

**Laporan Praktikum**  
**METABOLISME GLUKOSA, UREA DAN TRIGLISERIDA**  
**(TEKNIK SPEKTROFOTOMETRI)**

---

Hari / Tanggal Praktikum : Kamis / 11 Oktober 2012  
Nama Praktikan : Rica Vera Br. Tarigan dan Yulia Fitri Djaribun  
Pukul : 08.00 – 11.00

**A. TUJUAN PRAKTIKUM**

Agar mahasiswa/i dapat:

1. Melakukan teknik pengenceran secara doubling dilution maupun decimal dilution dengan benar.
2. Memahami prinsip dasar spektrofotometri
3. Melakukan pemeriksaan glukosa, urea dan trigliserida dengan menggunakan teknik spektrofotometri dengan benar
4. Menggunakan alat spektrofotometer dengan benar untuk membaca hasil serapan (*absorbance*)
5. Mengolah data yang diperoleh dari praktikum untuk memperoleh konsentrasi sesuai dengan hukum Beer-Lambert yang berlaku
6. Membuktikan hukum Beer-Lambert
7. Menggunakan alat sentrifuge untuk mendapatkan sampel plasma
8. Mengumpulkan data dari hasil praktikum
9. Membuat dan menginterpretasi grafik.

**B. ALAT DAN BAHAN**

Tourniquet	Tabung kaca bertutup	Alat spektrofotometer
Jarum(Spuit steril)	Swab alcohol	Tempat pembuangan sampah tajam
Pipetmohr (1ml&5ml)	EDTA	Tempat pembuangan sampah basah
Alat sentrifus klinik	Glukosa	Kit pemeriksaan urea
Alat spektrofotometer	Kuvet	Kit pemeriksaan glukosa
Waterbath 37 celcius	Tabung reaksi & rak	Kit pemeriksaan trigliserida
Pipet tetes	Kuvet plastik	Pipet otomatis 10µl - 100 µl

✚ Larutan stok yang disiapkan

Meja 1. Larutan stok urea: 10 ml larutan urea pada kadar 10g/L (atau 100mg/dL).

Jumlah bubuk urea yang dibutuhkan 0,1 g

Meja 2. Larutan stok glukosa : 10 ml larutan 100mM glukosa.

Jumlah bubuk glukosa yang dibutuhkan 0,18 g.

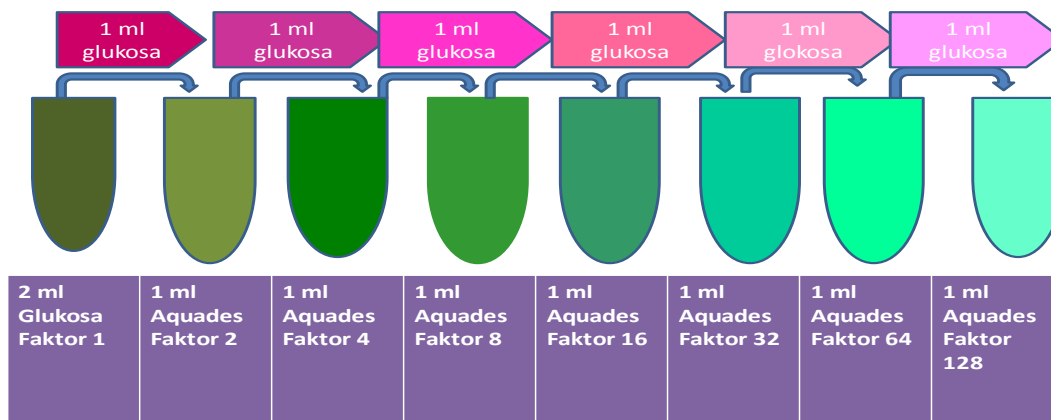
### C. CARA KERJA

**Pengenceran untuk kalibrasi dari larutan stok tersebut:**

Siapkan pengenceran berlipatganda (*doubling dilution*) serta pengenceran berdasar 10 (*decimal dilution*) dari larutan stok urea atau larutan stok glukosa.

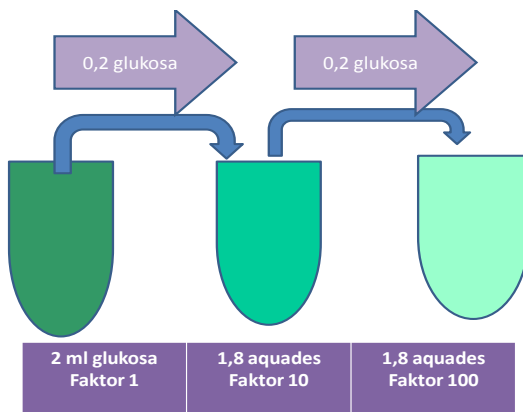
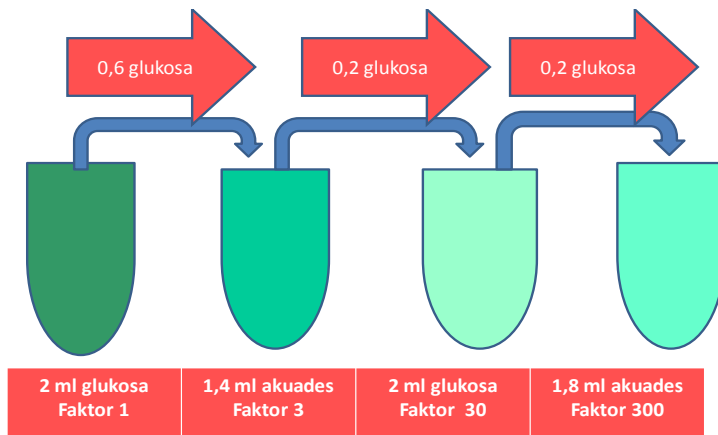
#### **Cara untuk *doubling dilution***

