

PRAKTIKUM 4
METABOLISME GLUKOSA, UREA, DAN TRIGLISERIDA
(TEKNIK SPEKTROFOTOMETRI)

Oleh:

Henny E. S. Ompusunggu dan Yulia Fitri Ghazali

Hari/Tanggal/Jam Praktikum : Kamis/ 11 Oktober 2012/ 12.00 WIB

I. Tujuan:

Agar mahasiswa dapat :

- Mengerti prinsip-prinsip dasar teknik spektrofotometri (yaitu prinsip dasar alatnya, kuvet, standard, blanko, serta Hukum Beer-Lambert dll).
- Latihan pembuatan dan penggunaan larutan stok
- Memperoleh data kadar glukosa, trigliserida dan urea darah
- Latihan pembuatan dan interpretasi grafik
- Persiapan untuk praktikum Metabolisme II” di mana mahasiswa akan mendesain dan melakukan percobaan yang berdasarkan teknik-teknik praktikum ini.

II. Alat dan Bahan

Tourniquet	Swab alkohol	Tempat pembuangan yang tajam
Jarum	EDTA	Tempat pembuangan yang 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 10 µl - 100 µl
Pipet tetes	Kuvet plastik	Alat spektrofotometer

III. Cara Kerja

➤ **Persiapan Larutan Stok**

Larutan stok urea yang disiapkan 10 mL larutan urea pada kadar 10 g/L

$$= 0,001 \text{ L} \times 10 \text{ g/L} = 0,1 \text{ g}$$

Larutan stok glukosa yang disiapkan 10 mL larutan 100mM glukosa

$$= 0,001 \text{ L} \times 10 \text{ g/L} = 0,1 \text{ g}$$

➤ **Pengenceran**

1. Doubling dilution

- ❖ Sediakan 8 tabung reaksi, beri tanda 1 s/d 8. Tambahkan 1 ml akudes masing-masing pada tabung reaksi 2 s/d 8.
- ❖ Pada tabung reaksi 1 tambah 2 ml larutan stok.
- ❖ Pada tabung reaksi 2 tambah 1 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 1. Campur dengan baik.
- ❖ Pada tabung reaksi 3 tambah 1 ml larutan yang diambil dari tabung reaksi 2. Campur dengan baik.
- ❖ 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.

Nomor Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8
Pengenceran Urea/Glukosa	Stok	1:1	1:3	1:7	1:15	1:31	1:63	1:127
Faktor	-	2	4	8	16	32	64	128

2. Decimal dilution

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

nomor tabung	1	2	3	4	5	6
faktor	stok	3	10	30	100	300

Pemeriksaan urea/ glukosa/ trigliserida

Kita akan menggunakan kit DisSys untuk pemeriksaan glukosa, trigliserida, dan urea. Cara kerjanya sebagai berikut :

- ❖ 1 ml darah diambil ke dalam wadah berisi EDTA. Menggunakan alat sentrifugasi klinik untuk memisahkan sel-sel darah dari plasma. Dibutuhkan masing-masing 10µl untuk pemeriksaan urea, glukosa, dan trigliserida.
- ❖ Pemeriksaan terhadap urea, glukosa, dan trigliserida berdasarkan reaksi enzim, sehingga kalau sampel tidak diperlakukan secara sama, hasilnya pasti kurang bagus.
- ❖ Oleh karena periode reaksi harus diatur dengan baik, setiap bagian dikerjakan satu per satu (yaitu inkubasi untuk sampel-sampel pengenceran *doubling* dan *decimal*, maupun pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea).
- ❖ Cara persiapan sampel plasma untuk pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea, atau sampel pengenceran *doubling* dan *decimal* (glukosa atau urea) dicatat di bawah ini:

