

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

Nama : Hadiyatur Rahma (147008004)
Meutia Atika Faradilla (147008014)

Tanggal Praktikum : 10 Maret 2015

Tujuan Praktikum :

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

Alat dan Bahan :

| | | |
|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Tourniquet | swab alkohol | tempat pembuangan yg tajam |
| Jarum | EDTA | tempat pembuangan yg 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 10µl - 100µl |
| pipet tetes | kuvet plastik | alat spektrofotometer |

Protap pemeriksaan glukosa, protein dan urea menggunakan spektrofotometri :

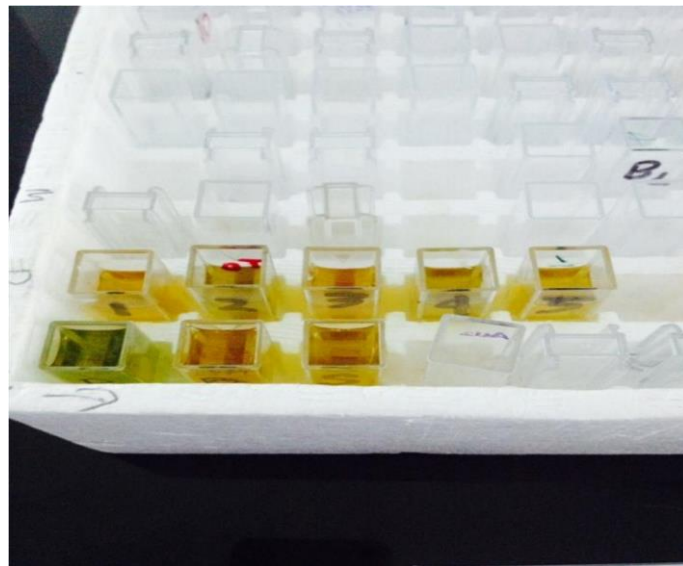
| | GLUKOSA | PROTEIN | UREA |
|----------------------|--------------------------|------------------|--|
| volume reagensia kit | 1000µl reagensia glukosa | 1000µl reagensia | 1000µl reagensia A , inkubasi pertama 1000µl reagensia B |

| | | | |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 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 $^{\circ}$ C | 10 min @ 37 $^{\circ}$ C | 5 min @ 25 $^{\circ}$ C ** 2X** |
| periksa pada λ = | 500nm | 530nm | 600nm |

Persiapan panjang gelombang max :

a. Urea :

- Untuk melakukan pemeriksaan absorbansi urea menggunakan spektrofotometri harus dibuat terlebih dahulu larutan blanko dan larutan standar urea berdasarkan petunjuknya pada kit urea.
- Siapkan 40 mg/dl standard urea dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan λ : 500-700 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standard dan sampel



Gambar 1. larutan urea pada kuvet yang berisi larutan standar, larutan sampel dan blanko