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. Demikian pada tabung berikutnya sampai tabung ke-8



#### **Cara untuk *decimal dilution***

1. Sediakan 6 tabung reaksi dalam rak tabung beri tanda 1 samapi 6
2. Siapkan pengenceran sesuai tabel



### 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  $\pm 500\mu\text{l}$  plasma tapi hanya  $10\mu\text{l}$  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

### **Untuk pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea**

1. 1ml darah vena dimasukkan dalam wadah yang telah berisi EDTA, sentrifuse  $\pm 15$  menit. EDTA berfungsi sebagai antikoagulan.
2. Ambil 23 tabung reaksi:
  - a. Tabung reaksi 1 : 1ml reagensia glukosa (blanko)
  - b. Tabung reaksi 2 : 1ml reagensia glukosa + 10 $\mu$ l glukosa standart (standart)
  - c. Tabung reaksi 3 : 1ml reagensia glukosa + 10 $\mu$ l plasma (sampel)
  - d. Tabung reaksi 4 : 1ml reagensia trigliserida (blanko)
  - e. Tabung reaksi 5 : 1ml reagensia trigliserida + 10 $\mu$ l trigliserida standart (standart)
  - f. Tabung reaksi 6 : 1ml reagensia trigliserida + 10 $\mu$ l plasma (sampel)
  - g. Tabung reaksi 7 : 1ml reagensia urea (blanko)
  - h. Tabung reaksi 8 : 1ml reagensia urea + 10 $\mu$ l urea standart (standart)
  - i. Tabung reaksi 9 : 1ml reagensia urea + 10 $\mu$ l plasma (sampel)