	GLUKOSA	TRIGLISERIDA	UREA
Volume reagensia kit	1000 µl reagensia glukosa	1000 µl reagensia R2	1000 µl reagensia A, inkubasi pertama 1000 µl reagensia B
Volume sampel atau standar	10 µl	10 µl	10 µl
Konsentrasi standar	100 mg/dl	200 mg/dl	40 mg/dl
Periode dan temperature inkubasi	10 min @ 37°C	5 min @ 37°C	5 min @ 25°C
Periksa pada λ =	500 nm	500 nm	500 nm

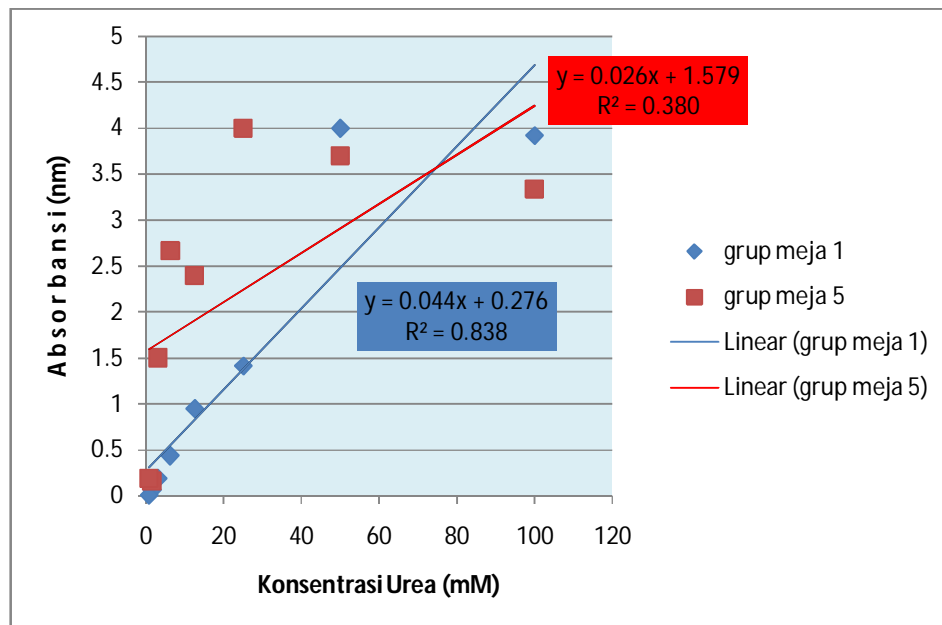
IV. Hasil Praktikum dan Kesimpulan

1. Kalibrasi Urea

Konsentrasi stok urea = 100 mg/ dL

Tabel 1a: Urea - Data hasil kalibrasi *doubling dilution*

Faktor	konsentrasi	grup meja 1	grup meja 5
1	100	3.921	3.340
2	50	4.000	3.698
4	25	1.414	4.000
8	12.500	0.951	2.393
16	6.250	0.437	2.666
32	3.125	0.193	1.503
64	1.563	0.069	0.159
128	0.781	0.007	0.194
Blanko	0	0	0



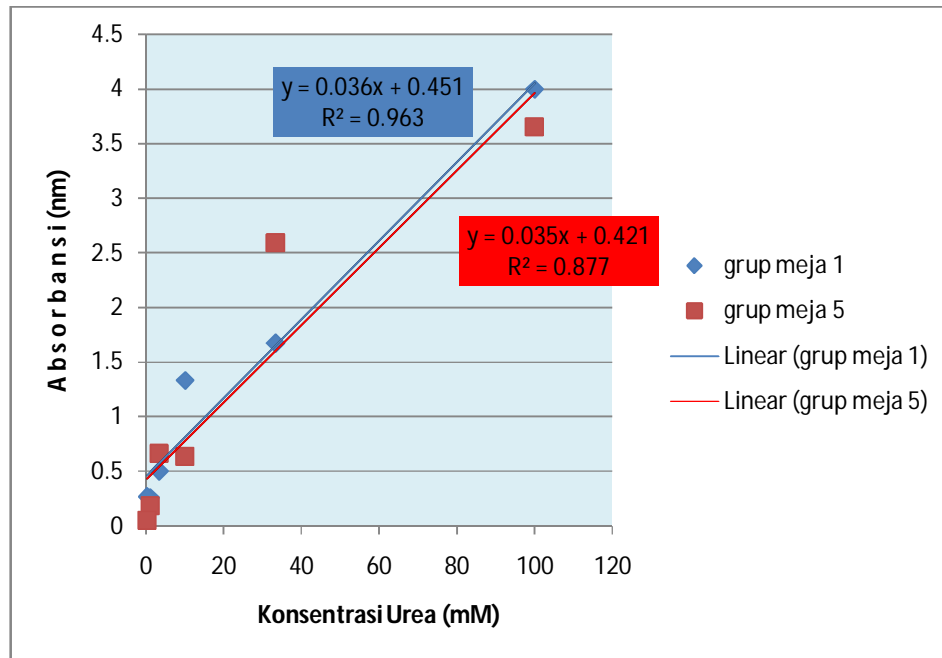
Gambar 1.a. Grafik hasil kalibrasi *doubling dilution* urea