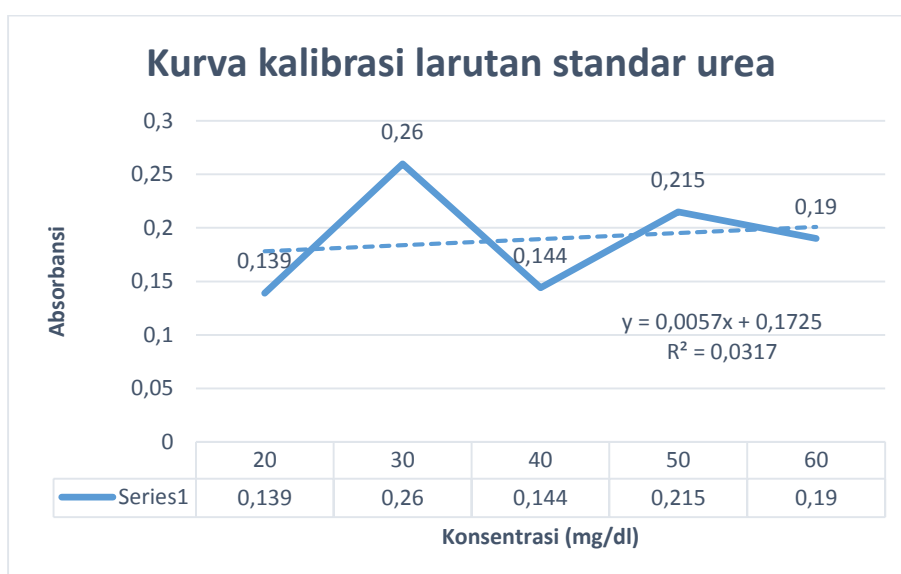


Gambar 2. Spektrofotometri

Didapatkan panjang gelombang maksimal larutan standar urea 40ml menggunakan spektrofotometri yaitu $\lambda = 689,5 \text{ nm}$. Dengan menggunakan panjang gelombang diatas dilakukan pemeriksaan absorbansi pada setiap larutan standar urea yang telah dibuat. Dan diperoleh datanya pada tabel dibawah ini

Tabel 1a : Urea – data kalibrasi larutan standar urea

| Konsentrasi yang diinginkan [mg/dl] | Absorbansi | Konsentrasi yang didapat [mg/dl] |
|-------------------------------------|--------------|----------------------------------|
| 20 | 0,139 | 0,190 |
| 30 | 0,260 | 0,261 |
| 40 | 0,144 | 0,1733 |
| 50 | 0,215 | 0,1737 |
| 60 | 0,190 | 0,191 |



Pembahasan :

Konsentrasi larutan standar yang digunakan adalah 40 mg/ dl dan absorbansi standar yang digunakan adalah absorbansi larutan **40ml yaitu 0,144**. Larutan 40ml dijadikan patokan karena memiliki **panjang gelombang maksimal**.

Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu $Y = 0,0057x + 0,1725$ dengan nilai

$R^2 = 0,0317$. Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi tidak linear dan hasil yang diperoleh tidak akurat.

Untuk mengetahui apakah suatu unsur memenuhi Hukum Beer atau tidak maka perlu ditentukan grafik kalibrasi absorbansi vs 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 akan 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 sebuah senyawa maka semakin banyak cahaya yang akan diserap.

Dari grafik diatas dapat kita lihat bahwa konsentrasi larutan tidak berbanding lurus dengan absorbansinya, terdapat konsentrasi larutan yang tinggi namun absorbansinya rendah sehingga didapatkan grafik yang naik turun karena data yang diperoleh tidak linear.

Kesimpulan :

- Larutan standar urea diatas tidak memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi tidak berupa garis lurus.
- Ketidak sesuaian larutan standar dengan hukum lambret-beer dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya kesalahan dalam membuat larutan, larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen.
- Dalam pembuatan sebuah larutan, harus dilakuka secara teliti dan berhati-hati agar hasil konsentrasi yang diinginkan bisa sesuai dengan konsentrasi yang didapat. Kesesuaian konsentrasi ini dapat dibuktikan dengan sprektofotometri.

- Pada larutan standar urea diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dan larutan yang diprediksi. Hal ini disebabkan oleh beberapa factor seperti kesalahan dalam perhitungan pancairan, kesalahan dalam mencampurkan larutan standar dengan reagen dari kit juga tidak meratanya pengadukan larutan sehingga belum homogen.

Persiapan panjang gelombang max :

b. Glukosa :