## D. Hasil dan Pembahasan

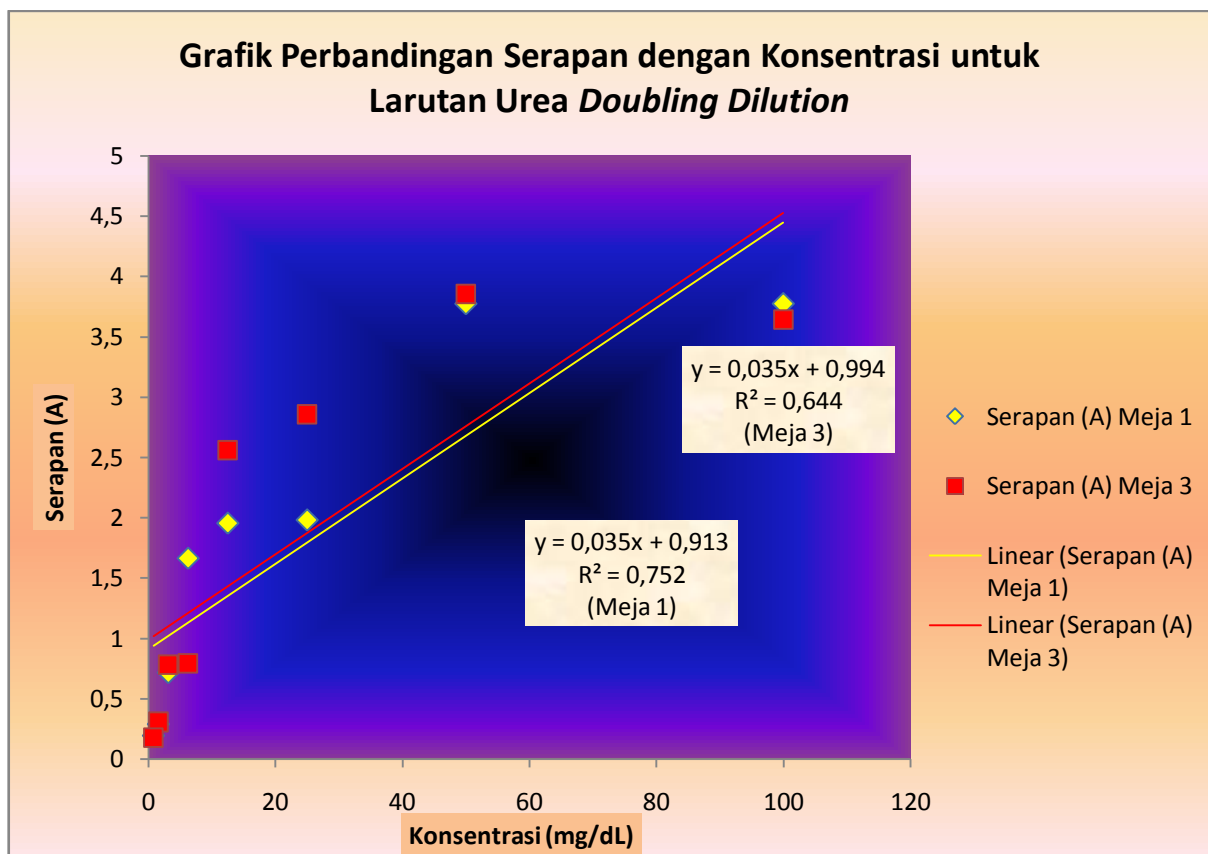
### 1. Urea

☀ Pengenceran Urea untuk *doubling dilution*

Konsentrasi Stok Urea = 100 mg/dL atau 0,16mM

Tabel 1a: Data untuk kalibrasi *doubling dilution* Urea

Faktor Pengenceran	Konsentrasi (mg/dL)	Serapan (A) Meja 1	Serapan (A) Meja 3
1	100	3,7733	3,644
2	50	3,7726	3,8539
4	25	1,9814	2,8591
8	12,5	1,9548	2,5624
16	6,25	1,6641	0,7944
32	3,125	0,7171	0,7829
64	1,5625	0,2904	0,309
128	0,78125	0,1952	0,1797



Gambar 1a. Grafik Perbandingan Serapan dengan Konsentrasi untuk Larutan Urea *Doubling Dilution*

Pembahasan:

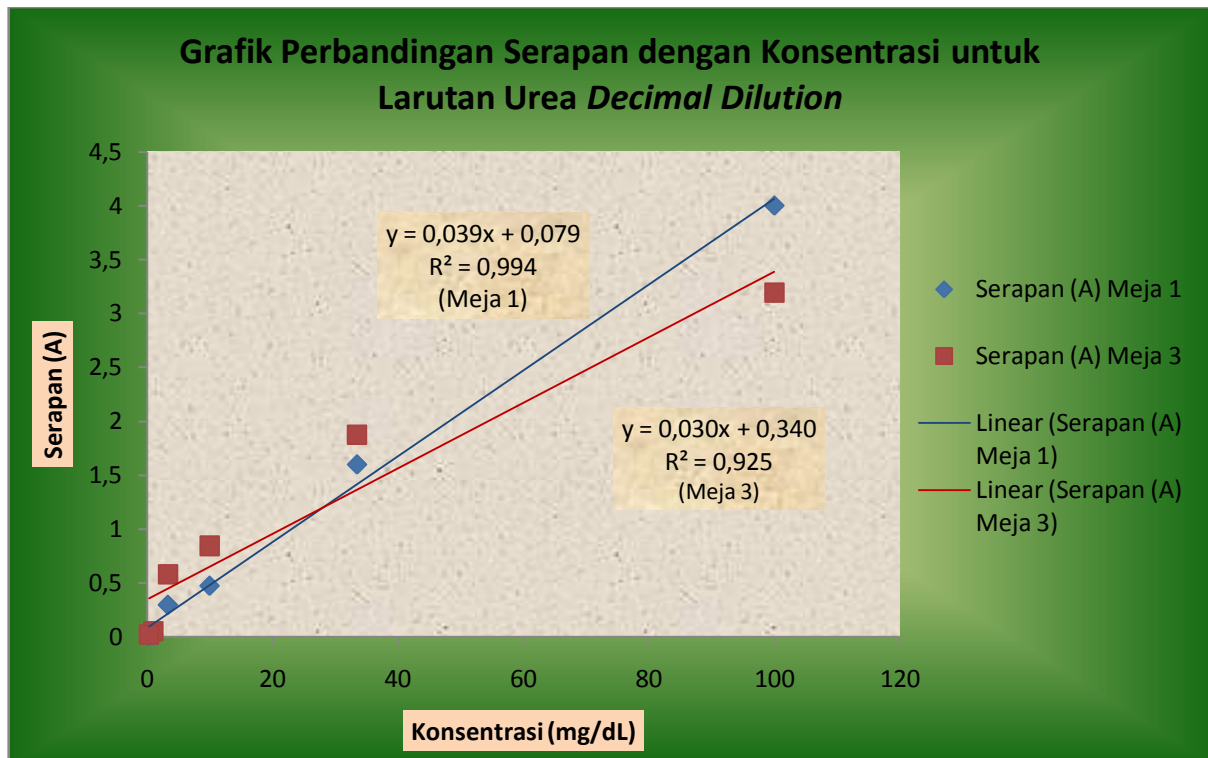
- Berdasarkan grafik diatas dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan nilai persamaan meja 1 dan meja 3. Meja 1,  $y=0,035x+ 0,913$  dengan  $R^2=0,752$  dan meja 3  $y=0,035x+ 0,994$  dengan  $R^2=0,664$  menunjukkan confidence level ( $R^2$ ) dari meja 3 yang sangat rendah  $R^2=0,664$  dan persamaan garis regresi tersebut menunjukkan ketidaklinearan data-data yang ada.
- Pada data kedua kelompok dalam grafik di atas, terlihat sebagian besar titik-titik data tidak berada pada satu garis linear (menyebarkan) sehingga terlihat bahwa sebagian besar hasil praktikum pada grafik ini tidak sesuai dengan hukum Beer-Lambert yang mengatakan Absorbansi adalah berbanding lurus dengan Konsentrasi yang menunjukkan adanya kesalahan pada saat melakukan praktikum. Kesalahan ini dapat berupa kesalahan dalam pengambilan reagen dan sampel, pengambilan volume larutan untuk pengenceran yang tidak tepat, dapat juga diakibatkan jarak antara inkubasi dengan pembacaan nilai absorbansi (serapan) terlalu lama.
- Berdasarkan nilai  $R^2$ , dapat diketahui bahwa diantara 2 kelompok tersebut meja 1 lebih teliti dalam mengerjakan percobaan yang diketahui bahwa jika nilai  $R^2$  mendekati 1 maka hasil percobaan semakin mendekati benar (teori).

