. 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 (misalnya, nilai maksimal pembacaan absorbansi adalah 4 yang berarti konsentrasi 50mM, maka 60mM akan dibaca juga sebagai absorbansi 4).
3. Jumlah dilusi serial yang akan dibuat. Terlalu banyak dilusi menyebabkan larutan sangat encer dan kadang-kadang tidak dapat dibaca dengan akurat pada alat spektrofotometer karena berada diambang batas deteksi atas dibawah Functional Assay Sensitivity.
4. Penggunaan teknik pipet yang baik sangat mempengaruhi pengenceran yang tepat. Kesalahan yang terjadi pada tabung pertama atau kedua pada dilusi serial akan menyebabkan kesalahan pengenceran.

Hasil-hasil persamaan regresi diatas akan digunakan untuk membandingkan konsentrasi pada sampel darah dengan rumus kit yang menggunakan rumus Beer-Lambert

	GLUKOSA		UREA	
	Mhs: Anwar	Mhs: Dorra	Mhs: Sukaisi	Mhs: Taya
Serapan sampel	0.271	0.167	0.147	0.179
Dari grafik 1a/2a	3.55 mM	1.71 mM	2.50 mg/dl	2.89 mg/dl
Dari grafik 1b/2b	4.95 mM	2.09 mM	-1.52 mg/dl	-0.19 mg/dl
Dari rumus kit	4.19 mM	3.37 mM	18.04 mg/dl	18.36 mg/dl

Tabel 5. Hasil perhitungan konsentrasi sampel darah menggunakan persamaan regresi dari grafik 1a/2a & 1b/2b dan rumus kit.

Dari tabel 5 bisa kita lihat bahwa konsentrasi glukosa yang dihitung dari rumus kit berbeda dengan dengan persamaan regresi yang kita dapatkan dari grafik 1b dan 2b. Ini mungkin disebabkan oleh persamaan regresi yang didapat dari subset tidak merepresentasikan seluruh populasi dan disebabkan oleh itu, hasilnya jauh berbeda dengan perhitungan rumus kit. Untuk penghitungan konsentrasi urea, hasil yang didapat berbeda sangat signifikan dibandingkan dengan rumus kit. Ini mungkin disebabkan reaksi kimiawi pada sampel urea tidak terjadi akibat kontaminasi pada reagensia.

SARAN

1. Pengetahuan mengenai alat spektrofotometer sangatlah penting, karena setiap alat memiliki Maximum Detectable Concentration, Minimum Detectable Concentration, Coefficient of Variations dan Functional Assay Sensitivity. Pengetahuan mengenai limitasi alat dapat membantu kita merancang jumlah dilusi dan konsentrasi awal.
2. 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 (misalnya, nilai maksimal pembacaan absorbansi adalah 4 yang berarti konsentrasi 50mM, maka 60mM akan dibaca juga sebagai absorbansi 4).

3. Jumlah dilusi serial yang akan dibuat. Terlalu banyak dilusi menyebabkan larutan sangat encer dan kadang-kadang tidak dapat dibaca dengan akurat pada alat spektrofotometer karena berada diambang batas deteksi atas dibawah Functional Assay Sensitivity.