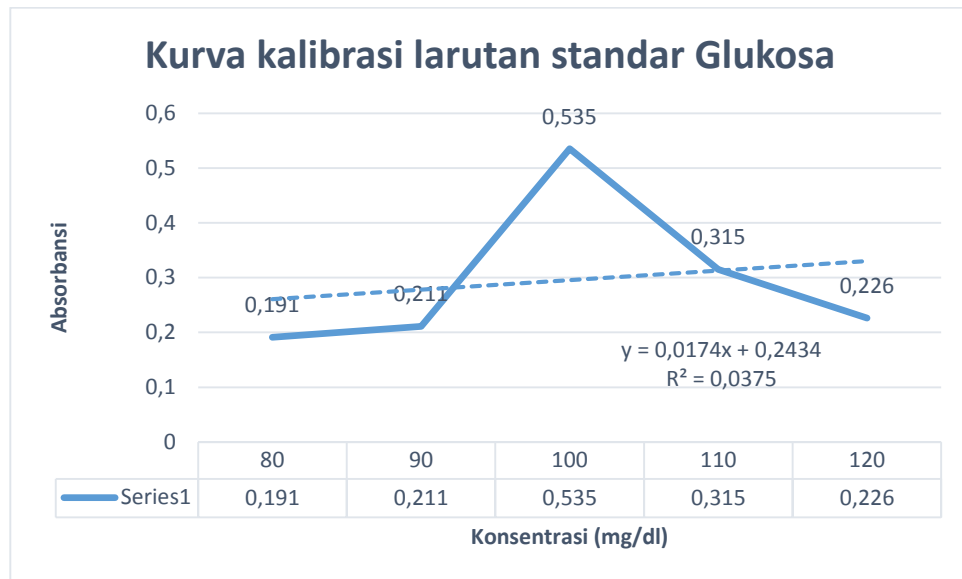
- Siapkan 100 mg/dl standard glukosa dan tentukan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan λ : 400-600 nm
- Gunakan panjang gelombang maksimum ini untuk penentuan absorbansi kurva standard dan sampel

Didapatkan panjang gelombang maksimal menggunakan larutan standar glukosa 100 ml yaitu $\lambda = 479,0 \text{ nm}$

Dengan menggunakan panjang gelombang diatas dilakukan pemeriksaan absorbansi pada setiap larutan standar urea yang telah dibuat. Dan diperoleh datanya pada tabel dibawah ini :

Tabel 2a. Data hasil kalibrasi larutan standar glukosa

| Konsentrasi yang diinginkan [mg/dl] | Absorbansi | Konsentrasi yang didapat [mg/dl] |
|-------------------------------------|--------------|----------------------------------|
| 80 | 0,191 | -3,011 |
| 90 | 0,211 | -1,862 |
| 100 | 0,535 | 16,759 |
| 110 | 0,315 | 4,115 |
| 120 | 0,226 | -1 |



Pembahasan :

Konsentrasi larutan standar yang digunakan adalah 100 mg/ dl dan absorbansi standar yang digunakan adalah absorbansi larutan **100ml yaitu 0,535**. Larutan 100ml dijadikan patokan karena memiliki **panjang gelombang maksimal**. Panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu. Dari grafik diatas didapat persamaan regresi yaitu **$Y = 0,0174x + 0,2434$** dengan nilai

$R^2 = 0,0375$. Hal ini menunjukkan bahwa grafik kalibrasi tidak linear dan hasil yang diperoleh tidak akurat. Dari grafik diperoleh persamaan regresi linear yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi larutan yang didapat

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 absorbansi. Seharusnya ketika konsentrasi sebuah larutan semakin besar maka absorbansinya juga akan semakin besar.

Kesimpulan ;

1. Larutan standar glukosa diatas tidak memenuhi hukum lambert beer karena hasil kalibrasi tidak berupa garis lurus.

2. Ketidak sesuaian larutan standar dengan hukum lambret-beer dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya kesalahan dalam membuat larutan, larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen, adanya serapan oleh pelarut dan oleh kuvet.
3. Pada larutan standar glukosa diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dan larutan yang diinginkan. Hal ini disebabkan oleh beberapa factor seperti kesalahan dalam perhitungan pengenceran, kesalahan dalam mencampurkan larutan standar dengan reagen dari kit juga tidak meratanya pengadukan larutan sehingga belum homogen.
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 larutan yang didapat, tetapi tidak dapat dijadikan acuan karena dari hasil diperoleh konsentrasi yang negatif yang menunjukkan bahwa konsentrasi sampel lebih kecil dari 0.