☀ Pengenceran Urea untuk *decimal dilution*

Konsentrasi Stok Urea = 100 mg/dL atau 0,16mM

Tabel 1b: Urea-data untuk kalibrasi *decimal dilution*

Faktor Pengenceran	Konsentrasi (mg/dL)	Serapan (A) Meja 1	Serapan (A) Meja 3
1	100	4	3,1922
3	33,5	1,5977	1,8732
10	10	0,472	0,8422
30	3,35	0,2948	0,5763
100	1	0,0141	0,051
300	0,335	0,0023	0,0199



Gambar 1b. Grafik Perbandingan Serapan dengan Konsentrasi untuk Larutan Urea *Decimal Dilution*  
Pembahasan:

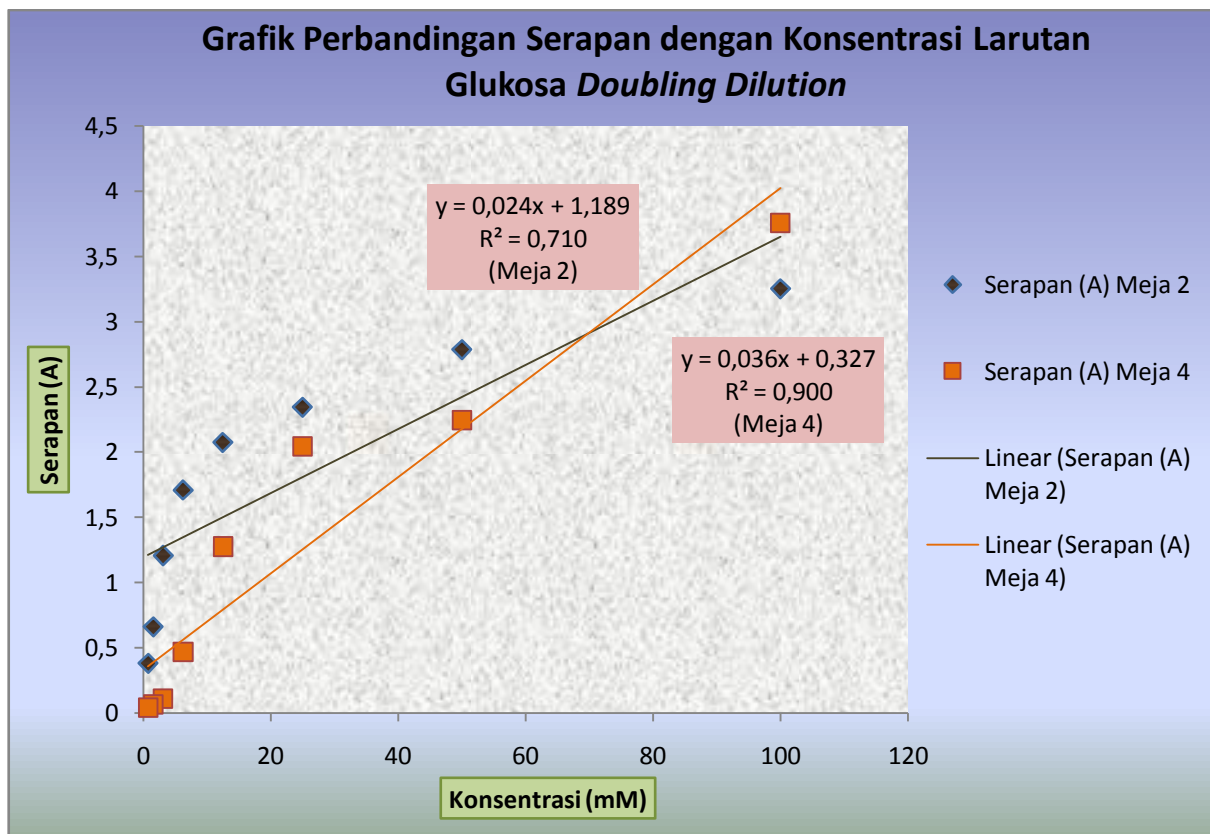
- a. Berdasarkan grafik diatas dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan nilai persamaan meja 1 dan meja 3. Meja 1,  $y=0,039x+ 0,079$  dengan  $R^2=0,994$  dan meja  $y=0,030x+ 0,340$  dengan  $R^2=0,925$ .
- b. Pada data kedua kelompok dalam grafik di atas, terlihat bahwa tidak semua data berada dalam 1 garis linear sesuai dengan hukum Beer-Lambert yang menyatakan Absorbansi adalah berbanding lurus dengan Konsentrasi dan pada meja 1 ada 3 data yang berada pada garis linear. Hal ini menunjukkan bahwa masih adanya kesalahan dalam melakukan praktikum. Kesalahan ini terjadi karena kurang ketelitian praktikan dalam mengambil volume larutan saat pengenceran.
- c. Berdasarkan nilai  $R^2$  dapat diketahui bahwa kedua kelompok ini menunjukkan pengerjaan prosedur percobaan yang cukup baik dimana kedua kelompok memperoleh nilai  $R^2=0,9$  yang mendekati 1.
- d. Kesalahan dalam pengerjaan *decimal dilution* lebih kecil dibandingkan dengan kesalahan dalam pengerjaan *doubling dilution*. Hal ini menunjukkan bahwa saat pengenceran praktikan sudah lebih berhati-hati dan memilih pipet yang tepat untuk mengambil larutan.