Kesimpulan:

- a. Tingkat keakuratan (deviasi 'R') yang terukur kurang akurat (83,8% grup meja 1 dan 38% grup meja 5), hal ini menunjukkan bahwa pada saat pembuatan pengenceran larutan urea konsentrasinya kurang tepat, pengukuran volume reagensinya 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 grup meja 1 (83,8%) lebih akurat dibandingkan hasil percobaan grup meja 5 (38%), hal ini dipengaruhi oleh ketelitian praktikan dalam melakukan pengenceran.

Tabel 1b. Urea - Data hasil kalibrasi *decimal dilution*

faktor	konsentrasi	grup meja 1	grup meja 5
1	100	4.000	3.652
3	33.333	1.676	2.591
10	10	1.333	0.634
30	3.333	0.502	0.662
100	1	0.262	0.184
300	0.333	0.270	0.053
blanko	0	0	0



Gambar1.b. Grafik hasil kalibrasi *decimal dilution* urea

Kesimpulan:

- a. Tingkat keakurata (deviasi 'R') yang terukur 96,3% (grup meja 1) dan 87,7% (grup meja 5), hal ini menunjukkan bahwa pada saat pembuatan pengenceran larutan urea konsentrasinya tidak cukup tepat, pengukuran volume reagenya tidak tepat pada saat pembuatan larutan, 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 pola garis liner. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi urea yang digunakan cukup tinggi yang mungkin dikarenakan oleh kesalahan saat pengenceran sehingga absorbansi yang dihasilkan

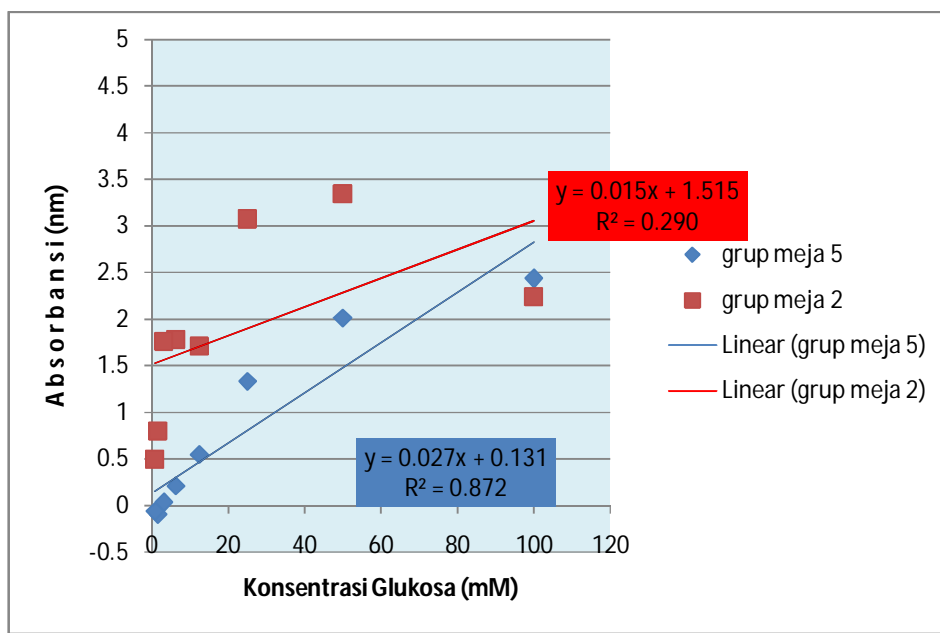
terlalu panjang. Seharusnya urea tersebut diencerkan lagi, agar hasilnya lebih akurat/dapat dipercaya.