Tabel 2b. 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 | 0,215 | 86,35 |
| 4 | 37.5 | 0,203 | 81,53 |
| 8 | 18.75 | 0,262 | 105,22 |
| 16 | 9.375 | 0,317 | 127,31 |
| 32 | 4,687 | 0,243 | 97,59 |
| 64 | 2.343 | 0,242 | 97,19 |
| 128 | 1.17 | 0,114 | 45,78 |

Pembahasan :

Dari tabel diatas dapat diketahui bahwa konsentrasi larutan sampel glukosa yang diprediksi dengan konsentrasi yang didapat dari hasil spektrofotometri berbeda. Panjang gelombang yang digunakan untuk pemeriksaan larutan sampel glukosa sesuai dengan kit yaitu $\lambda = 500 \text{ nm}$. Perbedaan ini bisa disebabkan karena kesalahan pada pembuatan larutan. Volume larutan glukosa yang dibutuhkan sangat sedikit yaitu $10 \mu\text{l}$ sehingga kemungkinan pada saat memasukkan ke dalam tabung reaksi larutan tidak seluruhnya bercampur dengan reagen, selain itu waktu persiapan sampel di cuvet dengan pengukuran absorbansi di spektrofotometer juga lama yang mengakibatkan larutan kurang homogen. Kesalahan juga dapat terjadi pada saat pengkalibrasian spektrofotometer yang digunakan.

Kesimpulan :

1. Pada larutan sampel glukosa diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dan larutan yang diprediksi.
2. Ketidak sesuaian tersebut dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya kesalahan dalam membuat larutan, larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen, adanya serapan oleh pelarut dan oleh kuvet.

Tabel 2c. Data hasil pengukuran kalibrasi larutan sampel pengenceran glukosa
Glukosa desimal dilution (Konsentrasi stok glukosa 150 mg/dl)

| Pengenceran | Faktor | Konsentrasi yang diprediksi (mg/dl) | Absorbansi | Konsentrasi yang didapat (mg/dl) |
|--------------------|---------------|--|-------------------|---|
| 0,1X | 10 | 15 | 0,208 | 83,53 |
| 0,01X | 100 | 1,5 | 0,306 | 122,89 |
| 0,001X | 1000 | 0,15 | 0,218 | 87,55 |
| 0,3X | 30 | 5 | 0,246 | 98,79 |
| 0,03X | 300 | 0,5 | 0,234 | 93,93 |

| | | | | |
|--------|------|------|-------|------|
| 0,003X | 3000 | 0,05 | 0,023 | 9,24 |
|--------|------|------|-------|------|

Pembahasan :

Dari tabel diatas dapat diketahui bahwa konsentrasi larutan sampel glukosa yang diprediksi dengan konsentrasi yang didapat dari hasil spektrofotometri berbeda. Panjang gelombang yang digunakan untuk pemeriksaan larutan sampel glukosa sesuai dengan kit yaitu $\lambda = 500 \text{ nm}$. Perbedaan ini bisa disebabkan karena kesalahan pada pembuatan larutan. Volume larutan glukosa yang dibutuhkan sangat sedikit yaitu 10 μl 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.

Kesimpulan :

1. Pada larutan sampel glukosa diatas terdapat ketidaksesuaian antara larutan yang didapat dan larutan yang diprediksi.
2. Ketidak sesuaian tersebut dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya kesalahan dalam membuat larutan, larutan yang dibuat tidak tercampur dengan baik sehingga hasilnya tidak homogen, adanya serapan oleh pelarut dan oleh kuvet.

Tabel 3. Perbandingan Konsentrasi sampel Glukosa yang dihitung pada grafik kalibrasi dan yang dihitung dengan rumus pada reagensia test kit

| Pemeriksaan Sampel pengenceran Glukosa | Konsentrasi pada grafik kalibrasi (mg/dl) | Konsentrasi pada reagensia test kit (mg/dl) |
|--|---|---|
| 0,1X | 3,589 | 122,89 |
| 0,01X | 0,149 | 98,79 |
| 0,001X | -12,66 | 9,23 |

| | | |
|------------|--------|--------|
| 0,3X | -2,3 | 83,53 |
| 0,03X | -1,45 | 87,55 |
| 0,003X | -0,54 | 93,98 |
| Faktor 2 | -1,632 | 86,35 |
| Faktor 4 | -2,321 | 81,53 |
| Faktor 8 | 0,106 | 105,22 |
| Faktor 16 | 4,22 | 127,31 |
| Faktor 32 | -0,022 | 97,59 |
| Faktor 64 | 0,08 | 97,19 |
| Faktor 128 | -5,571 | 45,78 |

Pembahasan :

Menghitung konsentrasi sampel glukosa dengan rumus persamaan regresi linear pada 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.