☀ Pengenceran Glukosa untuk *doubling dilution*

Konsentrasi Stok Glukosa = 100 mM

Tabel 2a: Glukosa-data untuk kalibrasi *doubling dilution*

Faktor Pengenceran	Konsentrasi (mM)	Serapan (A) Meja 2	Serapan (A) Meja 4
1	100	3,2527	3,7527
2	50	2,7859	2,242
4	25	2,3442	2,0393
8	12,5	2,0753	1,2728
16	6,25	1,709	0,4635
32	3,125	1,2075	0,1067
64	1,5625	0,661	0,0613
128	0,78125	0,3823	0,0386



Gambar 2a. Grafik Perbandingan Serapan dengan Konsentrasi Larutan Glukosa *Doubling Dilution*



Pembahasan:

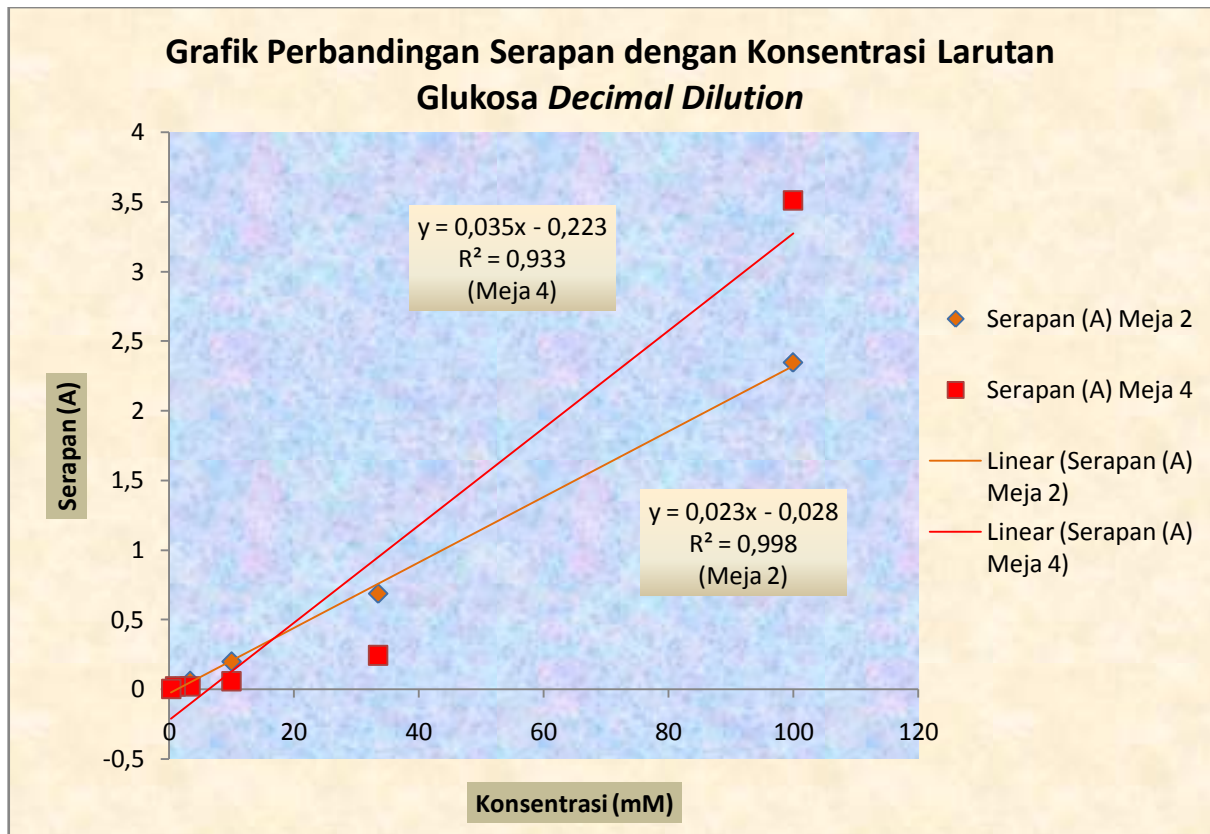
- a. Berdasarkan grafik di atas diketahui bahwa terdapat perbedaan nilai persamaan meja 2 dan meja 4. Untuk meja 2,  $y=0,024x+ 1,189$  dengan  $R^2=0,710$  dan meja 4,  $y=0,036x+ 0,327$  dengan  $R^2=0,900$ .
- b. Pada data kedua kelompok dalam grafik diatas diketahui bahwa tidak semua data berada dalam 1 garis linear sesuai dengan hukum dengan hukum Beer-Lambert yang menyatakan Absorbansi adalah berbanding lurus dengan Konsentrasi, dan pada meja 4 ada 2 titik yang berada pada garis linear. Dan ini menunjukkan bahwa masih adanya kesalahan dalam melakukan praktikum yang diakibatkan kurang ketelitian dari praktikan dalam melakukan pengenceran.
- c. Berdasarkan nilai  $R^2$  diketahui bahwa diantara 2 kelompok, meja 4 lebih teliti dalam melakukan praktikum dan data yang diperoleh lebih akurat yang memperoleh nilai  $R^2=0,900$  (mendekati 1).