- c. Pada saat dibuat persamaan linear, hasil percobaan grup meja 1 (96,3%) lebih akurat dibandingkan hasil percobaan grup meja 5 (87,7%), hal ini dipengaruhi oleh ketelitian praktikan dalam melakukan pengenceran.

2. Kalibrasi Glukosa

Tabel 2a: Glukosa - Data hasil kalibrasi *doubling dilution*

faktor	konsentrasi	grup meja 5	grup meja 2
1	100	2.434	2.237
2	50	2.013	3.338
4	25	1.336	3.073
8	12.500	0.546	1.710
16	6.250	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



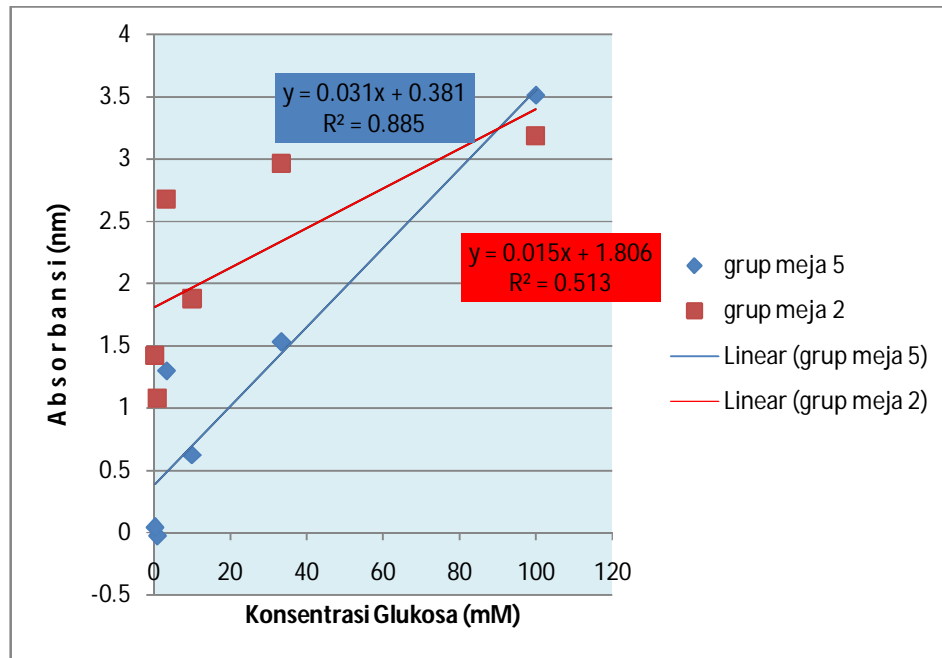
Gambar 2.a. Grafi hasil kalibrasi *doubling dilution* glukosa

Kesimpulan:

- a. Pada percobaan kedua grup meja 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.
- b. Hasil grup meja 2 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.
- c. Tingkat keakuratan (deviasi 'R') yang terukur 29% (grup meja 2) dan 87,2% (grup meja 5), hal ini menunjukkan bahwa pada saat pembuatan pengenceran larutan glukosa konsentrasinya tidak cukup tepat, pengukuran volume reagensinya 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.