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

Dimana : C = konsentrasi larutan

A = Absorbansi

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. Konsentrasi yang didapat menggunakan reagensia test kit lebih akurat dibandingkan menggunakan kurva kalibrasi. 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 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.

Kesimpulan :

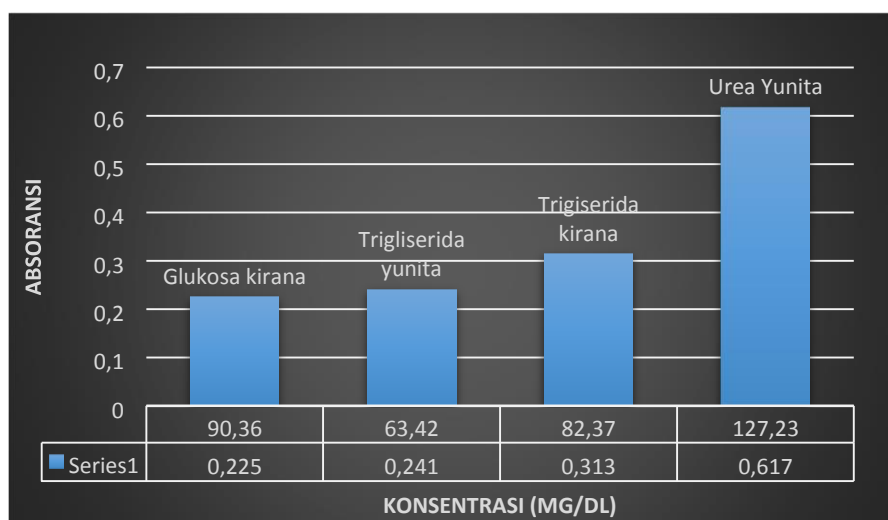
1. Terdapat perbedaan grafik antara konsentrasi sampel yang didapat menggunakan grafik kalibrasi dan menggunakan rumus pada reagensia test kit.
2. Hasil konsentrasi yang didapat menggunakan rumus pada reagensia test kit cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan grafik kalibrasi.
3. Konsentrasi sampel yang didapat menggunakan grafik kalibrasi dan menggunakan rumus pada reagensia test kit keduanya tidak memenuhi hukum lambert beer karena tidak memenuhi garis lurus (linear). Hal ini bermakna bahwa peningkatan konsentrasi tidak disertai dengan peningkatan absorbansi larutan.
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 larutan yang didapat, tetapi tidak dapat dijadikan acuan karena dari hasil diperoleh konsentrasi yang negatif yang menunjukkan bahwa konsentrasi sampel lebih kecil dari 0.

Tabel 5 Hasil pemeriksaan glukosa, trigliserida dan urea plasma mahasiswa

| detil 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 | - | - | 0,241 | 63,42 mg/dl | 0,167 | 127,23 mg/dl |
| Makanan : makan ifumie Waktu : 1jam sebelum pemeriksaan | | | | | | |

| | | | | | | |
|--|-------|-------------|-------|-------------|---|---|
| 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 | - | - |
|--|-------|-------------|-------|-------------|---|---|

Kurva 4. Perbandingan kadar glukosa, trigliserida dan urea mahasiswa



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.