☀ Pengenceran Glukosa untuk *decimal dilution*

Konsentrasi Stok Glukosa = 100 mM

Tabel 2b: Glukosa-data untuk kalibrasi *decimal dilution*

Faktor Pengenceran	Konsentrasi (mM)	Serapan (A) Meja 2	Serapan (A) Meja 4
1	100	2,3471	3,5128
3	33,5	0,6858	0,2425
10	10	0,1974	0,0544
30	3,35	0,0582	0,0176
100	1	0,0169	0,0174
300	0,335	0,0056	0,0009



Gambar 2b. Grafik Perbandingan Serapan dengan Konsentrasi Larutan Glukosa *Decimal Dilution*

Pembahasan:

- a. Berdasarkan grafik di atas diketahui adanya perbedaan nilai persamaan meja 2 dan meja 4 Meja 4,  $y=0,035x-0,223$  dengan  $R^2=0,933$  dan meja 2  $y=0,023x-0,028$  dengan  $R^2=0,998$
- b. Pada data kedua kelompok dalam grafik diatas, terlihat bahwa kedua meja ini memiliki data yang sebagian besar sudah berada dalam garis linear, tetapi masih belum semua data berada dalam 1 garis linear sesuai dengan hukum dengan hukum Beer-Lambert yang menyatakan Absorbansi adalah berbanding lurus dengan Konsentrasi, dan pada meja 2 ada 4 titik yang berada pada garis linear. Hal ini menunjukkan bahwa masih adanya kesalahan dalam melakukan praktikum dimana praktikan masih belum teliti dalam mengambil volume larutan untuk pengenceran.
- c. Berdasarkan nilai  $R^2$  yang diperoleh setiap kelompok dapat diketahui hasil yang mendekati benar dan data yang dihasilkan lebih akurat. Meja 2 memperoleh nilai  $R^2=0,998$  yang menunjukkan bahwa data yang diperoleh meja 2 lebih akurat dan diketahui bahwa praktikan di meja 2 lebih teliti dalam melakukan pengukuran.
- d. Kesalahan yang terjadi pada *decimal dilution* tidak menyimpang jauh jika dibandingkan dengan kesalahan yang terjadi pada *doubling dilution*. Hal ini dapat diketahui dari perolehan nilai  $R^2$ .

- ☀ Hasil perhitungan konsentrasi glukosa dan urea dalam plasma berdasarkan persamaan pada grafik dan rumus kit.

Tabel 3. Konsentrasi Glukosa dan Urea dalam Plasma

	Glukosa		Urea	
	Group 2	Group 4	Group 1	Group 3
Serapan Sampel	0,2544	0,2544	0,1252	0,1252
Dari grafik 1a/2a	-38,94	-8,82	-25,96	-28,27
Dari grafik 1b/2b	1,47	6,62	-1,90	-11,20
Dari rumus kit	103,12	103,12	2,673	2,673