Tabel 2b. Glukosa - Data hasil kalibrasi *decimal dilution*

faktor	konsentrasi	grup meja 1	grup meja 5
1	100	3.512	3.183
3	33.333	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 2.b. Grafik hasil kalibrasi *decimal dilution* glukosa

Kesimpulan:

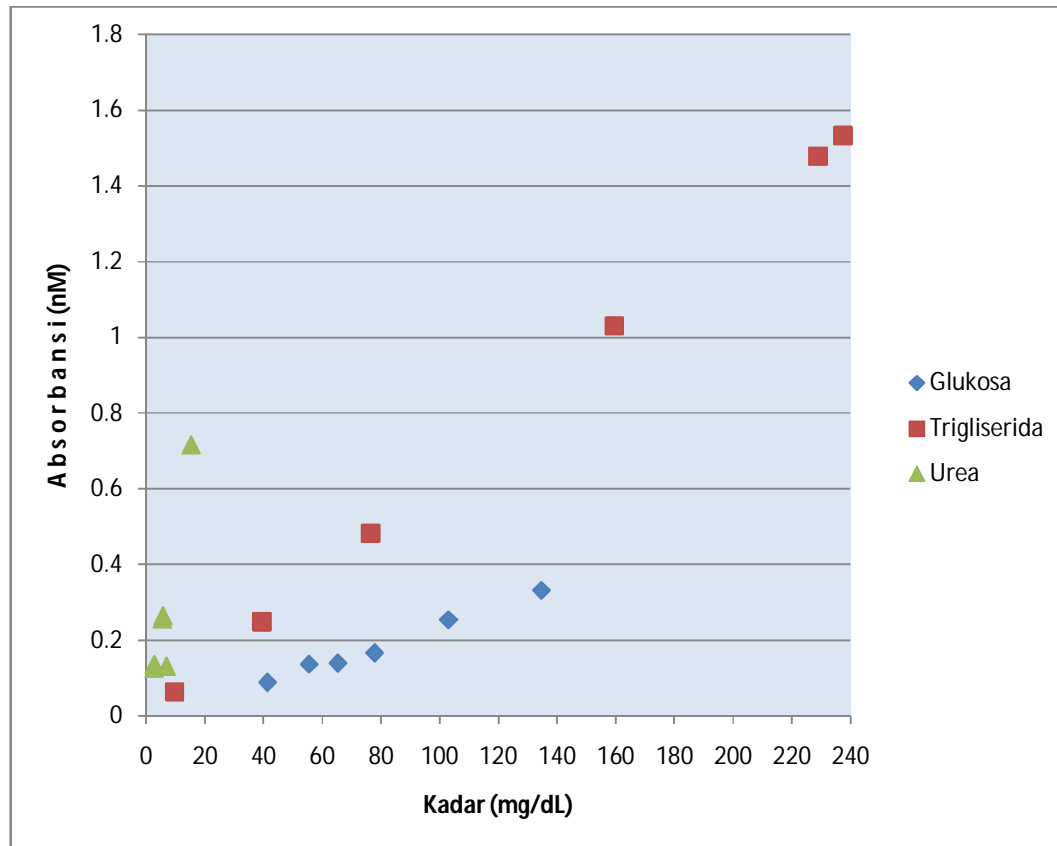
- Pada percobaan kedua grup meja menunjukkan adanya ketidaksesuaian dengan hukum *Beer-Lambert* ($A = \epsilon dc$), terlihat pada kebanyakan titik dimana konsentrasi tidak berbanding lurus dengan A, kemungkinan kesalahan pada saat membuat pengenceran glukosa yang tidak sesuai dengan konsentrasi yang diharapkan.
- Hasil grup meja 2 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 51,3% (grup meja 2) dan 88,5% (grup meja 5), 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.