GLUKOSA

Dari data diatas kadar glukosa Kirana Patrolina 90,36 mg/dl. Hal ini mih dalam batas normal karena kadar glukosa darah 2 jam setelah makan adalah < 200mg/dl. Ketika makanan dikunyah,makanan akan bercampur dengan air liur yang mengandung enzim ptialin (suatu α amilase yang disekresikan oleh kelenjar parotis di dalam mulut).Enzim ini menghidrolisis pati(salah satu polisakarida) menjadi maltosa dan gugus glukosa kecil yang terdiri dari tiga sampai sembilan molekul glukosa.makanan berada di mulut hanya dalam waktu yang singkat dan mungkin tidak lebih dari 3-5% dari pati yang telah dihidrolisis pada saat makanan ditelan. Sekalipun makanan tidak berada cukup lama dalam mulut untuk dipecah oleh ptialin menjadi maltosa,tetapi kerja ptialin dapat berlangsung terus menerus selama satu jam setelah makanan

memasuki lambung,yaitu sampai isi lambung bercampur dengan zat yang disekresikan oleh lambung.Selanjutnya aktivitas ptialin dari air liur dihambat oleh zat asam yang disekresikan oleh lambung.Hal ini dikarenakan ptialin merupakan enzim amilase yang tidak aktif saat PH medium turun di bawah 4,0.

Sehingga untuk mencapai hati tempat glukosa berubah menjadi glukogen diperlukan waktu yang lebih lama. Makanan dari lambung harus melewati usus lalu dialirkan oleh darah ke hati. Selain itu kadar glukosa dipengaruhi oleh pola makan dan perbedaan aktivitas mahasiswa tersebut dalam kesehariannya. Kesalahan lain yang mungkin menyebabkan perbedaan ini adalah proses pembuatan larutan kedalam kuvet dan juga homogenisasi larutan.

TRIGLISERIDA

Kadar trigliserida yang diperoleh dari hasil pengukuran sampel darah berkisar antara 6383 mg/dl. Hal ini masih dalam batas normal karena masih < 150 mg/dl. Makanan yang dikonsumsi akan masuk ke dalam tubuh untuk diolah dalam sistem pencernaan. Dalam proses tersebut, makanan yang mengandung lemak dan kolesterol akan diurai secara alami menjadi trigliserida, kolesterol, asam lemak bebas, dan fosfolipid. Senyawa-senyawa di atas akan didistribusikan ke seluruh tubuh melalui sistem peredaran darah untuk memenuhi kebutuhan tubuh. Karena sifatnya yang sukar larut dalam cairan seperti darah, kolesterol beke sama dengan protein membentuk partikel yang bernama lipoprotein. Dalam bentuk inilah kolesterol dan lemak yang ada disalurkan ke seluruh tubuh. Trigliserid adalah salah satu bentuk lemak yang diserap oleh usus setelah mengalami hidrolisis. Interpretasi hasil pemeriksaan laboratorium terhadap trigliserid (Normal < 150 mg/dL ;Batas tinggi $150 - 199$ mg/dL ;Tinggi ≥ 200 mg/dL).

UREA

Kadar urea yang diperoleh adalah 127, 23 mg/dl. Dari data nilai ini bisa dikatakan terlalu tinggi ataupun tidak normal. Data yang salah bisa disebabkan kesalahan dalam pencampuran larutan kedalam kuvet. Urea (juga dikenal sebagai karbamid) merupakan produk limbah dari banyak organisme hidup, dan merupakan komponen organik utama urin manusia. Hal ini karena pada akhir rantai reaksi yang memecah asam amino yang membentuk protein. Asam amino dimetabolisme dan diubah dalam hati menjadi amonia, CO_2 , air dan energi. Tapi

amonia merupakan racun bagi sel-sel , sehingga harus dikeluarkan dari tubuh . Seorang dewasa biasanya mengeluarkannya sekitar 20-40 gram urea per hari. Setiap kondisi yang mengganggu penghapusan urea oleh ginjal dapat menyebabkan uremia, penumpukan urea dan limbah nitrogen lainnya dalam darah yang bisa berakibat fatal. Untuk membalikkan kondisi, baik penyebab gagal ginjal harus dihapus dengan menjalani dialisis darah untuk menghapus kotoran dari darah.

Saran :

1. Penjelasan prosedur kerja bagi praktikan agar lebih memahami dan mampu melakukan percobaan secara mandiri.
2. Penggunaan alat yang tepat seperti pada pengenceran lebih baik dengan mikropipet bukan pipet mohr biar lebih akurat hasilnya.