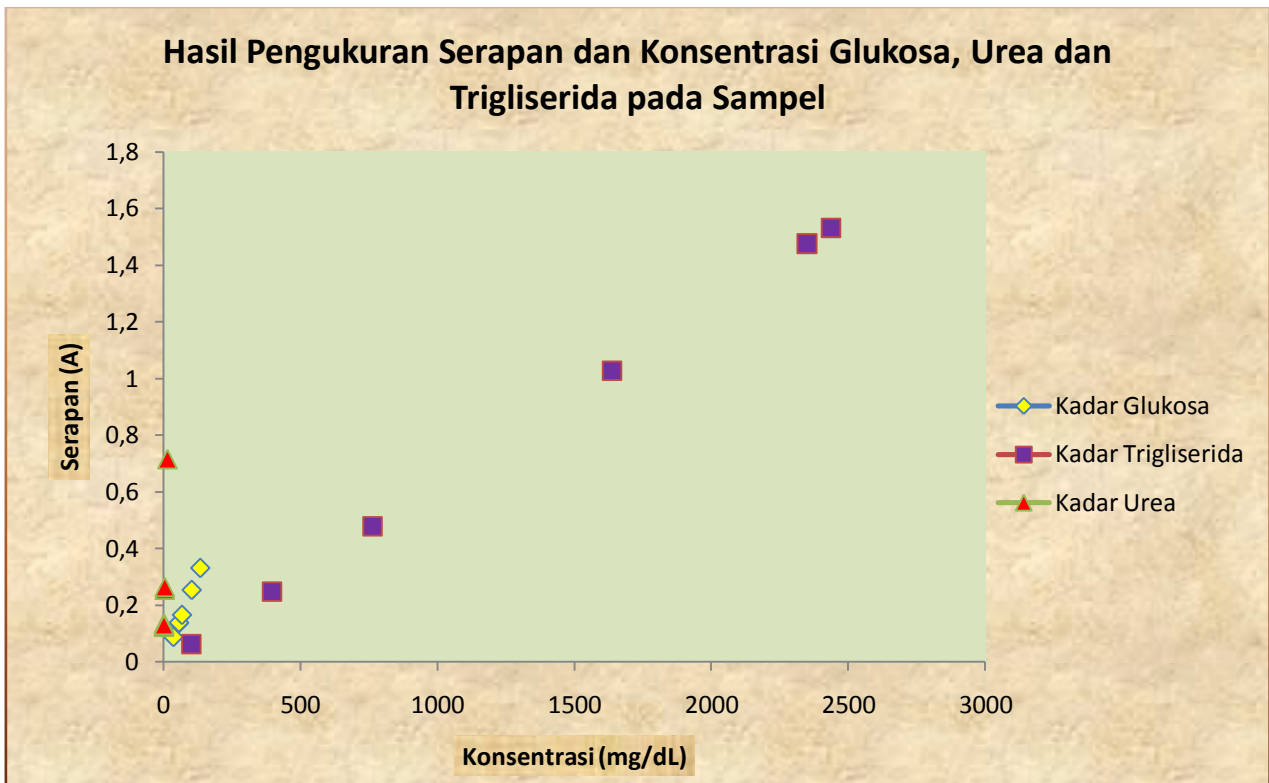
Pembahasan:

- Dari data konsentrasi glukosa dan urea yang diperoleh ada yang nilai negatif yang menunjukkan bahwa konsentrasi glukosa dan urea berada dibawah blanko.
- Dari tabel 5 bisa kita lihat bahwa pada konsentrasi glukosa dan urea pada masing-masing kelompok berbeda antara rumus kit dengan persamaan regresi yang didapat dari grafik 1a/2a dan 1b/2b . Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu:
  - Proses reaksi kimia yang terjadi pada sebagian sampel tidak keseluruhannya mengikuti hukum Beer Lambert, sehingga mempengaruhi data dan persamaan regresi yang didapat dari subjek yang tidak mewakili dari keseluruhan populasi.
  - Kesalahan yang terjadi dapat disebabkan antara lain kontaminasi reagensia, lamanya sampel terinkubasi pada suhu kamar sebelum dibaca nilai absorbansi (serapan) pada spektrofotometer.
  - Kesalahan dalam mengambil volume larutan pada saat pengenceran dan tidak tepatnya proses labeling pada sampel karena banyaknya sampel yang harus disiapkan.

- ☀ Hasil pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea masing-masing praktikan yang diambil darahnya sebagai sampel berdasarkan rumus kit.

Tabel 4. Hasil Pemeriksaan Glukosa, Trigliserida dan Urea Plasma Mahasiswa

Detail-detail Mahasiswa	Glukosa		Trigliserida		Urea	
	A	Kadar (mg/dL)	A	Kadar (mg/dL)	A	Kadar (mg/dL)
<b>Yulia</b> Menu: susu herbal + pisang coklat Waktu: 1 jam sebelumnya	0,2544	103,12	0,2486	395,545	0,1252	2,673
<b>Frengki</b> Menu: Nasi komplit + Teh manis Waktu: 1 jam sebelumnya	0,1368	55,45	0,4801	763,88	0,1368	2,92
<b>Jekson</b> Menu: 20 molen Waktu: 1 jam sebelumnya	0,3320	134,57	1,5322	2437,86	0,7163	15,29
<b>Sari</b> Menu: Nasi putih + ayam goreng + kentang goreng + keju Waktu: 1 jam sebelumnya	0,0882	35,75	1,4772	2350,35	0,2559	5,45
<b>Henny</b> Menu: mie goreng Waktu: 1 jam sebelumnya	0,1393	56,46	1,0294	1637,87	0,1314	2,80
<b>Rebecca</b> Menu: Nasi putih Komplit + gorengan Waktu: Nasi Putih komplit 4 jam sebelumnya, gorengan 1 jam sebelumnya	0,1663	67,40	0,0638	101,51	0,2654	5,66