3. Pemeriksaan glukosa, trigliserida, dan urea plasma mahasiswa

Tabel 3. Data hasil pemeriksaan glukosa, trigliserida, dan plasma mahasiswa

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	Yulia (A) Menu : 1 gelas susu herbal + pisang coklat Makan 1 jam sblm sampel diambil	0.2544	103.12	0.2486	39.55	0.1252	2.67
2	Frengki Menu: Nasi campur + telur+bakwan +the manis 1 jam sblm sampel diambil	0.1368	55.45	0.4807	76.48	0.1368	2.92
3	Henny Menu : Mie 10oring + air putih Makan 1 jam sblm sampel diambil	0.1393	65.25	1.0294	159.54	0.1314	7.01
4	Jekson Menu : Molen Makan 1 jam sblm sampel diambil	0.3320	134.58	1.5322	237.46	0.7163	15.29
5	Sari Menu : Nasi+ayam goreng +keju+kentang	0.0882	41.30	1.4772	228.93	0.2559	5.46
6	Rebecca Menu : Nasi+tempe+ayam goreng	0.1663	77.89	0.0638	9.88	0.2654	5.67



Gambar 3. Grafik hasil pengukuran sampel glukosa, trigliserida, dan urea mahasiswa

Kesimpulan :

Glukosa

- a. Bila diperhatikan pada tabel di atas untuk kelompok 1-6 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.
- b. Kadar glukosa pada kelompok 2, 3, dan 5 menunjukkan hasil yang cukup rendah, sedangkan waktu pengambilan sampel grup 2, 3, dan 5 sekitar 1 jam setelah makan. Kemungkinan pada kelompok 2, 3, dan 5 terdapat kesalahan sewaktu membuat larutan sampel, maka hasilnya tidak lagi akurat, kemungkinan terjadi kesalahan pada saat membuat larutan yang akan diukur.

Trigliserida

- a. Kadar trigliserida kelompok 4 cukup tinggi dengan pengambilan sampel 1 jam setelah makan. Bila dilihat dari komposisi makanan, kadar lemak dan karbohidrat untuk sampel kelompok 4 cukup tinggi, yaitu nasi, ayam goreng, keju, dan kentang. Trigliserida langsung meningkat saat makan karena langsung diserap dari makanan dalam bentuk kilomikron.
- b. Kadar trigliserida kelompok 5 juga tinggi akan tetapi makanan yang dikonsumsi sampel kelompok 5 hanya beberapa molen saja. Hal ini, mungkin dikarenakan sampel kelompok 5 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. Konsumsi karbohidrat yang cukup banyak akan mengaktifkan *Acetyl Co-A* yang akan digunakan untuk sintesis asam lemak dan trigliserida.

Urea

- a. Pada hasil seluruh kelompok menunjukkan hasil yang cukup beragam, hal ini dipengaruhi oleh jumlah protein yang dikonsumsi oleh setiap orang berbeda-beda, tetapi data ini tidak ada keterangan yang mendetail mengenai kandungan dan jumlah protein pada menu makanannya, sehingga tidak dapat diambil kesimpulannya.

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

Tabel 4. Data hasil konsentrasi glukosa dan urea dalam plasma yang dibaca pada grafik 1a s/d 2b serta yang dihitung melalui rumus kit

Jenis	Glukosa		Urea	
	Mahasiswa: J	Mahasiswa: R	Mahasiswa: H	Mahasiswa: S
Sampel serapan	0,332	0,166	0,131	0,256
Dari grafik 1a/2a	-101	1,296	-3,295	-50,885
Dari grafik 1b/2b	-98,267	-6,935	-8,889	-4,714
Dari rumus kit	134,413	77,570	2,795	5,464

Komentar :

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 :

- a. Pada masing-masing meja kerja untuk pengambilan reagen glukosa, urea dan trigliserida sebaiknya disediakan pipet Mohr, sehingga mahasiswa tidak perlu membawa pipet Mohr masing-masing, yang dapat berakibat terkontaminasinya reagen yang pada akhirnya dapat mempengaruhi hasil.
- b. Bisa dirancang praktikum selanjutnya dengan mengatur menu makanan yang mengandung karbohidrat yang tinggi untuk satu kelompok, trigliserida yang tinggi kelompok yang satunya dan protein yang tinggi kelompok yang lainnya, agar lebih bisa terlihat perbedaan proses metabolismenya postprandial.