Gambar3. Grafik Hasil Pengukuran Serapan dan Konsentrasi Glukosa, Ura dan Triglicerida

Pembahasan:

➤ Glukosa

- a. Dari data yang diperoleh diketahui bahwa Yulia dan Jekson memiliki kadar glukosa yang tinggi dibandingkan dengan ke empat sampel yang lain.
- b. Kadar glukosa yang diperoleh jika dibandingkan dengan konsumsi makanan sebelum pengambilan darah tidak sesuai. Hal ini disebabkan dari kesalahan pengambilan sampel dan waktu inkubasi ke pembacaan absorbansi terlalu lama sehingga hasil absorbansi yang diperoleh tidak sesuai serta dapat juga disebabkan oleh perbedaan metabolisme glukosa di dalam tubuh setiap sampel.

➤ Triglicerida

- a. Kadar triglicerida yang diperoleh dari sampel sangat tinggi. Hal ini karena konsumsi makanan sebelum pengambilan sampel darah mengandung lemak dan karbohidrat yang tinggi.
- b. Pada sampel 3 (Jekson) memiliki kadar triglicerida yang tertinggi dan sampel 4 (sari) juga termasuk memiliki kadar triglicerida yang tinggi. Untuk sampel 4 konsumsi makanan mengandung lemak yang cukup besar sesuai dengan kadar triglicerida, sedangkan pada sampel 3 konsumsi makanan yang mengandung lemak tidak sebesar pada sampel 4. Dalam hal ini kemungkinan adanya pengambilan sampel atau pengerjaan percobaan yang tidak benar.

➤ Urea

- a. Kadar urea yang diperoleh dari hasil percobaan menunjukkan data yang normal karena hanya satu sampel (sampel 3) yang kadar urea nya jauh dari sampel yang lain. Hal ini disebabkan oleh pengerjaan yang salah saat praktikum sehingga data yang diperoleh kurang akurat.

**E. Kesimpulan dan Saran**

Kesimpulan:

1. Ketidaklinearan data pada grafik dapat disebabkan oleh banyak faktor antara lain kontaminasi reagensia, lamanya sampel terinkubasi pada suhu kamar sebelum dibaca nilai serapan (absorbansi) pada spektrofotometer, kesalahan prosedur pengenceran dan tidak tepatnya proses labeling pada sampel karena banyaknya sampel yang harus disiapkan sehingga persiapan sebelum kegiatan praktikum mencakup persiapan alat, bahan dan penjelasan tentang prosedur yang baku menjadi hal yang harus diperhatikan.
2. Pengetahuan mengenai alat spektrofotometer sangatlah penting termasuk pengetahuan tentang batasan konsentrasi larutan yang mampu terbaca oleh alat tersebut karena konsentrasi larutan stok tidak boleh terlalu tinggi ataupun terlalu rendah. Konsentrasi larutan stok yang terlalu tinggi akan sulit dibaca oleh Spektrofotometer atau akan melewati batas maksimum deteksi sehingga pembacaan absorbansi menjadi tidak akurat.
3. Pengetahuan mengenai lamanya batasan waktu sampel boleh terinkubasi pada suhu kamar dan pengaturan waktu yang baik penting untuk diketahui karena bila sampel terlalu cepat disiapkan sedangkan alat spektrofotometer terbatas, menyebabkan terjadinya reaksi kimia sebelum alat masuk ke spektrofotometer yang mengubah hasil pembacaan absorbansi.
4. Nilai  $R^2$  yang mendekati 1 menunjukkan bahwa data yang diperoleh semakin akurat dan praktikan yang melakukan percobaan lebih teliti.
5. Dari grafik diperoleh persamaan regresi linear yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi glukosa dan urea pada sampel, tetapi tidak dapat dijadikan acuan karena dari hasil diperoleh konsentrasi yang negatif yang menunjukkan bahwa konsentrasi sampel lebih kecil dari 0.
6. Perbedaan konsentrasi (kadar) pada sampel karena adanya perbedaan konsumsi makanan pada setiap sampel dan perbedaan jumlah sampel yang digunakan serta jarak pengambilan sampel darah yang berbeda.

Saran:

1. Pada kegiatan praktikum spektrofotometri banyak sampel yang harus disiapkan, prosedur yang harus dikerjakan dan banyak alat yang digunakan dan dibutuhkan waktu yang cukup banyak untuk menyelesaikan praktikum ini, sehingga diharapkan untuk praktikum berikutnya pengaturan waktu, pengaturan prosedur yang jelas dan persiapan alat dan bahan yang memadai sangat diperlukan untuk memperoleh hasil maksimal.
2. Kekurangpahaman praktikan dalam melakukan praktikum merupakan kesalahan yang paling sering terjadi dalam pelaksanaan praktikum. Untuk itu diharapkan setiap sebelum praktikum praktikan sudah harus menguasai prosedur yang akan dilakukan.
3. Perlakuan untuk pengenceran stok sebaiknya konsentrasi diperbesar sehingga memudahkan praktikan melakukan pengenceran dan mengurangi kesalahan dalam melakukan pengenceran.